

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



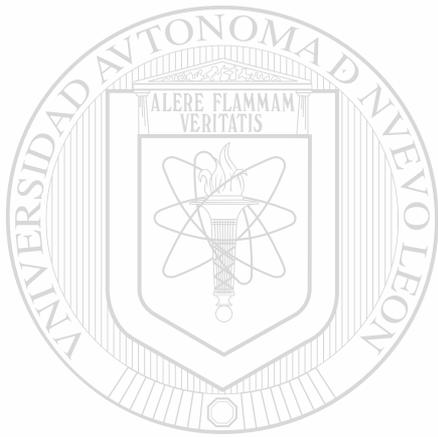
"ANALISIS DEL PERFIL DE EXPRESION DEL
CANCER CERVICAL"

TESIS PRESENTADA POR:

M. C. VIRGILIO BOCANEGRA GARCIA

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Septiembre, 2004



U ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

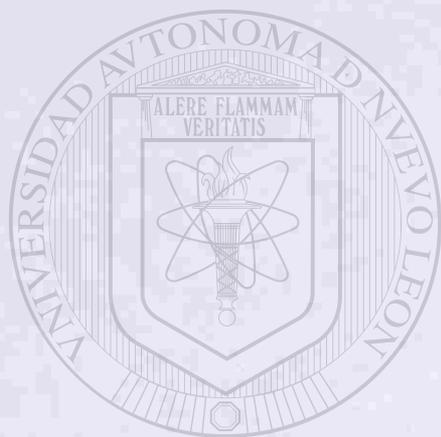
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
RC280
.U8
B6
2004
c.1



1080126305



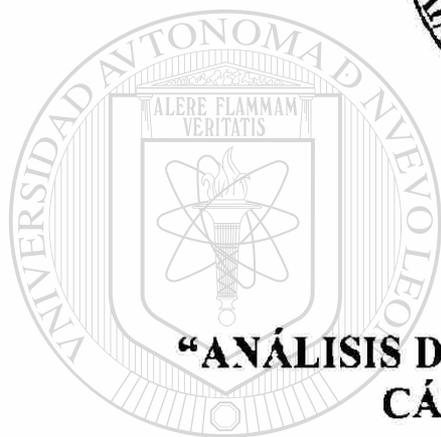
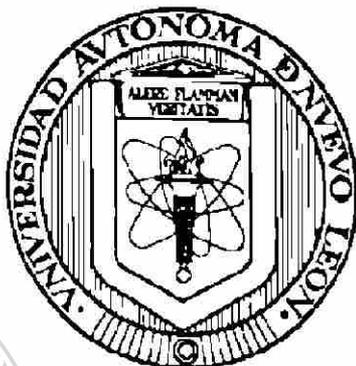
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**“ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL
CÁNCER CERVICAL”**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TESIS PRESENTADA POR:



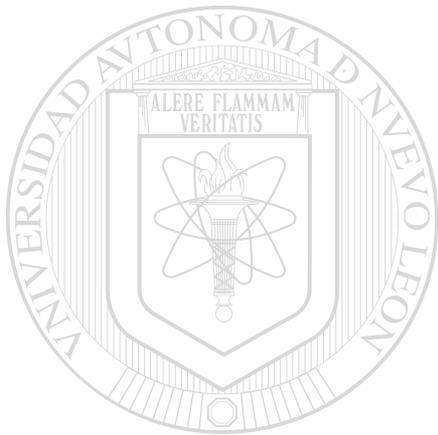
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M. C. VIRGILIO BOCANEGRA GARCÍA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética

Septiembre, 2004

TD
RL28D
.U8
B6
2004



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

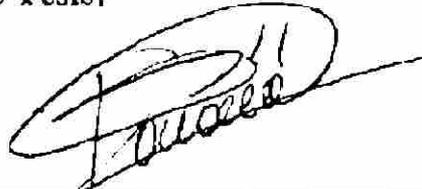
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL CÁNCER CERVICAL

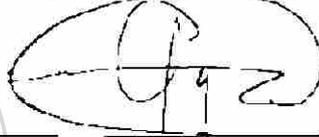
Aprobación de Tesis:



DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ
Directora de tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Co-Director de Tesis



DR. RICARDO M. CERDA FLORES
Co-Director de Tesis

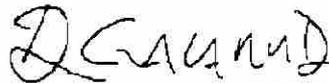


DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis

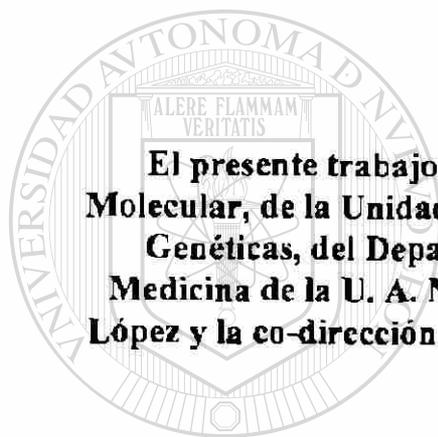
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS

DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Co-Directora de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Molecular, de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., bajo la dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y la co-dirección de los Drs. Augusto Rojas Martínez y Hugo A. Barrera Saldaña.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

M. C. Virgilio Bocanegra García
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Septiembre 2004

Título del Estudio: **ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL CÁNCER CERVICAL**

Número de páginas: 135 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de Estudio: Genómica del cáncer

INTRODUCCIÓN. El cáncer cervical constituye el 6% de los tumores malignos, a nivel mundial y en los países del tercer mundo causa un alto índice de mortalidad. Al desarrollo de cáncer cervical se ha asociado la infección por el virus del papiloma humano (HPV), del cual se conocen alrededor de 100 tipos, pero los tipos 16 y 18 son los más frecuentemente encontrados en cáncer cervical. Debido a que el cáncer cervical es una enfermedad multifactorial asociada a un agente infeccioso, la identificación de genes virales y genes del hospedero, diferencialmente expresados que puedan eventualmente utilizarse como marcadores moleculares para el desarrollo de este cáncer, es de vital importancia. En este trabajo, se llevó a cabo un análisis por microarreglos del transcriptoma de muestras de líneas celulares de cáncer y tejido cervical normal. Las muestras que se analizaron fueron tejido cervical normal (TCN), células SiHa las cuales son positivas para HPV16, células C33A que son HPV negativas y células HeLa que son positivas para HPV18, llevando a cabo la hibridación competitiva utilizando el tejido cervical normal como referencia. Con esto se abarcan tres posibilidades que se pueden presentar: la presencia de HPV16, presencia de HPV18 y ausencia del virus HPV en cáncer cervical. También se llevó a cabo el análisis del perfil de expresión de 5 genes del VPH tipo 16 en las tres líneas utilizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS. Extracción de RNA por el método de gradiente de cloruro de cesio. Los RNAs se marcaron mediante una reacción de retrotranscripción con la incorporación de marcadores fluorescentes y se aplicaron a los microarreglos mediante hibridación competitiva en un panel de 2000 genes relacionados con cáncer. Después del análisis matemático se descartaron todos los genes que no tuvieran una diferencia de expresión de al menos 2.5 veces con respecto a la referencia. Cada gen seleccionado se validó por RT-PCR semicuantitativa. Para el estudio de la expresión de los genes virales seleccionados (E6, E7, L1, E4 y E2), se diseñaron iniciadores y sondas, para su análisis por PCR y RT-PCR en tiempo real.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES. Se analizaron 3 sistemas, TCN/C33A, TCN/SiHa, TCN/HeLa. De cada sistema se eligieron 3 genes sobre-expresados y 3 genes sub-expresados y se validó su nivel de expresión diferencial por RT-PCR. De los 18 genes analizados en total, se obtuvo la validación de 13 genes de expresión diferencial, lo que nos permitió la identificación de la alteración de 6 rutas de señalización en este tipo de cáncer. En el análisis de la expresión de los genes virales se encontraron niveles de expresión muy diferentes, pero en general se observó el patrón de bajo número de copias y alta expresión del virus en las células SiHa, alto número de copias y baja expresión en las células CasKi. Cabe mencionar que queda por esclarecerse el papel que juegan estos genes en el CaCU y los mecanismos que regulan la expresión de los genes virales, ya que la actividad de estos no está relacionada con el número copias del genoma viral presentes.

Firma del Asesor:

Firma del Coasesor:

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Manuela García Salinas y Virgilio Bocanegra Sánchez, por su apoyo, por la vida, por todo, gracias.

...

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez, por el apoyo, ayuda y consejos brindados para el desarrollo de la tesis y a lo largo de mi estancia en la ULIEG

A la Dra. Rocío Ortiz López, por ser mi asesora del trabajo y apoyarme incluso cuando no estábamos de acuerdo en ideas o estrategias.

Al Dr. Augusto Rojas Martínez, por los consejos para llevar a cabo la tesis.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por darme la oportunidad de cursar el doctorado y por enseñarme los caminos de la investigación.

A la Dra. Agnès Revol de Mendoza, por los comentarios a lo largo del trabajo y apoyo en el desarrollo experimental de la tesis.

Al Dr. Ricardo M. Cerda Flores, por sus comentarios en el desarrollo de la tesis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al departamento de Ginecología del Hospital Universitario, especialmente al Dr. Oscar Vidal Gutiérrez y a los residentes de Ginecología por las facilidades prestadas para el acceso a las muestras y la buena disposición que siempre presentaron.

A la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, especialmente al Dr. Jorge Ramírez Salcedo por su buena disposición y ayuda en la realización de los experimentos de microarreglos.

...

A mis amigos, Luis, Francis, Lucy, Omar, Alejandro con quienes el tiempo sigue pasando, las ideas yendo y viniendo y el espacio entre nosotros aumentando y disminuyendo pero su amistad perdura. Por su apoyo directo e indirecto, gracias.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Ivan, Olivia, Luis, Irma, Pablo, Sergio, por las pláticas en la comida que más bien eran discusiones desde filosofía hasta desarrollo de estrategias de las tesis.

A mis compañeros y amigos de la ULIEG: Cristian, Angel, Naika, Polo, Itzel, Mauricio, Rafael, Edith y Sergio. De todos aprendí, a todos les deseo lo mejor.

A Iram y Andrés, quienes cada uno a su modo me ayudaron en aspectos muy importantes de la tesis y sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

...

A la UAMRA en Reynosa, especialmente a los directivos y amigos Juan José González Cabriales, José Alberto Ramírez de León, Rosa Issel Acosta González, Gerardo Flores Gutiérrez.

A mis profesores y amigos, Enrique González Rodríguez, Juan Francisco Lerma Alvizo, Humberto Francisco Leal Ayala, Jesús Enrique Castrejón Durán.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

...

A Fabiola, por tu paciencia, por tu ayuda, por tu tiempo, por tu ánimo, por tu contagiosa frescura en la forma de ver la vida, por haber estado conmigo, gracias.

...

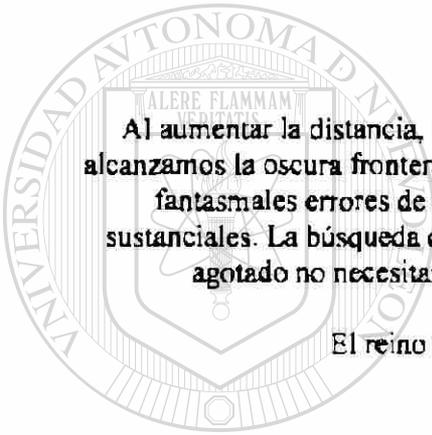
Al CONACYT por el apoyo económico brindado para cursar el Doctorado.

A la ULIEG

GENÉTICA MOLECULAR Y ANEXOS



“Una salus victus, nullam sperare salutem”



Al aumentar la distancia, nuestro conocimiento se va desvaneciendo. Finalmente alcanzamos la oscura frontera de nuestro telescopio. Allí medimos sombras, y entre los fantasmales errores de medición buscamos señales que sean levemente más sustanciales. La búsqueda continuará. Hasta que los recursos empíricos no se hayan agotado no necesitaremos pasar al reino visionario de la especulación.

El reino de las nebulosas. Edwin Hubble. 1936

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Come bitter rain,
and wash from my heart
that saddest of all words:
Home**

Ulatempa Poetees, “Song of my Exile”

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
CAPÍTULO I	1
ANTECEDENTES.	1
1.1. EL CÁNCER CERVICOUTERINO.	1
1.1.1. Epidemiología y etiología.	1
1.1.2. Cuadro clínico y diagnóstico del CaCU.	2
1.1.3. Estadios del CaCU.	5
1.1.4. Factores pronóstico del CaCU.	6
1.1.5. Tratamiento.	6
1.2. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV).	8
1.2.1. Biología Molecular del HPV.	9
1.2.2. Características de los HPV.	10
1.2.3. Genética del HPV - Integración y ensamblaje.	11
1.2.4. Funciones e interacciones de la oncoproteína viral E7.	13
1.2.5. Funciones e interacciones de la oncoproteína viral E6 y su efecto sobre P53.	15
1.2.6. Oncogenicidad y desregulación del ciclo celular por E6 y E7.	18
1.3. LA IMPORTANCIA DE LOS CAMBIOS EN EL PERFIL DE EXPRESIÓN EN EL DESARROLLO DE CÁNCER.	19
1.3.1. Estrategias de análisis de perfil de expresión.	19
1.3.2. El desarrollo de la tecnología de microarreglos para el análisis de la expresión genética.	21
1.3.3. Estudios del transcriptoma.	23
1.3.4. Estudios del transcriptoma del CaCU.	24
1.4. JUSTIFICACIÓN.	30
CAPÍTULO II OBJETIVOS.	31
2.1. Objetivo general.	31
2.2. Objetivos específicos.	31
2.3. ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO.	32
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS.	33

3.1. Origen de los reactivos.	33
3.2. Equipo.	34
3.3. Metodología.	36
3.3.1. Recolección y almacenamiento de las muestras.	36
3.3.2. Extracción del DNA.	37
3.3.3. Extracción del RNA.	38
3.4. Cuantificación del DNA y RNA obtenidos.	39
3.5. Análisis de los genes virales.	40
3.5.1. Análisis de las secuencias y diseño de sondas.	40
3.5.2. Obtención del DNAc de los genes virales..	40
3.5.3. PCR cuantitativa de los genes virales.	42
3.5.3.1. Diseño de la curva de calibración.	42
3.5.3.2. Montaje de la placa.	42
3.5.3.3. Cuantificación del número de copias.	43
3.5.4. Análisis de resultados.	44
3.6 Análisis de los genes celulares.	45
3.6.1. Marcaje y síntesis de los DNAc.	46
3.6.2. Hibridación cuantitativa a gran escala.	47
3.6.3. Lectura con el escaner y obtención de la imagen.	48
3.6.4. Procesamiento de los datos: Normalización, transformación y selección de genes	49
3.7 Validación de los genes seleccionados por RT-PCR semicuantitativa	49
3.7.1. Selección de secuencias y diseño de iniciadores.	49
3.7.2. Condiciones de reacción de amplificación de los genes seleccionados.	52
CAPÍTULO IV RESULTADOS.	58
<hr/>	
4.1. Obtención del DNA y RNA.	58
4.1.1. Extracción de DNA.	58
4.1.2. Preparación del RNA.	59
4.2. Análisis del perfil de expresión de los genes virales.	61
4.2.1. Gen E6..	62
4.2.2. Gen E7..	62
4.2.3. Gen L1..	63
4.2.4. Gen E4..	63
4.2.5. Gen E2..	63
4.3. Análisis del perfil de expresión de los genes celulares mediante microarreglos.	66
4.3.1. Preparación del DNAc marcado.	67
4.3.2. Hibridación.	68
4.3.3. Normalización y transformación de los datos.	68
4.3.4. Selección de los genes..	74
4.3.5. Validación de los resultados de microarreglos.	76
4.3.6. Estudios de expresión en C33A/TCN mediante RT-PCR semicuantitativa.	76
4.3.6.1. Genes sobre-expresados en el sistema C33A/TCN.	76

4.3.6.1.1. Gen six 1 (GC14M059102).	76
4.3.6.1.2. Gen rab3d (GC19M011296).	77
4.3.6.1.3. Gen dea1. (MGC5528).	77
4.3.6.2. Genes subexpresados en el sistema C33A/TCN.	78
4.3.6.2.1. Gen p1gs2 (GC01M183879).	78
4.3.6.2.2. Gen mdm2c (GC12P067488).	78
4.3.6.2.3. Gen Hla-e (GC06P030563).	79
4.3.7. Estudios de expresión de HeLa/TCN.	80
4.3.7.1. Genes sobreexpresados en el sistema HeLa/TCN.	80
4.3.7.1.1. Gen bripl (GC17M060234).	80
4.3.7.1.2. Gen rab27B (GC18P050644).	81
4.3.7.1.3. Gen pah (GC12M101735).	81
4.3.7.2. Genes subexpresados en el sistema HeLa/TCN.	81
4.3.7.2.1. Gen mdm2c (GC12P067488).	81
4.3.7.2.2. Gen Hla-e (GC06P030563).	82
4.3.7.2.3. Gen emk-1 (GC11P063382).	83
4.3.8. Estudios de expresión en SiHa/TCN.	84
4.3.8.1. Genes sobreexpresados en el sistema SiHa/TCN.	84
4.3.8.1.1. Gen ppp4c (GC16P030126).	84
4.3.8.1.2. Gen Stat5b (GC17M040726).	84
4.3.8.1.3. Gen rab23 (GC06M057100).	85
4.3.8.2. Genes subexpresados en el sistema SiHa/TCN.	85
4.3.8.2.1. Gen frap1. (GC01M010876).	85
4.3.8.2.2. Gen mdm2c (GC12P067488).	86
4.3.8.2.3. Gen hla-e (GC06P030563).	87
4.3.9. Resumen de resultados de validación de los genes seleccionados de los experimentos de microarreglos.	87

CAPÍTULO V	DISCUSIÓN.	89
-------------------	-------------------	-----------

5.1. Perfil de expresión de los genes virales.	90
--	----

5.2. Perfil de expresión de los genes celulares.	93
--	----

CAPÍTULO VI	CONCLUSIONES.	96
--------------------	----------------------	-----------

CAPÍTULO VII	PERSPECTIVAS.	97
---------------------	----------------------	-----------

CAPÍTULO VIII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	98
----------------------	------------------------------------	-----------

APÉNDICE 1

CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES SELECCIONADOS.	109
--	------------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Condiciones de reacción para la RT.	41
Tabla 2. Condiciones de amplificaciones para la reacción de la RT.	41
Tabla 3. Condiciones de reacción para la PCR cuantitativa.	44
Tabla 4. Condiciones de RT para marcaje del DNAc.	47
Tabla 5. Genes seleccionados y número de acceso a secuencias del gen bank.	50
Tabla 6. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes seleccionados.	51
Tabla 7. Condiciones de reacción de PCR para los genes seleccionados.	54
Tabla 8. Condiciones de amplificación para la reacción de PCR de los genes seleccionados.	55
Tabla 9. Condiciones de reacción de retrotranscripción.	56
Tabla 10. Condiciones de incubación para la reacción de retrotranscripción.	56
Tabla 11. Resultados de la extracción de DNA de líneas celulares.	58
Tabla 12. Resultados de la corroboración de la expresión de los genes seleccionados.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Epitelio cervical normal.	3
Figura 2. Esquemas de clasificación de progresión y estadios del cáncer cervical.	4
Figura 3. Anatomía del virus del papiloma humano tipo 16.	9
Figura 4. Esquema general de la regulación del ciclo celular.	15
Figura 5. Esquema general del desarrollo experimental.	32
Figura 6. Distribución de las muestras en la placa para qPCR del sistema ABI PRISM 7000.	43
Figura 7. Procedimiento de validación de los genes seleccionados mediante RT-PCR semicuantitativa.	57
<hr/>	
Figura 8. Extracción de DNA genómico a partir de líneas celulares y tejido cervical.	59
Figura 9. Resultado de la ultracentrifugación del lisado celular para la obtención de RNA.	60
Figura 10. RNA obtenido por el método de ultracentrifugación de gradiente en cloruro de cesio.	61
Figura 11. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en CaSki.	64
Figura 12. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en SiHa.	65
Figura 13. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en HeLa.	65
Figura 14. Niveles de actividad de los genes seleccionados de HPV-16 en CaSki, SiHa y HeLa.	66

Figura 15. Resultado de la síntesis y marcado de DNAc para la hibridación a gran escala.	67
Figura 16. Imágenes de los resultados de la hibridación a gran escala en los tres sistemas de análisis de expresión.	69
Figura 17. Normalización de los datos obtenidos de la hibridación a gran escala.	70
Figura 18. Gráfica de los datos normalizados.	71
Figura 19. Datos normalizados y transformados.	72
Figura 20. Gráficas de los tres sistemas analizados, con los resultados normalizados y transformados.	73
Figura 21. Genes seleccionados en el sistema C33A/TCN.	74
Figura 22. Genes seleccionados en el sistema HeLa/TCN.	75
Figura 23. Genes seleccionados en el sistema Silla/TCN.	75
Figura 24. Gel de la amplificación del gen six-1 y gráficas de microdensitometría.	76
Figura 25. Gel de la amplificación del gen rab3d y gráficas de microdensitometría.	77
Figura 26. Gel de la amplificación del gen ptgs2 y gráficas de microdensitometría.	78
Figura 27. Gel de la amplificación del gen mdm2c y gráficas de microdensitometría del sistema C33A/TCN.	79
Figura 28. Gel de la amplificación del gen hla-e y gráficas de microdensitometría del sistema C33A/TCN.	79
Figura 29. Gel de la amplificación del gen bripl y gráfica de microdensitometría.	80
Figura 30. Gel de la amplificación del gen rab27b y gráfica de microdensitometría.	81
Figura 31. Gel de la amplificación del gen mdm2c y gráfica de microdensitometría del sistema HeLa/TCN.	82
Figura 32. Gel de la amplificación del gen hla-e y gráfica de microdensitometría del sistema HeLa/TCN.	83
Figura 33. Gel de la amplificación del gen emk-1 y gráfica	

de microdensitometría.	83
Figura 34. Gel de la amplificación del gen ppp4c y gráfica de microdensitometría.	84
Figura 35. Gel de la amplificación de los genes stat5b y rah23 y gráficas de microdensitometría.	85
Figura 36. Gel de la amplificación del gen frap1 y gráfica de microdensitometría.	86
Figura 37. Gel de la amplificación del gen mdm2c y gráfica de microdensitometría del sistema SiHa/TCN.	86
Figura 38. Gel de la amplificación del gen hla-e y gráfica de microdensitometría del sistema SiHa/TCN.	87
Figura 39. Rutas metabólicas donde participa el gen ptgs2 también denominado COX2.	112
Figura 40. Rutas donde participa el gen mdm2c en el ciclo celular.	114
Figura 41. Esquema donde se muestra la función de hla-e.	115
Figura 42. Dibujo esquemático de la función del gen BRCA1.	116
Figura 43. Dibujo esquemático que muestra las múltiples rutas de señalamiento donde participa la proteína stat5.	119

NOMENCLATURA

μ l	Microlitros
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
Abs	Absorbancia
BPV	Papilomavirus bovino
BSA	Albúmina sérica bovina
DNAc	DNA complementario
C-terminal	Carboxilo terminal
DMEM	Medio mínimo esencial Dulbecco's
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DIT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético

G3PDH Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa

GAPDH Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

h Horas

HPV Papilomavirus humano

Kb Kilobases

kDa Kilodaltones

LB Luria-Bertani

M Molar

min Minutos

ml Mililitros

mM	Milimolar
ng	nanogramo
nm	nanómetro
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PV	Papilomavirus

qPCR	PCR cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sodio

TBE	Buffer tris-boratos-EDTA
-----	--------------------------

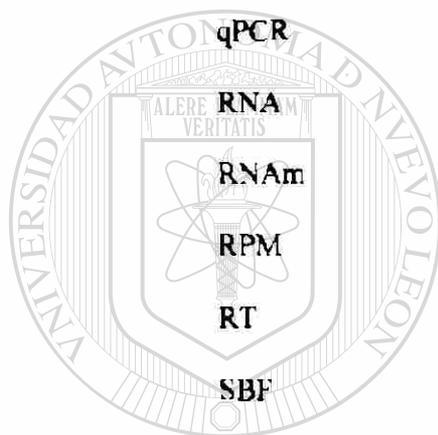
TCN	Tejido cervical normal
-----	------------------------

TE	Buffer tris-EDTA
----	------------------

TSS	Solución de almacenaje y transformación
-----	---

UV	Ultravioleta
----	--------------

V	Voltios
---	---------



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO I

ANTECEDENTES.

1.1. EL CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino (CaCU) constituye el 6% de los tumores malignos a nivel mundial y en los países del tercer mundo causa un alto índice de mortalidad. El pronóstico de la enfermedad depende del estadio en el que se encuentra en el momento de ser diagnosticada. Más del 90% de los tumores pueden ser detectados en estadios iniciales, mediante el tamizado de la población de alto riesgo con el estudio citológico de la prueba de Papanicolaou. Sin embargo la exploración no es una práctica rutinaria en más de un tercio de las pacientes de riesgo, porcentaje que es aún mayor en los países subdesarrollados, donde prevalece como un problema importante de salud.^{2,3}

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.1.1. Epidemiología y etiología.

Los estadios cancerosos inician entre la quinta y la sexta década de la vida (edad media de 54 años), contrastando con la edad media de las lesiones precursoras (neoplasia intraepitelial cervical o CIN) que inciden en mujeres más jóvenes (alrededor de los 40 años)⁴. El proceso de transformación maligna requiere un largo periodo de latencia, en algunos casos de hasta de 20 años⁵.

La etiología del CaCU se asemeja a las patologías venéreas⁶, ya que se asocian a bajo nivel económico, inicio precoz de las relaciones sexuales, coitos frecuentes, múltiples parejas sexuales y coito con hombres no circuncisos o con escasa higiene genital, así como con el hábito de fumar^{7,8,9,10}. También se ha relacionado al CaCU con varios haplotipos de complejo mayor de histocompatibilidad (HLA)^{11,12,13,14}. Sin embargo, el factor de riesgo causal demostrado en los estudios epidemiológicos mediante técnicas moleculares, es la infección por el papilomavirus humano (HPV)¹⁴. La infección por HPV es frecuente en la población y se transmite a través de las relaciones sexuales. Hay alrededor de 100 tipos de HPVs, de los cuales solo 23 de ellos infectan al cérvix. Los tipos llamados malignos, de entre los que destacan el 16, 18, 31 y el 45 se asocian con frecuencia a displasias moderadas (CIN II) y displasias severas (CIN III) o carcinomas *in situ*, además de que se encuentran en la mayoría de los pacientes con CaCU (95%)¹⁵. Los llamados HPV benignos, (como el tipo 5, 11, 12) en cambio solo se encuentran en tumores epiteliales benignos, comúnmente conocidos como verrugas. La tipificación de HPV puede ser útil en las pacientes con citologías con anomalías de bajo grado o citologías dudosas, a fin de determinar el riesgo evolutivo individual y recomendar el seguimiento más estrecho a las mujeres con alto riesgo de una posible progresión a carcinoma.

1.1.2. Cuadro clínico y diagnóstico del CaCU.

El CaCU se origina en la unión de los epitelios escamoso y columnar (ver figura 1), siendo las lesiones precursoras la displasia o el carcinoma *in situ*, las cuales progresan lentamente a cáncer invasivo. Los estudios longitudinales muestran que las pacientes no tratadas con cáncer *in situ* desarrollarán carcinoma invasivo en un periodo de 10 a 12 años en

el 30-70% de los casos; aunque en el 10% de los casos las lesiones pueden progresar de forma acelerada del estadio *in situ* a carcinoma invasivo en el período de un año.

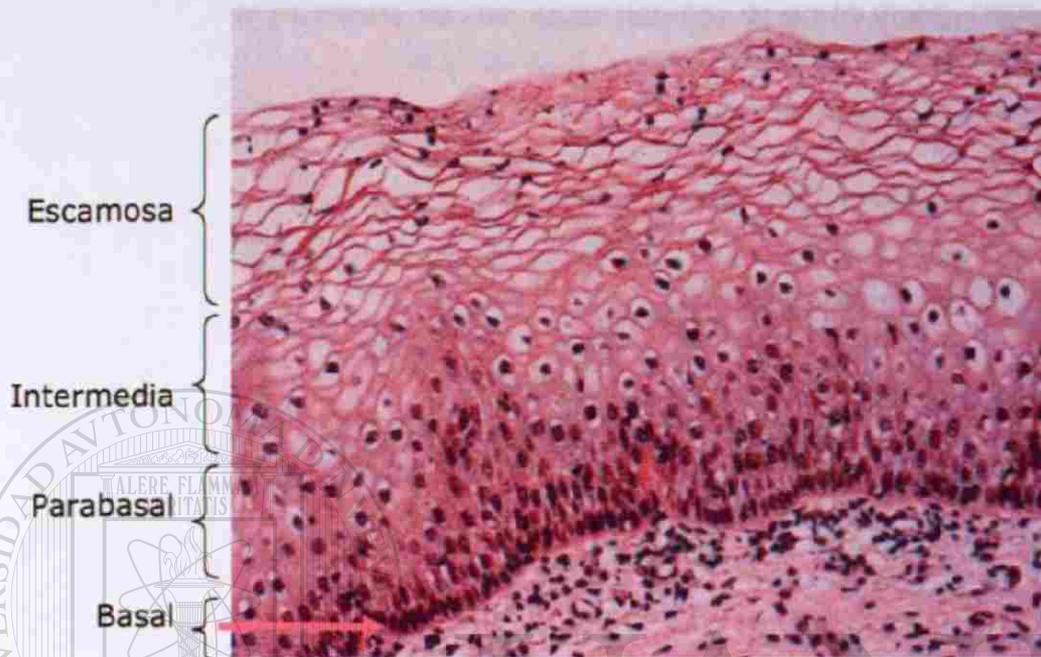


Figura 1. Epitelio cervical normal. Se observan las cuatro capas principales de la zona de transición del epitelio cervical normal, comenzando en la parte inferior con la capa basal, luego la parabasal, intermedia y escamosa, con estas tres últimas proliferando a partir de la capa basal¹⁶.

Una vez desarrollado el cáncer, el tumor invade en profundidad hasta romper la membrana basal, penetrando el estroma cervical directamente o por los canales vasculares. Los diferentes estadios y grados de progresión del CaCU se esquematizan en la figura

2¹⁷.

Desde el cérvix, el tumor puede extenderse a la vagina o al segmento uterino inferior o a través de los espacios paracervicales y los ligamentos uterosacos. También puede fijarse a la pared pélvica por extensión directa o por coalescencia del tumor con las adenopatías regionales. Localmente, puede afectar a la vejiga urinaria por vía anterior y posteriormente al recto.

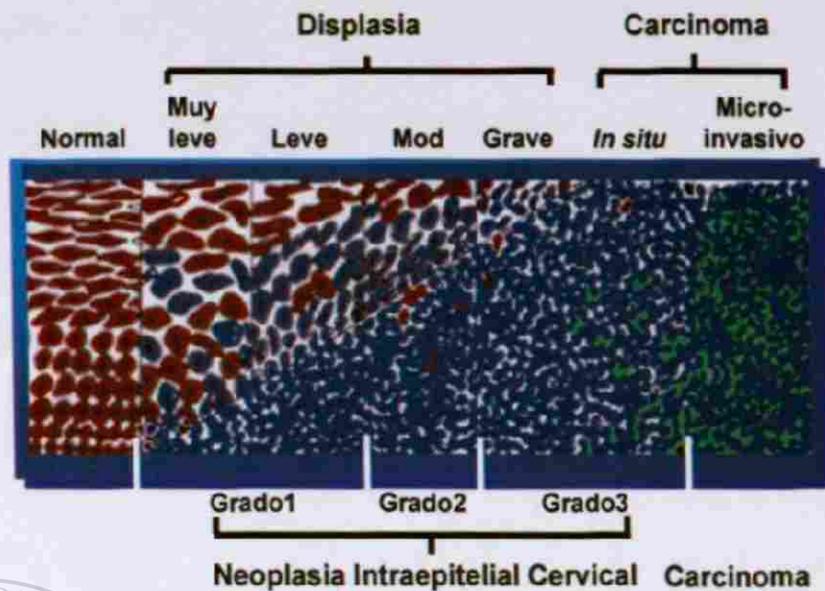


Figura 2. Esquemas de clasificación de progresión y estadios del CaCU. Existen dos esquemas de clasificación del grado de avance del CaCU, el primero (arriba) puede diferenciar entre displasia y carcinoma y establece niveles de desarrollo que van desde muy leve hasta carcinoma microinvasivo. El segundo (abajo) solo tiene tres clasificaciones del grado de avance del CaCU.

El cérvix dispone de una rica red de vasos linfáticos, que drena a los ganglios pélvicos y a los paraaórticos. Usualmente el orden de la afectación es progresivo: inicialmente existe afección pélvica, posteriormente paraaórtica y a continuación a distancia; de ahí la

importancia del tratamiento local en estadios tempranos. La localización de las metástasis es preferentemente al pulmón, ganglios extrapélvicos, hígado y huesos¹⁷.

La enfermedad preinvasiva se detecta usualmente en la exploración rutinaria y se confirma con la citología de la exploración Papanicolaou. Esto es de vital importancia, ya que las pacientes con enfermedad invasiva precoz pueden ser asintomáticas. El primer síntoma del CaCU invasivo es la metrorragia o el sangrado postcoital, ocasionalmente con flujo vaginal maloliente, el dolor pélvico se presenta en casos de enfermedad invasiva. La triada de dolor ciático, edema de pierna e hidronefrosis se asocia a la enfermedad pélvica avanzada. Otros síntomas como la hematuria, incontinencia urinaria secundaria a

fistula vesico-vaginal o estreñimiento por afectación rectal pueden presentarse por afectación de órganos vecinos.

La evaluación de la paciente debe incluir: historia clínica con examen clínico completo incluyendo el examen pélvico y rectal, hemograma, bioquímica hepática y renal, sedimento de orina, tomografía axial computarizada (TAC) abdominal y pélvica, y citoscopia en caso de sospecha de afectación local. El estudio histológico es básico y puede requerir estudio citológico, colposcopia, biopsias de los cuatro cuadrantes cervicales y dilatación con legrado uterino. La extensión del estudio se determina por los hallazgos de cada procedimiento, pero debe suministrar suficiente información para estadificar adecuadamente a la paciente.¹⁷

En cuanto a la anatomía patológica, el carcinoma escamoso comprende el 90% de las lesiones, mientras que el adenocarcinoma aproximadamente el 10% restante. Los carcinomas adenoescamosos y los carcinomas de células pequeñas son raros. Se han descrito también sarcomas primarios y linfomas primarios y secundarios.¹⁷

1.1.3. Estadios del CaCU.

La estadificación se basa en la información obtenida mediante el examen pélvico bajo anestesia, la pielografía endovenosa, citoscopia y rectoscopia. La estadificación es clínica y no varía con los hallazgos quirúrgicos. La clasificación recomendada es la de la Federation Internationale de Gynecologie et Obstetrique (FIGO).

En el estadio I la enfermedad está limitada al cerviz. En el II afecta más allá del cérvix a los dos tercios superiores de vagina o al tejido parametrial, pero no llega a la pared pélvica. En el estadio III el tumor alcanza la pared pélvica, afecta los ganglios pélvicos o al primer tercio inferior de la vagina. En el estadio IV ha invadido la mucosa de la vejiga o del recto o hay metástasis a distancia¹⁸.

1.1.4. Factores pronóstico del CaCU.

Los factores pronóstico más importantes son el estadio clínico, el volumen tumoral, el grado de diferenciación celular, el tipo histológico (escamoso versus adenocarcinoma o adenoescamoso), la extensión linfática y la invasión vascular. Según diversos estudios, otros factores de mal pronóstico son: compromiso capilar linfático, profundidad de la compromiso estromal, edad, mal estado general inicial, e infección por HPV de alto riesgo¹⁹.

Sin embargo, el mayor problema para determinar el pronóstico de la enfermedad en etapas tempranas, cuando no hay todavía síntomas claros y los estudios citológicos no muestran cambio alguno, radica en la falta de marcadores moleculares que puedan predecir la evolución de la enfermedad.¹⁹

1.1.5. Tratamiento

Durante años los esquemas de irradiación y/o cirugía han sido los tratamientos de elección. La quimioterapia se ha utilizado asistencialmente y con objetivo paliativo en las

recurrencias o en la enfermedad metastásica, aunque actualmente se utiliza con éxito como radiosensibilizadora.

En la mayoría de los centros se prefiere la cirugía para tratar los estadios I y IIa, pues preserva la función ovárica y vaginal. La cirugía es siempre de elección en casos de cáncer y gestación, enfermedades inflamatorias intestinales o anexiales asociadas, irradiación previa de la pelvis y en presencia de un tumor ovárico concomitante. La elección de la cirugía va a depender del volumen tumoral. Las complicaciones de cirugía radical por lo general son fundamentalmente urológicas. Aunque el porcentaje de fístulas urinarias es bajo (0-3%), el daño a la sensibilidad vesical y a la capacidad contráctil del músculo detrusor son muy frecuentes y están en relación directa con la radicalidad de la operación. Otras complicaciones, todas ellas prevenibles, son la aparición de linfocele, la infección, hemorragia y el tromboembolismo pulmonar.²⁰

La radioterapia puede aplicarse como tratamiento localizado, de forma exclusiva o postoperatoria. La radioterapia externa pélvica se administra mediante rayos X de alta energía. La dosis recomendada es de 45 a 50 Gray (postoperatoria) o 70 Gray para tratamiento con radioterapia externa exclusiva. Las fuentes radiactivas son el cesio 137 y los hilos de iridio 192.²¹

La quimioterapia en la enfermedad localmente avanzada puede reducir el tamaño tumoral (92% de remisiones en esquemas basados en cisplatino), facilitando la labor del tratamiento local. La quimioterapia puede inhibir la reparación de la lesión producida por la irradiación, puede promocionar la sincronización de las células en una fase sensible a la

irradiación del ciclo celular, iniciar la proliferación de células en fase de reposo y reducir la fracción de células hipóxicas que son resistentes a la irradiación. La quimioterapia también puede aumentar de forma independiente el porcentaje de muerte celular^{22,23}.

1.2. EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV).

Se ha demostrado que el desarrollo del CaCLU está fuertemente asociado a infecciones con los HPVs de alto riesgo, específicamente con los tipos 16 y 18²⁴. La interacción de proteínas virales con proteínas de regulación del ciclo celular del huésped lleva a un descontrol de éste y condiciona a las células afectadas a la transformación maligna. Las proteínas transformantes varían de un tipo de virus a otro. En los papilomavirus bovinos (BPV), la proteína E5 es la responsable de la transformación, mientras que en los humanos (HPV), como en el tipo 16 y 18, las proteínas E6 y E7 son las involucradas en la transformación. La proteína E6 se enlaza a la principal proteína celular supresora de tumores P53 y acelera su degradación, mientras que la proteína E7 se une a otra importante proteína supresora de tumores, PRB para inactivarla. Algunos PVs pueden transformar las células por si solos y otros parecen requerir de la cooperación de oncogenes celulares activados (como los de la familia *Ras*). Curiosamente, en la mayoría de los casos, todos los genes del PV se mantienen en las células tumorales, aunque se ha observado en algunos casos, como en el del BPV tipo 4 (BPV-4), que el DNA viral se pierde luego de la transformación^{25,26,27}.

de ser detectada en las áreas de las lesiones inducidas por el HPV. Los genes L, como el L1 y L2, codifican para las proteínas estructurales y su expresión está restringida a la parte del epitelio que está en diferenciación activa, donde la replicación viral también sucede. Los ORFs de L1 y E6 están separados por 400 a 1,000 pb que no codifican para proteína alguna, y a esta región se le conoce como región no codificante (NCR, del inglés non coding región), región larga de control (LCR; long control región) o región reguladora río arriba (URR; upstream regulatory region). Contiene secuencias promotoras y potenciadoras críticas para regular la replicación viral y la transcripción de los genes celulares y virales. Hay otra pequeña región no codificante (SNR) entre E5 y L2 con una función biológica todavía desconocida^{28,29,30}.

1.2.2. Características de los HPVs.

Las características de la infección de HPV incluyen un tropismo restringido a células epiteliales humanas y un ciclo de vida viral fuertemente ligado al programa de diferenciación del queratinocito hospedero. Este ciclo particular ha limitado a los investigadores el estudiar el ciclo de vida vegetativo del HPV por décadas, debido a la carencia de un modelo de cultivo *in vitro*. De hecho, la transcripción viral está restringida a las células epiteliales de origen humano, y más específicamente a los queratinocitos. En contraste, los genomas de HPV pueden mantenerse y replicarse en varias líneas celulares indiferenciadas a pesar de la infección restringida, mientras que las proteínas de replicación E1 y E2 sean expresadas^{31,32}.

1.2.3. Genética del HPV - Integración y ensamblaje.

La infección por HPV tiene su inicio en las células basales del epitelio escamoso estratificado (ver figura 1), donde una combinación particular de factores celulares interactúan con el LCR y propician la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7. Los productos de estos genes alteran el ciclo celular por su interacción e inactivación de las proteínas supresoras de tumor P53 y PRB, respectivamente. E1 y E2 son las proteínas que se sintetizan posteriormente. E2 bloquea la transcripción temprana y permite que E1 se una específicamente al origen de replicación viral localizado en el I.CR, iniciando la replicación del genoma viral. Siguiendo el curso de la infección viral, la regulación negativa de E2 sobre E6 y E7 conduce a la liberación de P53 y PRB, y el proceso de diferenciación continúa. Después, un promotor tardío putativo puede activar los genes de la cápside L1 y L2. En esta etapa, los virus maduros son ensamblados y pueden ser detectados en las capas superiores del epitelio escamoso³³.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se ha observado que una alteración de la transcripción del gen E2 está usualmente asociada con la neoplasia genital maligna. En la ausencia de E2, las proteínas E6 y E7 continúan siendo expresadas de modo constitutivo, provocando la inmortalidad de las células infectadas y bloqueando el programa de diferenciación epitelial que se mostró en la figura 1. Los estudios de hibridación *in situ* han mostrado que los patrones de la expresión de los genes varían de acuerdo al grado de la lesión clínica. Las proteínas de la región temprana del HPV pueden ser detectadas a través de todo el espectro de lesiones de HPV. En las lesiones benignas, las proteínas E4 y E5 son las más expresadas, mientras

que la expresión de E6, E7 y E2 es baja. En contraste, E6 y E7 son altamente expresadas en las lesiones de alto grado.

En las lesiones genitales, el DNA de HPV es detectado más comúnmente como moléculas episomales en las lesiones precursoras, mientras que usualmente se encuentra integrado en la célula hospedera en los tumores malignos. Además, el HPV siempre está integrado en líneas celulares derivadas de CaCU o en células inmortalizadas por transfección con DNA de HPV 16 o 18. La integración del DNA del HPV es considerada como un paso importante en la progresión del tumor. Las consecuencias de la integración en la estructura y expresión del genoma viral han sido estudiadas extensamente, pero poco se sabe de sus efectos sobre los genes celulares involucrados en la proliferación celular. La integración del genoma viral en el DNA celular puede tener un impacto en los estados iniciales de la transformación celular, en el mantenimiento del fenotipo transformado y/o en la progresión del tumor. Además, el genoma viral integrado puede llevar a la expresión

de proteínas con actividad transformante. Toda vez que la integración viral puede provocar que el genoma hospedero gane genes con un nuevo mecanismo regulador que involucre tanto la pérdida de mecanismos reguladores virales o la adición de nuevos mecanismos de origen celular³⁴.

La integración del HPV en el genoma celular involucra ruptura de la región del gen E2, por lo tanto se inactiva la expresión de E2. Ya que el ORF de E2 del HPV codifica para proteínas de modulación transcripcional, se ha sugerido que la integración del virus en el genoma del hospedero y la interrupción de la expresión de E2 podría desencadenar una expresión descontrolada de los genes transformantes E6 y E7. Otro evento general-

mente resultante de la integración de HPV-16 o 18 es la expresión de E6/E7 via transcritos fusionados virales-celulares. También se considera que la localización cromosómica de la integración del HPV pudiera jugar un papel importante en este proceso.

1.2.4. Funciones e interacciones de la oncoproteína viral E7

a) Formación del complejo PRB-E2F y la progresión del ciclo celular: En el epitelio escamoso normal, las células basales son las únicas capaces de proliferar y una vez que dejan la capa basal, comienzan a diferenciarse. Las células normales tienen puntos de control que se encargan de revisar la progresión del ciclo celular del paso G1 al S y del G2 al M, de modo que las células con DNA dañado o con replicación incompleta puedan tener tiempo de reparar el daño. Cuando el HPV expresa la proteína E7, ésta se une a PRB, provocando una disociación del complejo entre la proteína PRB y la proteína E2F, lo cual lleva a un incremento en la cantidad de E2F libre. E2F es una proteína que induce la síntesis de DNA para que la célula entre en división.

En células normales no infectadas, la acción de E2F cambia durante el curso del ciclo celular. En G1, E2F está asociada con PRB desfosforilada o con las proteínas p107 o p130. El complejo PRB-E2F funciona como un represor activo del ciclo celular, debido a que la sobreexpresión de PRB regula negativamente la transcripción de promotores dependientes de E2F por debajo de los niveles basales. La activación de E2F sucede cuando la célula pasa el límite G1/S. Los complejos PRB-E2F se disocian y la E2F es libre de actuar como un activador transcripcional siempre y cuando PRB sea fosforilada. La fosfori-

lación de PRB depende de ciclinas dependientes de cinasas (CDK). Las CDKs consisten de una subunidad catalítica estable (CDk) y una ciclina, que es una subunidad reguladora degradable que es resintetizada durante la progresión del ciclo celular.

b) El complejo PRB-E7 y sus efectos. La oncoproteína E7 de HPV-16 evita que las células suprabasales pasen a la fase G0 del ciclo celular, incrementando con esto la cantidad de células replicantes que están disponibles. En las células infectadas por HPV, E7 compete directamente con E2F por la unión a PRB, provocando con ésto un incremento de E2F libre. E7 pueden interactuar también con proteínas relacionadas a PRB, como la p107 y la p130, las cuales están asociadas con E2F4 y E2F5 en el ciclo celular. Esta interacción lleva a la expresión de ciclina E y ciclina A, las cuales están involucradas en la inhibición de la familia de proteínas PRB normales. Se ha mostrado que la expresión de la oncoproteína E7 lleva a la inactivación de varias señales reguladoras del crecimiento, incluyendo al arresto del ciclo celular mediado por P53 en G1, inhibición del crecimiento mediada por TGF-beta y quiescencia de queratinocitos suprabasales. En contraste con los queratinocitos normales, los queratinocitos HPV-16 positivos que expresan E7 muestran una diferenciación celular retrasada y una actividad de cdk2 cinasa elevada, además de altos niveles de P21 y asociación de P21 con cdk2. E7 puede interactuar con P21 y eliminar la actividad de inhibición de P21 sobre las actividades asociadas a las ciclinas A y F. Esta capacidad de interacción de E7 durante la diferenciación de queratinocitos parece contribuir a la habilidad de E7 de permitir la síntesis celular de DNA en los queratinocitos en diferenciación³⁵. Para más detalles ver la figura 4 donde se tratan de ejemplificar todas estas interacciones.

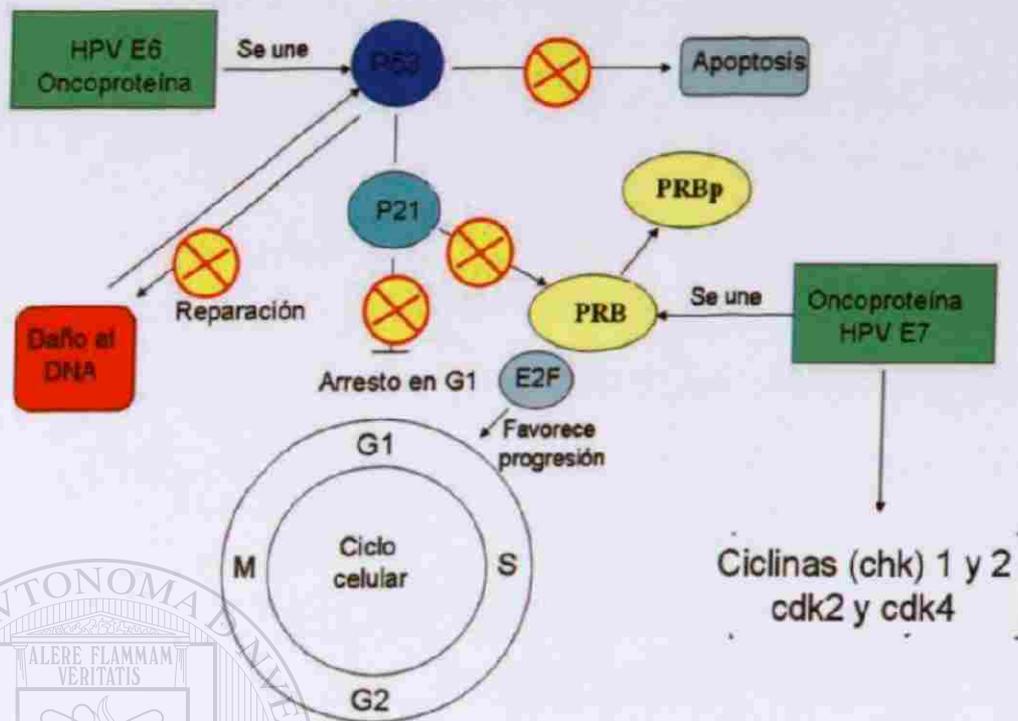


Figura 4. Esquema general de la regulación del ciclo celular. Cuando hay daño en el DNA, éste se detecta y la célula responde activando factores de reparación e inhibidores de la progresión del ciclo celular. Dos de las proteínas que responden al daño del DNA son la supresora de tumor P53 y la ciclina chk1. A su vez, P53 interactúa con P21 para bloquear la actividad de cdk2 (ciclina dependiente de cinasa 2) evitando el paso de G1 a la fase S y una replicación alterada del DNA. Uno de los blancos de cdk2 es la proteína PRB, otra proteína supresora de tumor. Cuando está desfosforilada, PRB interactúa con los factores transcripcionales E2F y previene la transcripción de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular. Cuando PRB es fosforilada (PRBp) por ciclinas dependientes de cinasas como cdk2 y cdk4, PRB ya no interactúa con E2F y el ciclo celular pasa del G1 a S. Las oncoproteínas E6 y E7 al interactuar con P53 y PRB previenen las funciones normales de éstas, desregulando el ciclo celular.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2.5. Funciones e interacciones de la oncoproteína viral E6 y su efecto sobre P53.

a) P53: proteína supresora de tumor y su papel en la apoptosis: La proteína P53 fue descubierta originalmente porque forma complejos con el antígeno T de SV40. Ahora se sabe que interactúa con otras oncoproteínas de virus de DNA como las de los adenovirus y los papilomavirus. El gen que codifica para P53 se encuentra mutado o alterado en la mayoría de los tumores, implicando que la pérdida del producto normal del gen está

asociada con la emergencia de células transformadas. La proteína P53 es activada por varias señales, incluyendo el daño al DNA, llevando al subsecuente arresto del ciclo celular y de la apoptosis. Esta proteína actúa como un guardián genómico que previene la acumulación de errores genéticos, los cuales podrían llevar a la transformación de células y formación de tumores. La proteína P53 es un factor transcripcional específico de secuencia y los genes que regula incluyen a: p21, gadd 45, bax, mdm2, ciclina G e IGFBP3. La activación de estos genes relaciona a P53 con las rutas que gobiernan el arresto del ciclo celular en G1, llevan a la apoptosis o inducen la reparación del DNA. El blanco mejor conocido de P53 es P21, un inhibidor de CDKs (incluyendo a F/Cdk2 y A/Cdk2), el cual es inducido por P53 a través de un motivo de unión de P53 localizado 2.5 Kb río arriba del promotor del gen p21. La inducción de p21 media el arresto del ciclo celular en G1 mediante la prevención de la fosforilación de los miembros de la familia de proteínas de RB. La función del producto de E6 durante una infección del HPV, es intervenir negativamente en las rutas de regulación del ciclo celular y modificar el ambiente celular para facilitar la replicación viral en una célula diferenciada terminalmente. Para lograr esto, la proteína E6 se une a P53 y provoca su degradación rápida mediante la vía celular de la ubiquitina; como consecuencia, cuando la oncoproteína E6 previene todas las funciones normales de P53, favorece la acumulación de errores en el DNA y con esto la posibilidad de que la célula se transforme^{36,37,38}.

b) Participación de P53 en la apoptosis. La palabra apoptosis procede del griego y significa “caída con fragmentación”, hace referencia a un evento celular descrito clásicamente, que cursa con una condensación del citoplasma, reducción del volumen, condensación de la cromatina con fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos

provenientes de la rotura celular. Este proceso está programado genéticamente y constituye la forma en que se contrarresta cualquier exceso que se produzca en la proliferación de un tejido. Por otra parte, supone un medio de seguridad que permite eliminar las células con genotipo/fenotipo alterado. Este proceso puede activarse igualmente ante diversos estímulos como la irradiación, quimioterapia, infecciones virales, factores de crecimiento, hormonas o procesos de desarrollo embrionario.

Estudios recientes han mostrado que muchos virus pueden inducir apoptosis en células infectadas, pero que los virus transformantes pueden inhibir los eventos apoptóticos, provocando la transformación de la célula. Los virus más estudiados a este respecto han sido el virus de la vaccinia, citomegalovirus murino, PV, adenovirus y herpesvirus. La inhibición de la apoptosis se puede llevar a cabo cuando el virus tiene genes homólogos a bcl-2, debido a que puede generar inhibición de la cascada de las caspasas o inhibición de Fas/TNF. El mecanismo específico por el cual los HPVs inhiben la apoptosis aún no esta

claro³⁹.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Entre los factores celulares que controlan este proceso se destacan los miembros de la familia bcl-2. Esta familia contiene dos grupos de genes, los apoptóticos (bax, bcl-Xs, bak, bad) y los antiapoptóticos (bcl-2, bcl-XL, bag-1, mcl-1). Las proteínas interaccionan unas con otras, por ejemplo, cuando un exceso de bax desplaza a bcl-2, de forma que predominan los dímeros bax-bax en lugar de los bax-bcl-2, la consecuencia es la activación de la apoptosis. Por el contrario, si existe una sobreexpresión de bcl-2, entonces predomina el dímero bax-bcl-2, lo que inhibe la apoptosis independientemente de los estímulos externos⁴⁰. Existen otras proteínas fuera de esta familia, que participan tanto como induc-

toras de la proliferación celular como inductoras de la apoptosis, entre éstas están las ya mencionadas P53 y PRB, además de myc y ras. Finalmente, es importante destacar el sistema de proteínas caspasas, que son tanto iniciadoras como efectoras del proceso de apoptosis. Estas son proenzimas con actividad proteolítica, muy bien reguladas, que cuando son activadas, matan a la célula inhibiendo las proteínas anti-apoptóticas⁴¹.

1.2.6. Oncogenicidad y desregulación del ciclo celular por E6 y E7.

Una vez que la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de los HPVs de alto riesgo queda fuera de control, éstas despliegan una habilidad clara para perturbar la regulación normal del crecimiento celular. Para el HPV, la oncogenicidad evidentemente no es una parte normal de su ciclo de vida, ya que eventualmente mata al hospedero. Los HPVs son capaces de inducir síntesis de DNA celular, lo cual evidencia su dependencia de la maquinaria celular del hospedero. La función de esas oncoproteínas virales durante una in-

fección productiva es asegurar la replicación del virus en las células que han llegado a una diferenciación terminal. Para ello, tienen medios para evitar los puntos de revisión del DNA dañado. Por todo ésto, la activación o inactivación de los genes celulares adicionales requeridos para la invasión y metástasis puede no ser una consecuencia directa de las oncoproteínas E6 y E7, sino fenómenos separados en la cadena de transformación celular^{42,43}.

1.3. LA IMPORTANCIA DE LOS CAMBIOS EN EL PERFIL DE EXPRESIÓN EN EL DESARROLLO DE CÁNCER.

Todos los procesos llevados a cabo dentro de la célula son controlados en última instancia por instrucciones del material genético, el que a su vez responde a estímulos ambientales. Todas las condiciones celulares pueden ser reflejadas en el perfil de expresión de una célula en un momento dado. El perfil de expresión varía de acuerdo a las necesidades celulares para adaptarse a una determinada situación. Las diferencias básicas entre una célula normal y una célula cancerosa son conocidas desde hace mucho tiempo, siendo éstas la capacidad de crecer en cultivo, el número de divisiones que la célula puede llevar a cabo, el requerimiento de factores de crecimiento y la interacción de las células con su ambiente. Sin embargo, los cambios a nivel de perfil de expresión que hacen posibles estas diferencias no están descritos de manera integral y detallada⁴⁴. Como todo proceso, estos cambios deben comenzar de manera sutil, con solo unos cuantos genes primordiales alterados en su perfil de expresión, de modo que un conocimiento en las diferencias de éste entre las células normales y cancerosas podría generar conocimiento suficiente para identificar marcadores tempranos que permitan precisar estos cambios en sus inicios, para así poder tomar decisiones acertadas sobre el diagnóstico y tratamiento de determinada condición.⁴⁵

1.3.1. Estrategias de análisis de perfil de expresión.

Los primeros análisis para evaluar la expresión de un gen fueron llevados a cabo mediante técnicas de hibridación con sondas de ácidos nucleicos marcadas con fluorescencia o radiactividad, para identificar genes expresados y diferencias en los niveles de

expresión de éstos. Tiempo después se implementaron las tecnologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cuales además de permitir analizar un gen, podían utilizarse para la síntesis *in vitro* de éste. Sin embargo, ambas técnicas solo permiten el estudio de uno o un grupo de genes relacionados y difícilmente se puede analizar un perfil de expresión completo, donde se involucran cientos o miles de genes expresados diferencialmente.

Una variante de la PCR, es la tecnología de despliegue diferencial del RNA que permite comparar dos condiciones celulares en un solo experimento. Otras metodologías para estudiar los perfiles de expresión son secuenciación de bancos de DNA complementario (DNAc), hibridación sustractiva, y análisis serial de la expresión genética (SAGE). Actualmente se cuenta con metodologías más eficientes para detectar y cuantificar la expresión de varios miles de genes en un solo experimento.

La técnica más reciente para la cuantificación de un gen o un grupo de genes, es la amplificación por PCR en tiempo real (qPCR). Esta es en principio, igual que la amplificación por PCR común, solo que además de emplear los iniciadores tradicionales, adicionalmente utiliza una sonda que se une específicamente a la región blanco a amplificar, y es diseñada de tal manera que cada vez que la DNA polimerasa lleva a cabo el proceso de extensión, destruye a esta sonda. La sonda está marcada con un colorante fluorescente (F) y con un “apagador” de la fluorescencia (Q de “quencher”), cada uno colocado en un extremo de ella; el apagador absorbe la señal del colorante fluorescente cuando la sonda está intacta, pero cuando la sonda es destruida por la polimerasa, el fluoróforo y el apagador se separan, generándose una señal cada vez que una nueva copia de la secuencia

blanco es fabricada. La señal emitida es detectada por el instrumento y registrada en la computadora. De este modo, se lleva una cuenta en tiempo real del número de copias que se van generando. Esta estrategia se ha convertido en una herramienta muy útil en la cuantificación de la expresión de genes, con el inconveniente mismo de las otras metodologías descritas, la de analizar a un gen a la vez en cada ensayo.

1.3.2. El desarrollo de la tecnología de microarreglos para el análisis de la expresión genética.

El antecedente directo para el análisis de un gran número de genes (perfil de expresión) mediante arreglos de estos, viene de la década de los 80s con Leonard Augenlicht, quien se enfocó en demostrar que había un cambio sutil pero significativo en los niveles de expresión de los genes de células cancerosas. Su experimento consistió en tomar 400 colonias de bacterias de una biblioteca de DNAC, a partir de las cuales extrajo DNA y lo acomodó en arreglos definidos en una membrana. Con este arreglo de genes, midió el nivel de expresión en diferentes muestras celulares, marcando los DNACs de estas muestras con radioactividad⁴⁶. Con esto logró comparar los niveles de expresión de cientos de genes en un solo experimento y verificar las diferencias que éstos presentaban en células normales y en células de cáncer. En estudios posteriores de cáncer de colon, éste investigador demostró que un 3% de los genes estudiados disminuyeron su expresión a una tercera parte o menos y 5% de los genes ensayados mostraron un aumento tres veces superior en las células de cáncer, con respecto a las células normales de colon. En este estudio se detectaron cambios en los patrones de expresión en cada etapa del desarrollo del cáncer de colon y además que las células intestinales provenientes de pacientes con una forma heredada particular de cáncer de colon tuvieron patrones de expresión genética dife-

rentes. Sin embargo, todos estos hallazgos no causaron mucha impresión, porque los revisores argumentaron que las membranas contenían genes no identificados, y de los pocos que se conocía la secuencia, no se conocía su función. Además eran parte de cientos o miles de genes cuya expresión cambiaba y las manchas obtenidas por la señal de radiactividad no eran claras para definir con certeza el grado del cambio de expresión. El artículo fue rechazado en revistas de alto impacto y finalmente fue publicado en *Cancer Research*. Aún publicado, el informe recibió escasa atención y el Instituto Nacional de Salud (NIH) rechazó una aplicación en busca de fondos para desarrollar el sistema⁴³.

Aunque no en forma exacta, básicamente los microarreglos se han considerado como una extensión de las metodologías de hibridación tipo Northern (que rutinariamente se han empleado para el análisis diferencial de expresión de genes). Solo que los microarreglos permiten el análisis de la expresión de varios miles de genes en un solo experimento apoyándose en la competencia entre dos tipos de sondas. En los análisis de Nort-

hern, la sonda está en la solución de hibridación, mientras que en las técnicas de microarreglos las sondas son las que están fijadas a un soporte sólido, y el material genético a hibridar es la mezcla de los DNAs de los dos sistemas a comparar. El desarrollo comercial de los microarreglos solo pudo lograrse de modo práctico, por los avances en el campo de la robótica y en las técnicas de fotolitografía para dirigir la síntesis de bibliotecas combinatorias aplicadas a la biología molecular. Los microarreglos de ácidos nucleicos funcionan mediante hibridación de RNA o DNAc (en solución y marcado), a sondas de DNA unidas a una superficie, en una localización específica. La relación de la señal obtenida a partir de la hibridación a gran escala competitiva, proporciona una medida del nivel de expresión de un gen dado en una condición determinada, por lo que esta tecnología

es especialmente útil para el estudio de enfermedades complejas como el cáncer, como ya lo había demostrado Augenlicht. El primer reporte de un estudio utilizando microarreglos fue hecho en diciembre de 1996 por Lockhart D. J y cols⁴⁷. Actualmente la tecnología de microarreglos es ofrecida por varias casas comerciales y se basa en distintas estrategias, como tener DNAs completos en los soportes sólidos o también representaciones de los genes con sondas de 20 hasta 40 nucleótidos. Los métodos de marcaje son mediante la incorporación de nucleótidos marcados con compuestos fluorescentes y también se dispone de una variada selección de aparatos para detectar y cuantificar las señales fluorescentes.

1.3.3. Estudios del transcriptoma.

Ahora con el acceso a la secuencia de miles de genes o secuencias expresadas marcadas (ESTs), una de las más importantes aplicaciones para los microarreglos es el monitoreo de la expresión genética (abundancia del RNAm)⁴⁸. La colección de genes que son expresados o transcritos a partir de DNA genómico, referido como el perfil de expresión o transcriptoma, es un determinante del fenotipo celular y la función. La transcripción del DNA genómico para producir RNAm, es el primer paso en el proceso de la síntesis de proteínas y las diferencias en la expresión de genes son las responsables tanto de los cambios morfológicos y fenotípicos, así como de ser indicadores de las respuestas celulares a estimulaciones y perturbaciones ambientales⁴⁹.

En términos de entendimiento de la función de los genes, el saber cuándo, dónde y cual gen es expresado y en qué cantidad, es central para entender la actividad y el papel

biológico de la proteína codificada, así como las relaciones entre los productos génicos de dos organismos que interactúan, como en el caso de las células cervicales y el HPV, en el desarrollo de CaCU.

1.3.4. Estudios del transcriptoma del CaCU.

Los estudios sobre perfiles de expresión utilizando microarreglos en CaCU se han enfocado principalmente a dos aspectos: i) identificar genes diferencialmente expresados entre el CaCU y el tejido cervical normal; así como en ii) establecer parámetros de clasificación de los estadios de progresión del cáncer. Otro enfoque que se les ha dado a los estudios del transcriptoma del CaCU ha sido para determinar la susceptibilidad o resistencia a la radioterapia con base al nivel de expresión de algunos genes celulares. Los antecedentes reportados son los siguientes.

En cuanto a los estudios para identificar genes diferencialmente expresados está el estudio de Nees y cols., en 2001 donde utilizaron microarreglos de DNAC para examinar las alteraciones globales en la expresión en queratinocitos en diferenciación, después de ser infectados con retrovirus a los que se les habían insertado los genes que codifican para las proteínas E6 y E7 de HPV16. La expresión de 80 genes celulares (4% aproximadamente) fue reproduciblemente alterada por E6 y/o E7. El análisis por agrupamiento clasificó esos genes en tres grupos funcionales: 1) genes de respuesta a interferón, 2) genes estimulados por NF-kappaB y 3) genes regulados en la progresión del ciclo celular y síntesis de DNA. Se encontró que E6 reduce la expresión de IFN-alfa y beta, subregula la proteína STAT-1 y reduce la unión de STAT-1 al elemento de respuesta estimulado por

IFN. Por otro lado E7 por si solo fue menos efectivo, sin embargo, la coexpresión de E6 y E7 subreguló los genes de respuesta a IFN más eficientemente que E6 solo. E6 potenció la expresión de componentes celulares de la ruta de señalamiento NF-kappaB, incluyendo a p50, NIK y la proteína de interacción a TRAF. E6 también incrementó la secreción de IL-8, RANTES, la proteína 1 alfa macrófago inflamatoria y la proteína 10 kappaDa inducible por IFN gamma en los queratinocitos en diferenciación.⁵⁰

Cheng y cols., en 2002 utilizaron RT-PCR, despliegue diferencial y microarreglos de DNAC para identificar genes celulares involucrados en la carcinogénesis de carcinoma cervical de células escamosas. Se estudiaron 38 pacientes en varias etapas de la enfermedad y 5 pacientes sin CaCU. De particular interés fueron las clonas G32C4B y G3CC que se identificaron como el gen de la NADH deshidrogenasa 4 y el gen de la proteína ribosomal S12 que se encontraron sobre expresadas en el cáncer. Los autores indican que estos genes pudieran ser potencialmente útiles como marcadores de diagnóstico pretransformación de CaCU humano.⁵¹

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por otro lado Ruutu y cols., en 2002 estudiaron la carcinogénesis cervical inducida utilizando una línea celular HPV33 positiva (UT-DEC-1) establecida a partir de una displasia vaginal de bajo grado. Para determinar la importancia de la integración del HPV, compararon el nivel de expresión en queratinocitos de vagina normal, en pasaje temprano y en pasaje tardío de las células UT-DEC-1 utilizando microarreglos de DNAC. El RNA fue extraído mediante gradiente de centrifugación con CsCl, sometido a RT con MMLV RT y marcado con ⁽³²⁾P-αATP. Los 16 genes sobre-regulados, identificados al comparar ambos tipos celulares con los queratinocitos normales, al parecer están involucrados con

la progresión del ciclo celular α en la mitosis. Estos incluyen al factor de replicación de DNA mcm4, cdcp34 y el factor de ensamble de la cromatina 1 subunidad p48. Los genes subregulados (44 en total) interfieren con la apoptosis y la adhesión celular, incluyendo los genes inductores de apoptosis *frap*, *bik* y el precursor de caspasa-9. Las diferencias más significativas entre los pasajes tempranos y tardíos fueron la sobreexpresión de los factores E2F5 con su compañero de dimerización DP1. NF-kappa B y las serin/treonin cinasas y la subexpresión de las enzimas de la ruta de MAPK. Con estos datos, la adquisición de una ventaja de crecimiento selectivo después de la integración viral podía ser explicada por un cambio considerable en la ruta de MAPK en la desregulación del ciclo celular.⁵²

También Berger y cols., en 2002 utilizaron microarreglos de DNAc y qPCR para comparar la expresión de genes celulares en epitelio cervical a diferentes tiempos de exposición a transducción retroviral con los genes E6/E7 de virus de bajo riesgo y alto riesgo. En los pasajes tempranos, las células transducidas con los genes E6/E7 del alto riesgo demostraron una expresión incrementada de los genes reguladores del ciclo celular CDC2 y el acarreador de ubiquitina E2-C. En los pasajes tardíos, las mismas células exhibieron incrementos dramáticos en el IGFBP-3, así como en la proteína intracelular y en la secretada, con incrementos de aproximadamente 85 veces. Estos resultados indican que la sobreexpresión de IGFBP-3 es un evento tardío después de la expresión E6/E7, fenómeno que también se ha observado *in vivo*.⁵³

En otro estudio, el de Alazawi y cols. en 2002 se utilizaron microarreglos para investigar el efecto de la integración del HPV16 en la expresión genética de queratinocitos

cervicales, utilizando la línea celular W12. Esta línea fue generada a partir de una lesión cervical intraepitelial escamosa de bajo grado, infectada de manera natural con HPV16 y que contiene aproximadamente 100 episomas de HPV16 por célula. Con el arreglo de Affymetrix U95A que contiene sondas para 12600 transcritos humanos, se identificaron 85 genes a partir de un rango de rutas celulares que muestran cambios en la expresión después de la integración del HPV16. Interesantemente, la integración está asociada con la sobreexpresión de numerosos genes que responden a IFN. Estos genes incluyen a p48, un componente del regulador primario de la respuesta a IFN, y al gen del factor estimulador de IFN3.⁵⁴

Finalmente, está el reporte de Lee y cols., en 2004 que realizaron un estudio para identificar los genes y proteínas modulados por el oncogen HPV E7. Se utilizó la línea C33A para generar una línea estable que exprese E7. Utilizaron espectrometría de masas MALDI-TOF y microarreglos. Detectaron 47 puntos diferenciales mediante electroforesis

bidimensional. Las proteínas disulfuro isomerasa A3, proteína de interacción a integrasa 1, proteína inhibidora de crecimiento, la glutation S-transferasa P y el protooncogen *vav* se encontraron subreguladas. También la proteína de shock térmico 60 kDa 1, la proteína de unión Ku70, la alfa enolasa y la subunidad 26S del proteasoma estaban sobre-reguladas. A nivel de transcripción, con el estudio de microarreglos se encontró que IL-12R beta, el citocromo C y el receptor II del factor de necrosis tumoral fueron inducidos por el oncogen E7. Estos resultados sugieren que E7 puede evadir la vigilancia inmunitaria suprimiendo o induciendo esos factores de señalamiento, reguladores del ciclo celular y chaperonas.⁵⁵

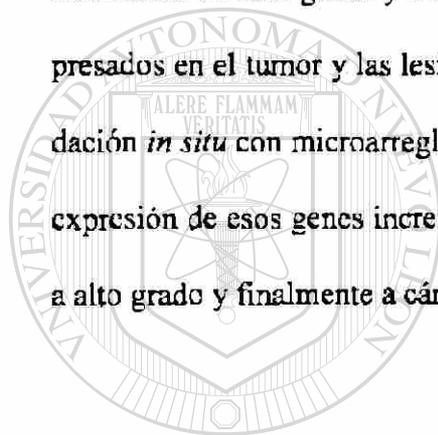
En cuanto a los estudios para clasificar tumores con base a su estadio en la progresión o a su sensibilidad a radiación, tenemos el estudio de Achary y cols. del 2000 quienes buscaron genes que pudieran identificar a los tumores que son radiosensibles. En un arreglo de 5776 genes y ESTs conocidos, la expresión de 53 genes se encontró elevada (con un máximo de 4.1 veces) en las células radioresistentes en comparación con las células radiosensibles. Diez de estas secuencias son genes conocidos, mientras que los otros 42 son ESTs. La expresión de 18 genes fue elevada en células sensibles en comparación con células radioresistentes, siete de los cuales son genes conocidos y los otros 11 son EST. Los genes que mostraron mayor sobre-expresión en las células radioresistentes fueron el factor de transcripción 1 metal regulador, el citocromo p450 CYP1B1, adenomatosis polyposis coli, el factor de enlogación de traducción 1, el citocromo-c oxidasa. Mientras que en la línea de células radiosensibles, se encuentra la transcripción del factor NF-kappa-B, el precursor de inhibidor de metaloproteínasa 1, la superóxido dismutasa-2, la proteína de unión parecida a la insulina 3, la proteína de unión a guanina y la proteína inducida por el factor transformante de crecimiento beta.⁵⁶

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por otro lado, Wong YF y cols., en 2003 examinaron los perfiles de expresión del CaCU comparado con tejido cervical normal en microarreglos de DNA que contenían aproximadamente 11000 puntos, y que correspondían a genes humanos con función conocida o a ESTs. El objetivo era hacer una clasificación de los tejidos en base a su nivel de expresión. Los resultados mostraron que los tejidos cervicales normales fueron completamente segregados de las muestras de cáncer utilizando aproximadamente 40 genes con expresión significativamente diferente. Los tumores en estado IB y IIB también pudieron ser clasificados basados en sus perfiles de expresión. Más aún, algunas de las muestras de

tumor fueron estratificadas adicionalmente en dos grupos principales basándose en su respuesta a radioterapia.⁵⁷

Finalmente, Chen Y y cols., en 2003 utilizaron un arreglo de 30,000 clonas para examinar los perfiles de expresión de 34 tejidos cervicales a diferentes estadios clínicos definidos. Los perfiles globales separaron los tejidos cervicales normales de las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado y a la mayoría de las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y a los cánceres. Entre los 62 genes/EST que estaban sobreexpresados en el tumor y las lesiones de alto grado, 35 fueron confirmados utilizando hibridación *in situ* con microarreglos de tejido cervical. Y en general, se observó que la sobreexpresión de esos genes incrementó a medida que las lesiones progresaban de bajo grado a alto grado y finalmente a cáncer.⁵⁸



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4. JUSTIFICACIÓN

El CaCU es un grave problema de salud pública y es una enfermedad multifactorial fuertemente asociada a la presencia de un agente infeccioso, el HPV; específicamente los HPV de alto riesgo. El cáncer se ha distinguido por ser en una sola patología, un conjunto de enfermedades complejas, tanto por el efecto que tiene el medio ambiente sobre su desarrollo, como por los mecanismos celulares que están involucrados en su generación y progresión. Específicamente en el caso del CaCU, la participación del HPV complica aún más la comprensión de la enfermedad. A pesar de que se han abordado diferentes aspectos en el análisis del perfil de expresión en el CaCU, es necesario conocer qué rutas están alteradas, así como el considerar el comportamiento de la expresión global de los genes celulares y virales (en un mismo sistema), pero en diferentes ambientes. En este trabajo se realizó la comparación de tres sistemas de CaCU, donde se observó el cambio en los perfiles de expresión de líneas celulares infectadas con HPV-16, con HPV-18 y sin infección, y se analizó la expresión de genes celulares y de genes virales con la finalidad de definir rutas metabólicas alteradas, afectadas principalmente por el efecto de las oncoproteínas virales.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar el perfil de expresión viral y celular en líneas celulares de CaCU y compararlo con el perfil de expresión de células de cérvix normal, para determinar y seleccionar aquellos genes con la variación de la expresión global (mayor o menor) mas marcada.

2.2. Objetivos específicos.

1. Obtener el RNA y el DNA de tejido cervical normal y de las líneas celulares de CaCU.
2. Analizar el perfil de expresión de los genes del HPV-16 mediante RT-PCR[®] en tiempo real.
3. Aplicar la técnica de microarreglos para el análisis del perfil de expresión celular.
4. Seleccionar genes con expresión diferencial (sub o sobre expresados) y validar los resultados mediante análisis por RT-PCR.
5. Realizar el análisis global de los resultados y elaborar las conclusiones

2.3. ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO

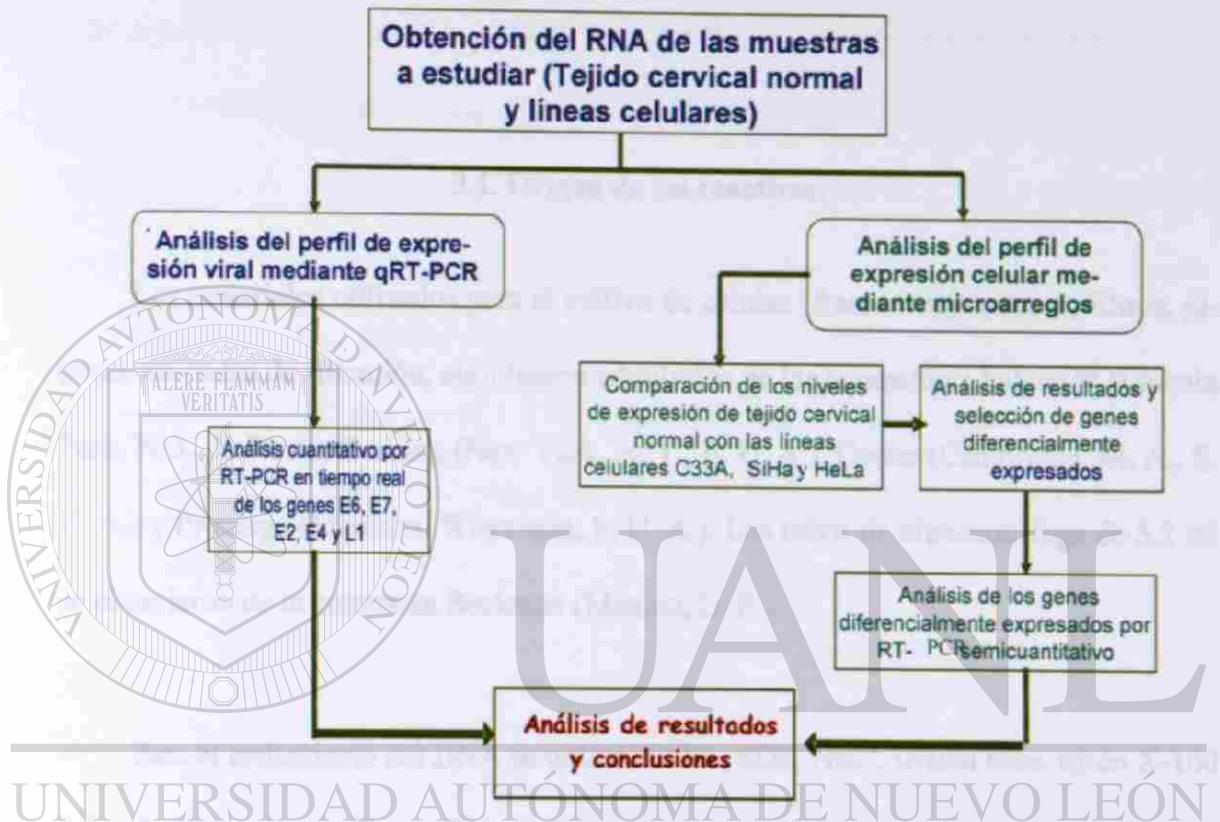


Figura 5. Esquema general del desarrollo experimental. La estrategia consistió en la obtención de RNA de los tejidos a estudiar y líneas celulares y llevar a cabo estudios de expresión de los genes virales seleccionados y el estudio de expresión de los genes celulares mediante microarreglos, para luego, a partir de esos resultados, seleccionar un grupo de genes y corroborar su nivel de expresión por RT-PCR semicuantitativa.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Origen de los reactivos.

Los materiales utilizados para el cultivo de células (frascos, cajas, tubos, filtros, pipetas, unidades de filtración, etc.) fueron adquiridos de las compañías: Falcon™ (Lincoln Park, N. J., E. U. A.), Corning (New York, N. Y., E. U. A.), Costar (Cambridge, M. A., E. U. A.) y Promega (Madison, Wisconsin, E. U. A.). Los tubos de ultracentrifuga de 5.2 ml se obtuvieron de la compañía Beckman (México, D. F.).

Para el aislamiento del DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCl, trizma base, tritón X-100 y fenol, adquiridos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, M. O., E. U. A.), así como ácido clorhídrico, cloroformo, alcohol isoamílico, etanol y cloruro de cesio, de la compañía Merck (México, D. F.). En las reacciones de amplificación y de retrotranscripción se utilizaron las enzimas Taq DNA polimerasa y MMLV polimerasa, la solución amortiguadora de reacción, el cloruro de magnesio, los dNTP's, el RNAsin, DIT y BSA de la compañía Promega y el aceite mineral de Sigma Chemical Company. Para las electroforesis en geles de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio, de Sigma Chemical Company. La solución de lisis

para extracción de RNA y la solución de preservación de tejido para extracción de RNA se obtuvieron de la compañía Qiagen, (Valencia, CA, E. U. A).

Los reactivos para preparación de medios de cultivo, así como suero bovino fetal (SBF), y la tripsina, se adquirieron en Sigma Chemical Co., HyClone, Inc. (Logan, UT, E. U. A.), DIFCO-LABORATORIES (Detroit, MI, E. U. A.) y Gibco-BRL de BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E. U. A.) respectivamente. Los reactivos para elaborar las soluciones amortiguadoras, medio de cultivo, geles de agarosa se obtuvieron de: Sigma Chemical, Co., Merck, y Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, E. U. A.). Los reactivos para el marcaje de los RNAs y la hibridación de los microarreglos, así como los arreglos de genes PanHuman Cancer Array se obtuvieron de la compañía MWG Biotech (Ebersberg, Alemania).

3.2. Equipo.

Se utilizó un horno de microondas Goldstar modelo MA-857M, Microcentrifugas[®] Eppendorf modelos 5402 y 5415 (Camibh Göttingen, Alemania), ultracentrifuga Beckman modelo TLX120, un termociclador de la compañía MJ Research Inc (San Francisco, CA, E. U. A.) modelo PT100, una fuente de poder Gibco BRI., modelo 250, una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas, City, MO, E. U. A.), una campana para PCR CBS Scientific Inc modelo P-036-02 (Los Angeles, CA, E. U. A.), una balanza digital Sartorius modelo 1206 MP (Camibh, Göttingen, Alemania), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), micropipetas de Pipetman Gilson de Raining Instruments CO, Inc. (Emeryville, CA, E. U. A.), un agitador G10 marca New

Bussines Scientific CO., Inc. (Edison, MI, EUA), jeringas y agujas Becton Dickinson (Juiz de la Fiora, MG, Brasil), un potenciómetro Beckman O320, y un microscopio invertido Karl Zeiss (México, D. F.).

Para los experimentos en tiempo real se utilizó el termociclador ABI Prism 7000 de la compañía Applied Biosystems (México, D. F.). Para los experimentos de microarreglos se utilizó el escáner Axon 4000 de la compañía Axon Instruments Inc (Los Angeles CA, EUA) y para la cuantificación de los ácidos nucleicos se utilizó el bio-Photometer de Eppendorf.

El procesamiento de los datos se realizó en computadoras marca Power PC marca Compaq, Presario, MV500 y una Laptop Compaq Presario 1200. Se empleó el procesador de textos Microsoft Word versión XP, procesadores de gráficos Microsoft Power Point versión XP, y procesador de hojas de datos Microsoft Excel versión XP, Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1 (1989-1993 Adobe Systems Inc.) y el programa de fotodocumentación Molecular Analyst versión 1.5 de BioRad Laboratories (San Diego CA, E. U. A.).

Para los análisis relacionados a la Biología Molecular se usó el programa DNA Strider TM 1.1 (Ch. Marck y CEA, 1989, Service de Biochimie-Départament de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-Francia), Amplify versión 1.2b (Hill Engels 1992, University of Wisconsin Genetics M, (Madison, WI, E. U. A), Oligo versión 4.0 (Plymouth, MN, E. U. A.). Para la búsqueda de información se recurrió al internet en las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y sitios del NCBI

como el programa Blast y la base de datos OMIM, GENATLAS (<http://www.geneatlas.org/gene/main.jsp>), ATLAS (<http://www.infobiogen.fr/services/chronocancer/>), el Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>), y GENECARDS (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/>).

3.3. Metodología.

3.3.1. Recolección y almacenamiento de las muestras.

Mediante el apoyo del Dr. Oscar Vidal Gutiérrez, del Servicio de Ginecología del Hospital Universitario. Se colectaron 26 biopsias de tejido cervical normal (ICN), de pacientes sometidas a cirugía cervical por causas diferentes a CaCU. Las biopsias tenían pesos que variaban entre 10 y 40 mg, las cuales al ser obtenidas del paciente se sumergieron en 10 volúmenes de conservador de RNA (aproximadamente 1 ml Qiagen RNA Lateral®) para su transporte hasta el laboratorio. Inmediatamente se llevaron a 4°C y para conservación a largo plazo se mantuvieron a -70°C.

Las líneas celulares HeLa, Caski, C33A y SiHa se usaron como modelo de CaCU, ya que HeLa contiene integrado el virus HPV-18, SiHa y Casky presentan el virus HPV-16 y C33A es HPV negativa. Las líneas celulares se obtuvieron y cultivaron en el laboratorio de Biología Celular de la ULIFG, en medio DMEM con 10% de suero bovino fetal (SBF) en una atmósfera al 5% de CO₂. Las células se mantenían hasta llegar al 80% de confluencia, en este punto se lizaron para obtener el RNA total. Con este material bioló-

gico se generaron los sistemas de comparación de expresión para los genes virales (Hela, SiHa y Caski) y para los genes celulares (SiHa/TCN, HeLa/TCN y C33A/TCN) para observar el comportamiento de la expresión de un tejido canceroso en presencia del HPV-16, del HPV-18 y en ausencia de virus.

3.3.2. Extracción del DNA.

Para la extracción del DNA de las líneas celulares, éstas se recuperaron con tripsina y se resuspendieron en 50 μ l de PBS. Las células luego se trataron con proteinasa K (10 mg/ml) agregando 20 μ l de esta solución a la muestra (20 mg) y posteriormente se incubaron por 30 min a 55°C. La lisis se llevó a cabo mediante la adición TSNT (Tritón 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM y Tris-HCl 10 mM). La extracción del DNA se hizo mediante separación de fases con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, siguiendo el procedimiento estándar de extracción de acuerdo a Sambrook 1988⁵⁹.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo en un Bio-Photometer[®], e acuerdo con las instrucciones del instrumento. El aparato tiene ya funciones preprogramadas para cuantificar directamente ácidos nucleicos y proteínas. Para hacer las cuantificaciones se realizó una dilución 1:20 (50 μ l de la muestra y 950 μ l agua) y se colocó en una celda. La celda se colocó en el porta celda del aparato y se llevó a cabo la medición directa. El resultado se reporta en mg / ml.

3.3.3. Extracción del RNA.

Para la extracción del RNA se probaron varias metodologías con la finalidad de determinar cual de éstas permitía la obtención de RNA de mejor calidad, en mayor concentración y libre de DNA.

Inicialmente se utilizó el reactivo comercial Trizol. En este protocolo, a 1ml de lisado celular se le agregaron 0.9 ml de Trizol y 0.1 ml de Sevag. Se mezcló en vortex y se incubó durante 15 min. en hielo. Posteriormente se centrifugó a 2,500 r.p.m y el sobrenadante se recuperó en un tubo limpio para realizar la extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol.

El otro método que se utilizó fue el de Qiagen, que es un método de separación del RNA mediante columnas de sílica. El estuche contiene todos los reactivos necesarios para la lisis celular. Una vez obtenido el lisado, éste se transfiere a la columna y se centrifuga para retener en ella el RNA y eliminar el resto de líquido y componentes celulares. El RNA se recupera de la columna con una siguiente solución de "elución". El RNA obtenido esta listo para su uso.

Se probó también el método de ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio, de acuerdo con las instrucciones del Sambrook 1988⁵⁶. En este método, el tejido se maceró y se homogenizó en solución D (isoticianato de guanidina 4 M, 25 mM de citrato

de sodio pH 7, 0.1 M de 2-ME y 0.5% (p/v) de N-laurilsarcosin) o en la solución de lisis del kit RNAeasy[®] de Qiagen, y el lisado total se colocó en un tubo de ultracentrifuga con agua destilada y cloruro de cesio (1 gr/ml) y 20 µl de bromuro de etidio (2 mg/ml). El tubo se sella y se lleva a ultracentrifugación a 96,000 RPM durante 12 h. Después de la ultracentrifugación la banda de DNA queda suspendida a la mitad del tubo y el RNA total queda como un paquete precipitado en el fondo del tubo. Este precipitado se extrae mediante una jeringa con una aguja calibre 20. El paquete es lavado tres veces con etanol al 70% frío en agua DEPC (diethylpirocarbonato) para eliminar el exceso de cloruro de cesio y de bromuro de etidio, luego se deja secar 30 min a temperatura ambiente. El RNA seco se disolvió en agua DEPC mediante calentamiento durante 5 min a 55°C. El RNA se guarda a -20°C o a -70°C para conservación a largo plazo.

3.4. Cuantificación del DNA y RNA obtenidos.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo en un Bio-Photometer[®] de acuerdo con las instrucciones del instrumento. El aparato tiene ya funciones preprogramadas para cuantificar directamente ácidos nucleicos y proteínas. Para hacer las cuantificaciones se tomó una alícuota de 50 µl de la muestra, se colocó en una celda y se llevó a cabo la medición. El resultado se reportó en mg / ml.

3.5. Análisis de los genes virales.

3.5.1. Análisis de las secuencias y diseño de sondas.

Los genes seleccionados para el análisis del número de copias, expresión y actividad fueron E6, E7, E4, L1 y E2. Los iniciadores y las sondas se mandaron a sintetizar por el servicio "Assay by design" proveído por Applied Biosystems de México. Para ello, se seleccionaron del Gene Bank las secuencias de interés y los sitios específicos donde se deseaba ubicar la sonda para llevar a cabo la detección (denominadas: coordenadas). En el diseño de éstas se procuró seleccionar aquellas regiones altamente específicas para cada uno de los genes. Las coordenadas indicadas para cada secuencia fueron: E6 (NC_001526.1) coordenada 531, E7 (NC_001526.1) coordenada 150, E4 (NC_001526.1) coordenada 150, L1 (NC_001526.1) coordenada 770 y E2 (NC_001526.1) coordenada 652. Las sondas y los iniciadores fueron diseñados por el fabricante con base en esas coordenadas.

3.5.2. Obtención del DNAc de los genes virales.

Las muestras para medir la expresión de los genes virales por qPCR fueron el producto directo de una reacción de RT de los RNAs de cada línea celular (SiHa, CasKi y HeLa). No se utilizó el tejido cervical normal ni la línea celular C33A ya que son negativas para HPV. Los reactivos para las reacciones de RT se mezclaron de cómo se indica en la tabla 1.

TABLA 1

CONDICIONES DE REACCIÓN PARA LA RT DE LOS GENES VIRALES

<i>Reactivos</i>	<i>Volúmen</i>
Buffer 5X (Invitrogen)	2.0 μ l
DNTP's 10 mM (Promega)	1.0 μ l
DTT (Invitrogen)	1.0 μ l
RNAsin (Promega)	0.5 μ l
BSA (Promega, dil 1:2)	0.4 μ l
Agua MiliQ	1.1 μ l
OligoDT (Promega)	1 μ l
RNA total (1 ug)	3 μ l
Volumen total	10 μ l

El programa en el termociclador PTC-100 MJ Research del laboratorio de Genética Molecular fue el que se muestra en la tabla 2.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TABLA 2

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONDICIONES DE INCUBACIÓN PARA LA REACCIÓN DE LA RT.

Paso	Condiciones	
1	25°C	15 min
2	42°C	60 min
3	72°C	15 min
4	Fin	

El producto de esta reacción (10 µl totales) se agregó a la mezcla para amplificación en tiempo real, simultáneamente con la curva de calibración para cada gen. Cada muestra se analizó por triplicado. Cada punto de la curva de calibración se amplificó por duplicado. Las muestras analizadas fueron DNAs obtenidos a partir de los RNAs de las líneas celulares C33A, SiHa y HeLa.

3.5.3. PCR cuantitativa de los genes virales.

3.5.3.1 Diseño de la curva de calibración.

La curva de calibración se construyó mediante diluciones (10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 copias) del plásmido pHPV16 que contenía todos los genes del virus HPV-16 (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2). Este plásmido fue proveído por el Dr. Gregory L. Shipley, director del Quantitative Genomics Core Laboratory, Department of Integrative Biology and Pharmacology de la University of Texas Medical School at Houston.

3.5.3.2. Montaje de la placa.

Las muestras (DNA ó DNAc) y la curva de calibración se colocaron en la placa de amplificación y se cargó y corrió el programa estándar para experimentos de “Assay by design” que ya viene precargado en el Termociclador de Tiempo Real de Applied biosystems ABI PRISM 7000. La distribución de las muestras en la placa se muestra en la figura 6.

pHPV16	pHPV16	pHPV16	pHPV16	pHPV16	pHPV16
10	100	1000	10000	100000	1000000
copias	copias	copias	copias	copias	copias
pHPV16	pHPV16	pHPV16	pHPV16	pHPV16	pHPV16
10	100	1000	10000	100000	1000000
copias	copias	copias	copias	copias	copias
DNAc	DNAc	DNAc	DNA	DNA	DNA
HeLa	SiHa	Caski	HeLa	SiHa	Caski
DNAc	DNAc	DNAc	DNA	DNA	DNA
HeLa	SiHa	Caski	HeLa	SiHa	Caski
DNAc	DNAc	DNAc	DNA	DNA	DNA
HeLa	SiHa	Caski	HeLa	SiHa	Caski
NTC	NTC	NTC	NEG	NEG	NEG

Figura 6. Distribución de las muestras en la placa para qPCR del sistema ABI PRISM 7000. Cada placa consta de 96 lugares, y solo puede utilizarse una vez, por lo que es necesario colocar todas las muestras que se desean cuantificar. La distribución de las muestras depende del analista, pero en general se coloca primero la curva de calibración y luego las muestras. Siempre se agregan controles que no tienen DNA, denominados NTC (non template control).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.5.3.3. Cuantificación del número de copias.

Para la cuantificación de número de copias de DNA de cada gen, se llevó a cabo una extracción de DNA de cada línea celular y de tejido cervical normal y se utilizaron 100 ng de cada muestra de DNA. Todas las muestras, las correspondientes a la curva de calibración, al DNAc y al DNA se colocaron en una misma placa de cuantificación, la cual tiene 96 lugares. De este modo, en una sola corrida se realizaron la curva de calibración, la cuantificación del DNAc y la cuantificación de cada uno de los genes del HPV-16 estudiados.

En este experimento, se determinó la cantidad de copias de DNA y de DNAC de cada gen, utilizando una curva de calibración generada por el plásmido pHPV-16, el cual contiene el genoma completo del HPV-16.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de la siguiente manera: se preparó una mezcla de reacción para cada una de las sondas de acuerdo con las instrucciones del fabricante como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3
CONDICIONES DE REACCIÓN PARA LA PCR CUANTITATIVA.

Reactivos	Volúmenes
Sonda e iniciadores	2.5 μ l
Agua MiliQ + Muestra	22.5 μ l
Master Mix (ABI)	25 μ l
Volumen final	50 μ l

La muestra era DNA o DNAC según el caso, en concentraciones adecuadas para cada experimento como se describe más adelante.

3.5.4. Análisis de resultados.

Los resultados se obtienen en número de copias detectadas de cada muestra con base en la curva de calibración. Se obtiene el número de copias de DNA de cada gen, del número de copias del DNAC de cada gen y con estos dos datos se puede determinar la

actividad de cada gen individual en cada línea celular, dividiendo la cantidad de copias de DNAs detectadas entre la cantidad de copias de DNA detectadas. Todos los resultados se grafican por gen, poniendo el número de copias en el eje "y", y las muestras de líneas celulares en el eje "x".

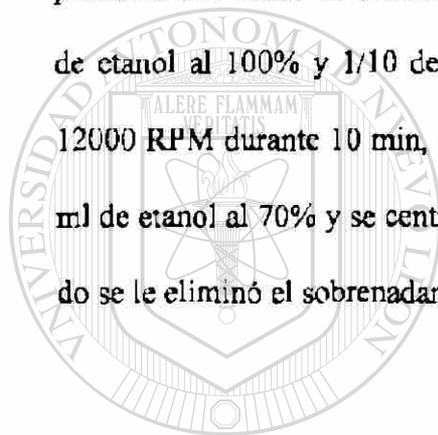
3.6 Análisis de los genes celulares

Los niveles de expresión de los genes celulares se determinaron mediante la técnica de microarreglos. Para esto, se generaron tres sistemas comparativos entre el tejido normal y la línea celular de cáncer.

En resumen la metodología consiste en lo siguiente: se realizó el marcaje de los RNAs mediante una reacción de RT, para finalmente obtener DNAs marcados. En cada sistema se marcó el tejido normal con el colorante Cy3 y la línea celular con el colorante Cy5. Después del marcaje, los DNAs se cuantificaron y se mezclaron en cantidades iguales. La mezcla de DNAs marcados se calentó a 65° C y posteriormente se colocó en hielo. A la mezcla se le agregó la solución de hibridación y toda la mezcla se colocó sobre la laminilla que contenía las sondas. Se cubrió el arreglo y se sometió a hibridación al menos 12 h. La laminilla se sacó de la hibridación y se realizaron lavados para eliminar el exceso de la sonda. Posteriormente la laminilla se procesó en el scanner y se obtuvieron los resultados.

3.6.1. Marcaje y síntesis de los DNAc.

Para la síntesis de DNAc marcado de cada muestra se utilizaron 30 µg de RNA total, llevando a cabo el marcaje mediante una reacción estándar de retrotranscripción agregando nucleótidos marcados con los colorantes fluorescentes Cy3 y Cy5 para la muestra problema y la muestra de referencia, respectivamente, como se muestra en la tabla 4. El producto resultante de la reacción se purificó mediante precipitación con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5 centrifugando a 12000 RPM durante 10 min, al precipitado se le eliminó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 12000 RPM durante 10 min. Al precipitado se le eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 10 µl de agua MiliQ y se cuantificó.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 4

CONDICIONES DE RT PARA MARCAJE DEL DNAc

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>	<i>Volumen</i>
	TCN	Línea celular
Agua MiliQ	17.5 µl	17.5 µl
Oligo d(T15,20)-Primer (1 µg/µl)	1 µl	1 µl
5x RT reaction buffer (superscript II kit, invitrogen)	8 µl	8 µl
dNTP master mix	4 µl	4 µl
1 mM Cy3-dCTP	0 µl	4 µl
1 mM Cy5-dCTP	4 µl	0 µl
0.1 M DTT (superscript II Kit, invitrogen)	4 µl	4 µl
Superscript II (200 U, Invitrogen)	1.5 µl	1.5 µl
RNA	30 µg (X µl)	30 µg (X µl)
Volumen total	50 µl	50 µl

3.6.2. Hibridación cuantitativa a gran escala.

Las hibridaciones se realizaron en parejas de una línea celular y tejido cervical normal como referencia, generando los siguientes sistemas de comparación de expresión: C33A/TCN, SiHa/TCN, HeLa/TCN.

Las placas de microarreglos fueron obtenidas de MWG Biotech, el arreglo de Pan Human Cancer Array que contiene 1921 genes relacionados con cáncer y 79 genes constitutivos como control interno. Los protocolos y reactivos necesarios para llevar a cabo estos experimentos fueron proporcionados por el proveedor.

Cantidades iguales (15 a 20 μg) de éste DNAC marcado fueron colocadas en contacto con la solución de hibridación (MWG Biotech) que se colocó sobre el arreglo de genes Pan Human Cancer array de MWG Biotech. La laminilla se colocó en una cámara húmeda de hibridación por 24 h a 42°C. Concluida la hibridación se realizaron tres lavados, uno en buffer 2x SSC, 0.1% SDS por 5 min a temperatura ambiente, luego en buffer SSC 1x por 5 min a temperatura ambiente y finalmente en buffer SSC 0.5 x por 3 a 5 min a temperatura ambiente, para eliminar la señal no válida y el ruido de fondo. El portaobjetos se secó en un tubo cónico de 50 ml por centrifugación a temperatura ambiente por 2 min a 500 RPM.

3.6.3. Lectura con el escaner y obtención de la imagen.

La lectura e interpretación de los resultados se llevó a cabo en un escáner Axon Gene Pix 4000, mediante el software Jaguar Array análisis. El programa permite convertir la intensidad y tipo de color detectado en el arreglo a valores numéricos, así como la determinación del ruido de fondo.

3.6.4. Procesamiento de los datos: Normalización, transformación y selección de genes

El análisis de los perfiles de expresión se llevó a cabo con el programa Microsoft Excel XP. Este análisis incluyó sustracción del fondo, un proceso de normalización, el cual se llevó a cabo mediante un factor de normalización obtenido por la ecuación: $(n - \text{señal de fondo} / \sum n)$ y transformación a \log_2 de cada dato obtenido. Solo los genes con una diferencia de 2.5 o más en su nivel de expresión fueron tomados en cuenta. Con base a este criterio se seleccionaron los genes con una diferencia en la expresión más marcada en los tres sistemas antes mencionados. Después del análisis informático, de cada sistema se seleccionaron los 6 genes con una mayor diferencia en los niveles de sobreexpresión o subexpresión.

3.7 Validación de los genes seleccionados por RT-PCR semicuantitativa

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.7.1. Selección de secuencias y diseño de iniciadores.

Para cada gen, se obtuvo su secuencia del GenBank y se diseñaron los iniciadores correspondientes. En la tabla 5 y 6 se muestran los resultados.

TABLA 5
GENES SELECCIONADOS Y NÚMERO DE ACCESO A SECUENCIAS
DEL GEN BANK

Gen	No. de acceso Gen Bank
Six-1	NM_005982
Rab3d	NM_004283
Dcc1	NM_005215
Mdm2c	NM_006880
Hla-e	NM_005516
Ptgs2	NM_000963
Brip1	NM_032043
Pah	NM_000277
Rab27b	NM_004163
Emk1	NM_017490
Ppp4c	NM_002720
Stat5b	NM_012448
Rab23	NM_016277
Frap1	NM_004958

TABLA 6

SECUENCIA DE LOS INCIADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES SELECCIONADOS

Six1		Rab3d	
Six1-1 5'	CTGGAGAGCCACCAGTTCCTC	Rab3d-1 5'	CTTCCTCAGTACTGTGGGCA
Six1-2 3'	CACCTAGGACCCCAAGTCCA	Rab3d-2 3'	GTTGACAUGAAGGGAAGGGAT
Dcc1		Brip1	
dcc-1 5'	GAGATGGAAACACTGGAGCC	Brip1-1 5'	GCATACAGGGCTTAAACCA
dcc-2 3'	GTGTTGGTTTGAGGCCCTGT	Brip1-2 3'	CAGGTGTTCCTTCGGTATT
dccABC-1 5'	AGATGTGGTCCCTGTCTTGG	BripABC-1 5'	GGTTTGCTCGGGATGAACTA
dccABC-2 3'	GGTTGTTGGCTCCAGTGT	BripABC-2 3'	CAATGGTACCAACCCAAACC
Mdm2c		Hla-c	
Mdm2c-1 5'	CAGCTTCGGAACAAGAGACC	Hla-c-1 5'	GATTTCCGAGTGAACCTGC
Mdm2c-2 3'	GGCCAAACTAGATCCACACTC	Hla-c-2 3'	CCTCCAATACAGCAGCAA
Ptgs2		Pah	
Ptgs2-1 5'	CACTTCTTTGGACTCTGCC	Pah-1 5'	ATGGGGCACAGTGTTCAG
Ptgs2-2 3'	GTCTTATGGCACATTCAGCC	Pah-2 3'	CAATCCTTTGGGTGTATGGG
Rab27b		Erk1	
Rab27b-1 5'	GGTGGGGAAGACAACATTC	Erk1-1 5'	CAAGCTGGACACCTTCTGTG
Rab27b-2 3'	CCATGTGCGTGGTTTACTC	Erk1-2 3'	CTCAGGCCCTTATTTTCTG
Ppp4c		Frap1	
Ppp4c-1 5'	CAAGGAGAGCGAAGTCAAGG	Frap1-1 5'	CCAGCAGGATATCAAGGAGC
Ppp4c-2 3'	TGAGCACCGTCTCATTGAAG	Frap1-2 3'	ATCCCACTGTGCTCCAACTC
Stat5b		Rab23	
Stat5b-1 5'	GTTGGTGGAAATGACCTGGT	Rab23-1 5'	GGAAGATATGGAAGTCCCCA
Stat5b-2 3'	TGCCTGATCTGTGGCTTCAC	Rab23-2 3'	ATGACAGCTGGATGGGTTTC
GAPDH			
OLI15 5'	AGGTCGGAGTCAACGGATTGGT		
OLI16 3'	CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC		

3. 7. 2. Condiciones de reacción de amplificación de los genes seleccionados

Para corroborar y validar los resultados obtenidos por microarreglos, se llevó a cabo una RT-PCR semicuantitativa de cada uno de los genes seleccionados en tejido cervical normal y la línea celular correspondiente. El procedimiento fue el siguiente:

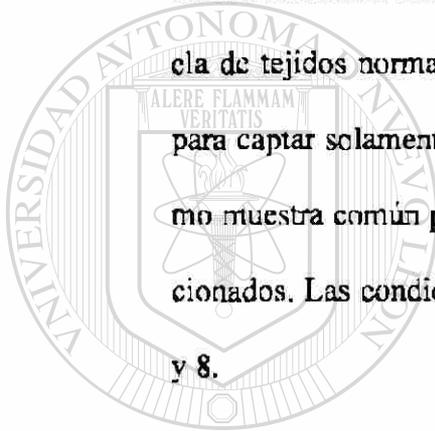
a) Seleccionar los 3 genes más sobreexpresados y los tres más subexpresados de cada sistema.

b) De cada gen se diseñaron un juego de oligonucleótidos basándose en las secuencias del Gen Bank para cada gen.

c) Se estandarizaron las condiciones para cada una de las RT-PCR seleccionadas y se aplicó el procedimiento a las muestras. Las condiciones de RT se muestran en las tablas 9 y 10. Para el análisis se tomó 1 µg de RNA total de TCN

y 1 µg de RNA de la línea celular correspondiente para llevar a cabo una reacción de RT. De la reacción de RT se tomaron alícuotas de 1 µl, 3 µl y 5 µl para llevar a cabo la reacción de PCR. Se utilizó el gen GAPDH como control de amplificación en reacciones independientes. Del producto obtenido se colocaron 5 µl en un gel de agarosa al 1.5% y se observó la intensidad de las bandas, la cual fue posteriormente medida por microdensitometría de gel. El procedimiento general se muestra en la figura 7.

d) Se diseñaron los iniciadores indicados en material y métodos para cada uno de los genes seleccionados y se procedió a la estandarización de las condiciones de amplificación para cada caso. Debido a que muchos de estos genes seleccionados aun no estaban reportados en la base de datos, los iniciadores se diseñaron a partir de las secuencias de DNAC reportadas. Por lo anterior, la estandarización se realizó utilizando DNACs generados de las líneas celulares y de la mezcla de tejidos normales. Las reacciones de RT se procesaban utilizando oligo-dT para captar solamente RNAs mensajeros. El producto de reacción se utilizaba como muestra común para llevar a cabo la estandarización de todos los genes seleccionados. Las condiciones óptimas de estandarización se muestran en las tablas 7 y 8.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 7

CONDICIONES DE REACCION DE PCR PARA LOS GENES SELECCIONADOS. Todas las cantidades están en microlitros

Condiciones de amplificación									
Gen	Buffer	MgCl ₂ 25 μM	DNTP's 10 mM	Primer 1	Primer 2	Agua	Taq	Muestra	Volumen final
six 1	2.5	2.5	1	2	2	13.5	0.5	1	25
rab3d	2.5	2.5	1	2	2	13.5	0.5	1	25
mcm2c	2.5	2	1	2	2	14	0.5	1	25
hla-e	2.5	1.5	1	2	2	14.5	0.5	1	25
ptgs2	2.5	2	1	2	2	14	0.5	1	25
brip1	2.5	2	1	2	2	14.3	0.2	1	25
rab27	2.5	2.5	1	2	2	13.8	0.2	1	25
emk1	2.5	2	1	2	2	14.3	0.2	1	25
ppp4c	2.5	2	1	2	2	14.3	0.2	1	25
stat5	2.5	1.5	1	2	2	14.75	0.25	1	25
rab23	2.5	1.5	1	2	2	14.75	0.25	1	25
frap1	2.5	1.5	1	2	2	14.75	0.25	1	25
GAPDH	2.5	2	0.5	2	2	14.75	0.25	1	25

NOTA: Las condiciones para pab1 y doc1 no se incluyen porque esos genes no se pudieron amplificar

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 8

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REACCIÓN DE PCR DE LOS GENES SELECCIONADOS

Condiciones de termociclador PTC-100 MJ Research							
Pasos	six 1	rab3d	mdm2c	hla-e	ptgs2	brip1	GAPDH
1	95°C 5 min						
2	95°C 1 min						
3	52°C 1 min	52°C 1 min	52°C 1 min	52°C 1 min	50°C 1 min	52°C 1 min	52°C 1 min
4	72°C 1 min						
5	30 veces a 2						
6	72°C 5 min						
7	Fin						
Condiciones de termociclador PTC-100 MJ Research							
Pasos	rab27	emk1	ppp4C	stat5	rab23	frap1	
1	95°C 5 min						
2	95°C 1 min						
3	50°C 1 min	52°C 1 min	52°C 1 min	50°C 1 min	50°C 1 min	49°C 1 min	
4	72°C 1 min						
5	30 veces a 2						
6	72°C 5 min						
7	Fin	Fin	Fin	Fin	Fin	Fin	

TABLA 9

CONDICIONES DE REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN

Reactivos	Volumen
Buffer 5 X (Promega)	2 μ l
dNTPs 10 mM (Promega)	1 μ l
DTT (Promega)	1 μ l
RNAsin (promega)	0.5 μ l
BSA (Invitrogen)	0.2 μ l
Agua MiliQ	0.9 μ l
MMLV-RT (promega)	0.4 μ l
RNA (desnaturalizado 5 min a 70°C)	3 μ l
OligodT (promega)	1 μ l
Volumen final	10 μ l

TABLA 10

CONDICIONES DE INCUBACIÓN PARA LA REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN

Paso	Condiciones	
1	25°C	15 min
2	42°C	60 min
3	72°C	15 min
4	Fin	

Cantidades iguales (1 μ g) de RNA de tejido cervical normal y de la línea celular



A partir de cada RNA se sintetiza el DNAc en una reacción de 10 μ l



Se llevó a cabo una PCR utilizando 1, 3 y 5 μ l de cada cDNA

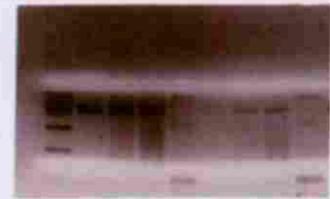


Figura 7. Procedimiento de validación de los genes seleccionados mediante RT-PCR semicuantitativa. Se tomaron cantidades iguales de RNA de tejido cervical normal y de la línea celular correspondiente y se llevó a cabo una reacción de RT para obtener DNAc. La reacción fue de un volumen total de 10 μ l. El resultado son 10 μ l de DNAc de TCN y 10 μ l de DNAc de la línea celular. En cada caso se llevó a cabo una reacción de PCR, utilizando tres cantidades diferentes, 1, 3 y 5 μ l de DNAc, para obtener un producto amplificado. Los productos amplificados se compararon en un gel de agarosa al 1.5%. Se utilizaron 3 cantidades para descartar la posibilidad de saturación de producto amplificado que podría enmascarar los resultados.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Obtención del DNA y RNA.

4.1.1. Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó a partir de las tres líneas celulares SiHa, Casky y Hela, con la técnica de TSNT-Proteinasa K. La cantidad de DNA extraído y los parámetros de calidad se muestran en la tabla 11, y en la figura 8 se observa un gel de agarosa donde se visualiza el DNA extraído.

TABLA 11

RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE DNA DE LÍNEAS CELULARES.

Muestra	Abs 260	Abs 280	260/280	[$\mu\text{g/ml}$	Vol. Total μl	DNA total
SiHa	0.175	0.095	1.84	235.3	50	11.7
CaSki	0.074	0.038	1.94	187.1	50	9.35
HeLa	0.088	0.045	1.95	219.7	50	10.9
Tejido	0.097	0.068	1.69	243.5	50	12.1



Figura 8. Extracción de DNA genómico a partir de líneas celulares y tejido cervical. El carril 1 corresponde a DNA de SiHa, el 2 a DNA de CaSki, el 3 a DNA de HeLa y el 4 a TCN. El gel es de agarosa al 1% en TBE 1X.

4.1.2. Preparación del RNA.

La extracción de RNA se realizó a partir de las tres líneas celulares y de 27 muestras de TCN. Para la extracción se probaron métodos comerciales como el de Trizol de Gibco-BRL, RNAeasy de Qiagen, High pure RNA tissue de Roche y el método no comercial de Chomczynski⁶⁰, pero con ninguno de éstos se logró obtener la cantidad necesaria de

RNA y en todos los casos el RNA obtenido estaba contaminado con DNA, lo cual implicaba un tratamiento posterior del RNA con DNAsa, lo que disminuía su calidad; además de que para tratar las cantidades necesarias de RNA para nuestro estudio, se requerían grandes cantidades de DNAsa (1.5 μ l de DNAsa por 1 μ g de RNA).

Después de varios intentos, finalmente el protocolo de extracción de RNA se llevó a cabo de la siguiente manera: se utilizó la solución de lisis contenida en el kit RNAeasy de Qiagen sobre tejido cervical macerado (con mortero) o sobre suspensiones de líneas celulares, y la suspensión de tejido se procesó mediante el método de cloruro de cesio, como

se describió previamente en la sección de métodos. En la figura 9 se observa la separación de los ácidos nucleicos después de la centrifugación.

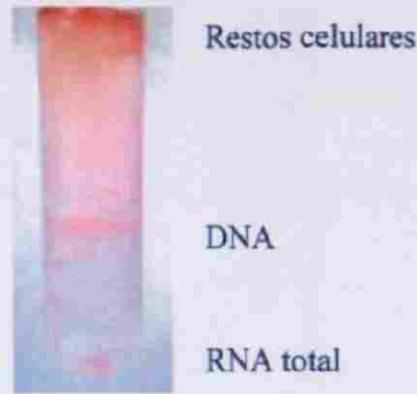


Figura 9. Resultado de la ultracentrifugación del lisado celular para la obtención de RNA. En la parte superior del tubo se observan los restos celulares. En la parte central se observa la banda correspondiente al DNA y en el fondo se observa el botón de RNA. El RNA se extrae perforando el tubo con una aguja y succionándolo con la jeringa.

Se puede observar la banda de DNA a la mitad del tubo, en la parte superior se observan los restos celulares y en la parte inferior se observa la pastilla de RNA. Las canti-

dades obtenidas por este método variaron dependiendo de la cantidad de tejido, entre 10 y 80 μg . Los valores superiores, de entre 50 y 80 μg , solo se pudieron lograr con suspen-

siones celulares. En las diferentes biopsias, la cantidad extraída varió entre 5 y 16 μg , por

lo que finalmente se hizo una mezcla del RNA de todas las biopsias de TCN y a esta mezcla se le consideró como una muestra representativa del tejido cervical normal. En la

figura 10 se observa el RNA en gel de agarosa con isotiocianato de guanidina al 1% resuelto por electroforesis. En todos los casos de extracción por este método no se aprecia

fácilmente la tercera banda inferior (5S) del RNA. Sin embargo, estos datos fueron comentados y analizados con un grupo de expertos del Instituto de Fisiología Celular, quienes

comentaron que utilizan un procedimiento similar, donde obtienen los mismos patro-

nes, y que esto no interfiere con los experimentos posteriores. La calidad del RNA es bastante alta, a pesar de que la banda 5S es poco apreciable por su tamaño y menor concentración

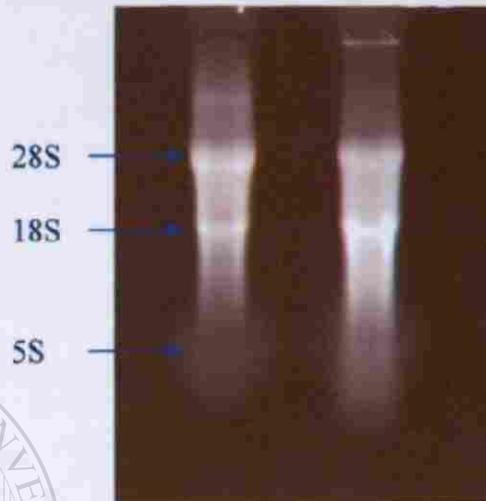


Figura 10. RNA obtenido por el método de ultracentrifugación de gradiente en cloruro de cesio. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% con isotiocianato de guanidina (0.005 M) en TBE-DEPC 1x.

4.2. Análisis del perfil de expresión de los genes virales

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Se analizó la expresión de cinco genes virales: E7, E6, E4, E2 y L1, mediante el método de qPCR. Para esto, se midió el número de copias del DNA de cada gen y el número de copias de RNA expresadas y a partir de ahí se determinó la actividad de cada uno. En general, se observó que la actividad de los genes virales presentes en la línea celular SiHa superaban ampliamente la actividad de éstos mismos en la línea celular CaSki. Los resultados obtenidos para los 5 genes (número de copias y número de transcritos), se muestran en tres gráficas, agrupados por línea celular (Figuras 11-CaSki, 12-SiHa y 13-Hela). En una cuarta gráfica se muestran las actividades comparativas de cada gen en cada línea

celular (número de transcritos *entre* número de copias del gen). Los resultados en detalle para cada gen se describen a continuación.

4.2.1. Gen E6.

Se determinó que hay 41.8 veces más copias de E6 en la línea CaSki que en la línea SiHa. Respecto a los niveles de expresión, CaSki tiene 4.4 veces más expresión que SiHa, pero al determinar la actividad de cada gen (la cantidad de copias de DNAc entre la cantidad de copias de DNA), el gen es 9.5 veces más activo en SiHa que en CaSki, lo cual implica que la línea celular CaSki tiene muchas más copias del gen E6 que la de SiHa. Cuando se hace la comparación proporcional entre el número de copias del gen y transcritos detectados, SiHa produce más transcritos por cada copia de gen presente. Estos resultados indican que la actividad génica de E6 es mayor en SiHa que en CaSki. De la misma manera se realizó el análisis de actividad para todos los genes.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.2.2 Gen E7.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los resultados de la expresión de este gen en las líneas celulares estudiadas se observan en las figuras 11, 12 y 13. El perfil de expresión de E7 en CaSki sigue un comportamiento similar al de E6: se detectan 248.4 veces más cantidad de número de copias de DNA de E7 en CaSki que en SiHa. En cuanto al número de copias del DNAc, SiHa tiene 0.14 veces más que CaSki. Al traducir esto a actividad, el gen E7 en SiHa está 283 veces más activo que en CaSki. En la figura 14 se observan los detalles de la actividad de este gen en cada línea celular.

4.2.3. Gen L1.

Los resultados de la expresión de este gen se observan en las figuras 11, 12 y 13. Se detectaron 307 veces más copias de DNA de L1 en CaSki que en SiHa. La expresión de L1 en CaSki es 62.17 veces mayor que en SiHa. En la gráfica 14 se observan los niveles de actividad comparativos para ambas líneas celulares. El gen L1 en SiHa tiene una actividad 4.9 veces mayor que el mismo gen el CaSki, por lo que el patrón se sigue repitiendo: muchas copias de DNA en CaSki, pero baja actividad viral (pocos transcritos).

4.2.4. Gen E4.

Los resultados de la expresión de este gen se observan en las figuras 11, 12 y 13. En el caso CaSki se detectaron 478,501 copias de DNA del gen E4 pero una baja expresión de éste con 81039 copias del transcrito. En el caso de SiHa, no se lograron detectar copias de DNA de E4 aunque sí se detectaron transcritos para este gen. De cualquier manera, si comparamos los niveles de expresión (numero de transcritos únicamente) entre las líneas celulares, observamos que esta es 11,000 veces mayor en CaSki que en SiHa. Como no se tienen los datos del número de copias del gen en SiHa, no se puede hacer comparación de la actividad entre ambas líneas celulares.

4.2.5. Gen E2.

Los resultados de la expresión de este gen se observan en las figuras 11, 12 y 13. En el caso de E2 en la línea celular CaSki, se detectaron grandes cantidades de copias del gen

(1,420,000 copias) y bajo número de transcritos. En el caso de SiHa, no se detectaron ni copias del gen ni transcritos. La sonda para E2 está diseñada para alinearse con la parte central del gen. Los resultados pudieran indicar que el genoma viral de HPV está integrado en el genoma celular de SiHa y el gen E2 fraccionado no puede ser detectado por la sonda. En la figura 14 se observan los detalles de la actividad de este gen en cada línea celular.

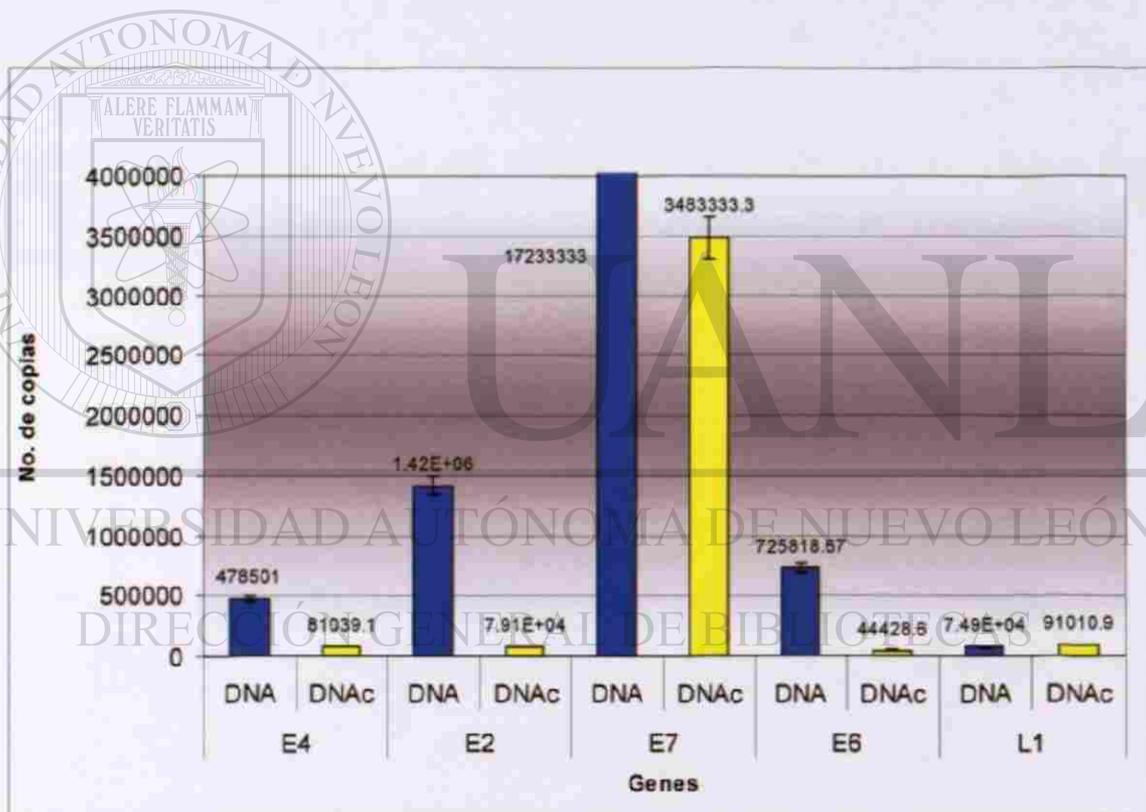


Figura 11. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en CaSki. En esta figura se grafican en amarillo los niveles de expresión (transcritos) y en azul el número de copias, para los genes E4, E2, E7, E6 y L1 en la línea celular CaSki. *Nota:* Los números de copias se indican en la base de cada barra. En este caso, la barra correspondiente al DNA de E7 no se muestra completa, para poder apreciar el resto de los resultados.

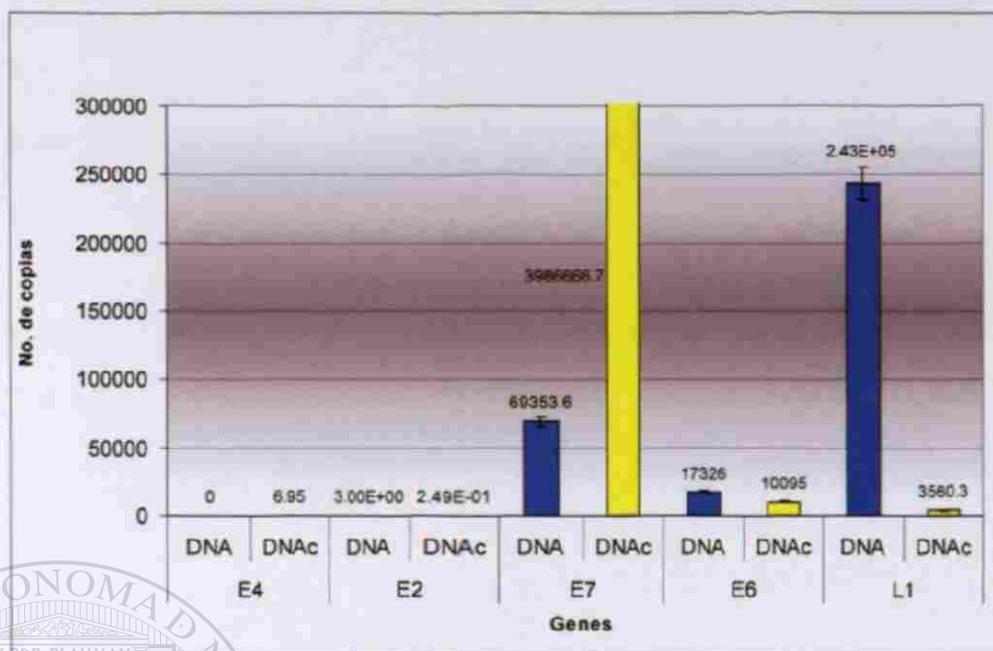


Figura 12. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en SiHa. En esta figura se grafican los niveles de expresión de los genes y el número de copias de los genes E4, E2, E7, E6 y L1 en la línea celular SiHa. *Nota:* en este caso, la barra correspondiente al DNAC de E7 está cortada (pero en la base se indica el número de copias), para poder apreciar el resto de los resultados.

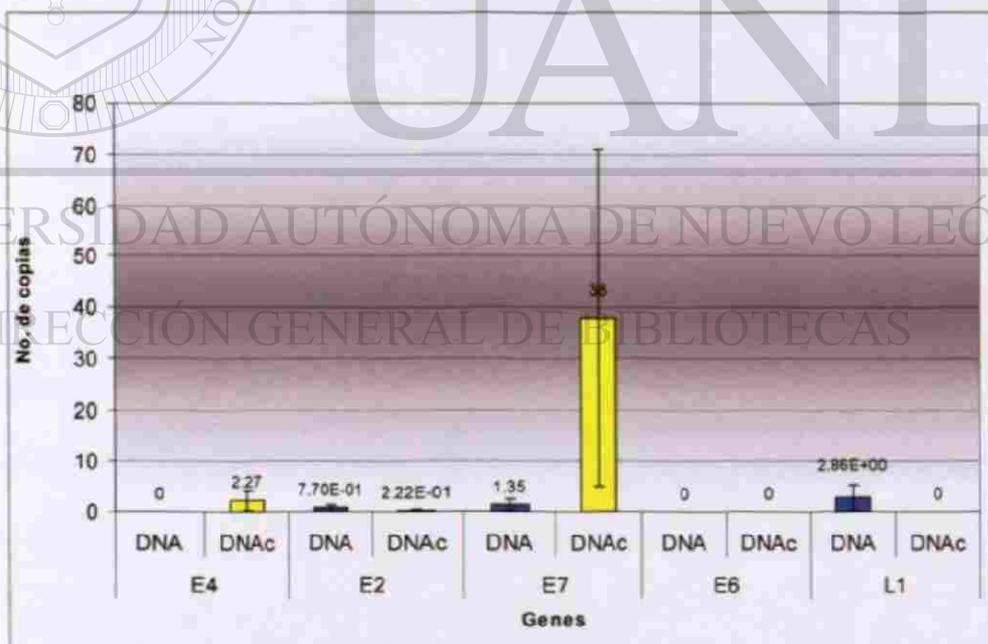


Figura 13. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en HeLa. En esta figura se grafican los niveles de expresión de los genes y el número de copias de los genes E4, E2, E7, E6 y L1 en la línea celular HeLa. La mayoría de los resultados son de "cero", y en la barra que muestra algún valor, la desviación estándar es tan grande que los resultados no son significativos. Esta línea celular se usó como control ya que es negativa para HPV16.

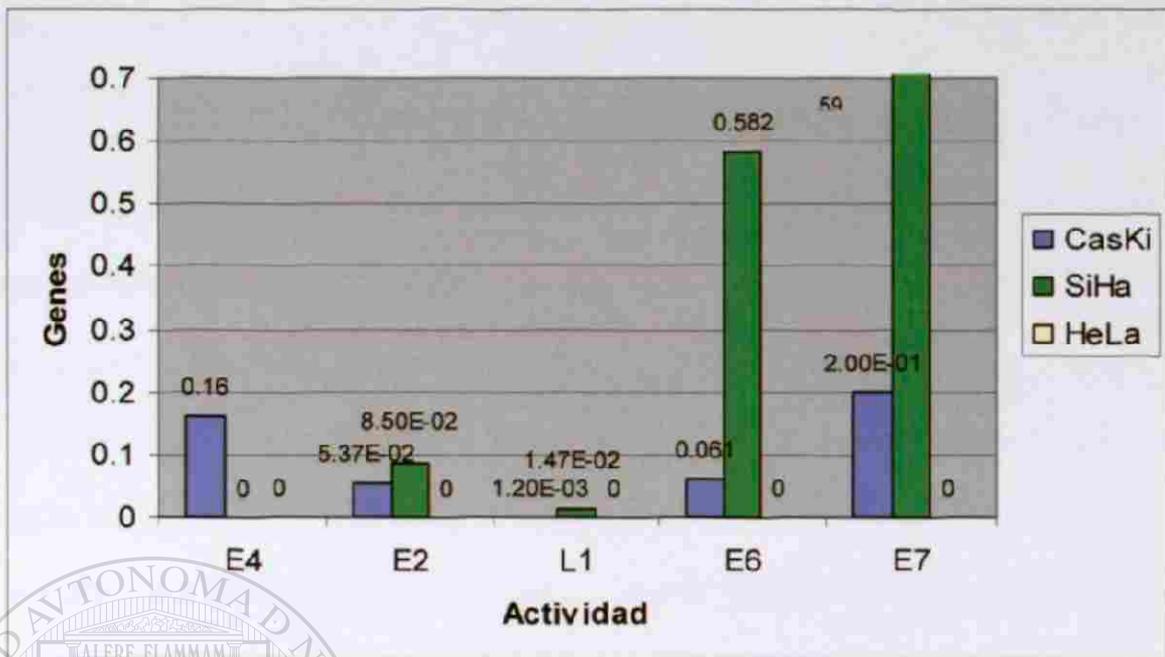


Figura 14. Niveles de actividad de los genes seleccionados de HPV-16 en CasKi, SiHa y HeLa. En esta figura se grafican los niveles de actividad de los genes seleccionados en cada línea celular. La mayor actividad se observó en los genes de SiHa. La barra de actividad de E7 en SiHa está recortada para poder apreciar el resto de los resultados.

4.3. Análisis del perfil de expresión de los genes celulares mediante microarreglos.

Se analizaron los niveles de expresión de los genes celulares en tres sistemas diferentes: SiHa contra TCN, CasKi contra TCN y HeLa contra TCN. El marcaje de los RNA se llevó a cabo durante la síntesis de DNAc mediante incorporación de los colorantes fluorescentes (Cy3 y Cy5). Las muestras marcadas se hibridaron competitivamente sobre el microarreglo (PanHuman Cancer Array). Los resultados obtenidos se normalizaron y se transformaron en logaritmos base 2. Para cada sistema se seleccionaron los tres genes más expresados y los tres genes con subexpresión más marcada a partir de las gráficas obtenidas. Los niveles de expresión de los genes seleccionados se corroboraron mediante RT-PCR semiquantitativa.

4.3.1. Preparación del DNAc marcado.

El marcaje y generación del DNAc se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del manual MWG Biotech, con cantidades de entre 30 y 60 μ g de RNA de cada muestra que se iba a hibridar. Después del procedimiento, éste se cuantificó con la finalidad de colocar cantidades iguales de ambos DNAc en el arreglo para llevar a cabo la hibridación. La figura 15 muestra imágenes de dos DNAc marcados; uno con el colorante Cy5 (rojo) y otro RNA marcado con Cy5 (verde). Como se puede observar en los carriles donde no hay RNA el colorante se acumula al final del gel. En los carriles donde hay RNA, se observan las bandas características de éste, con el colorante respectivo incorporado.

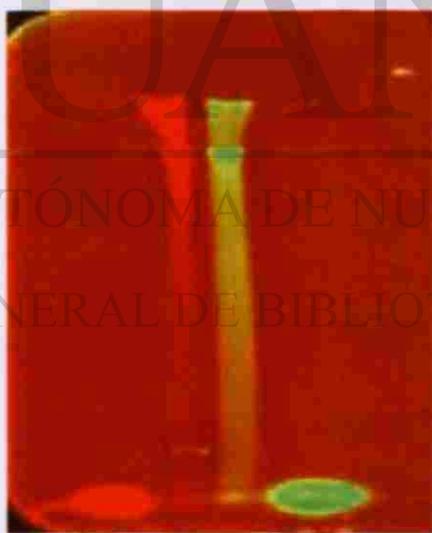


Figura 15. Resultado de la síntesis y marcaje de DNAc para la hibridación a gran escala. En el carril 1 está el colorante Cy5 sin RNA, en el carril 2 RNA marcado con Cy5, en el carril 3 RNA marcado con Cy3 y en el carril cuatro Cy3 sin RNA. Como se puede observar en los carriles donde no hay RNA el colorante se acumula al final del gel. En los carriles donde hay RNA se observan las bandas características de éste con el colorante respectivo incorporado.

4.3.2. Hibridación.

Las imágenes de los resultados de las hibridaciones en los arreglos MWG Pan-Human cáncer array se aprecian en la figura 16. Las imágenes fueron obtenidas con el escáner Axon 4000 de Axon Instruments, Inc. Cada uno de los puntos representa un gen y la intensidad y color de la señal. El escáner convierte estas imágenes en valores numéricos y los organiza en una hoja de Microsoft-Excel, donde se realizan posteriormente los análisis matemáticos.

4.3.3. Normalización y transformación de los datos.

Los resultados generados incluyen entre otros datos: el valor numérico de la señal y el valor del fondo (background). Se obtiene el Factor de Normalización como se describió en métodos. Los datos exportados a la hoja de Microsoft-Excel se procesaron de la siguiente forma: a cada dato se le restó la señal de fondo registrada y luego se le aplicó el factor de normalización. En la figura 17 se observan las gráficas de dispersión no normalizada (NN) y dispersión normalizada (N) de los datos obtenidos del sistema C33A / TCN.

C33A / Tejido normal



HeLa / Tejido normal



SiHa / Tejido normal



Figura 16. Imágenes de los resultados de la hibridación a gran escala en los tres sistemas de análisis de expresión. De arriba hacia abajo corresponde a: C33A/Tejido cervical normal, HeLa/Tejido cervical normal y SiHA/tejido cervical normal.

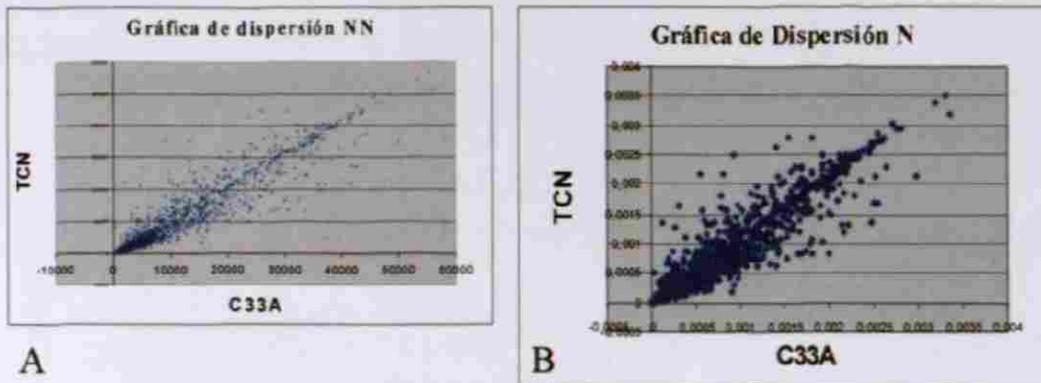


Figura 17. Normalización de los datos obtenidos de la hibridación a gran escala. En A se muestran los datos no normalizados, graficando los resultados de expresión en de TCN en el eje y y los resultados de expresión en el eje x. En B se muestran la misma gráfica después de aplicado el procedimiento de normalización. Se puede observar que la dispersión de los puntos en el inciso B es menor que en el inciso A. En la figura solo se muestra la normalización del sistema C33A/TCN. Un procedimiento igual se siguió en los otros dos sistemas.

Los datos normalizados se toman para dividir la señal de hibridación de las muestras en cáncer entre la señal de hibridación de las muestras de tejido cervical normal y se grafican. Así, se pueden observar los niveles de expresión de cada gen, como se muestra en la figura 18, generando valores negativos para los genes subexpresados y positivos

para los genes sobreexpresados.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

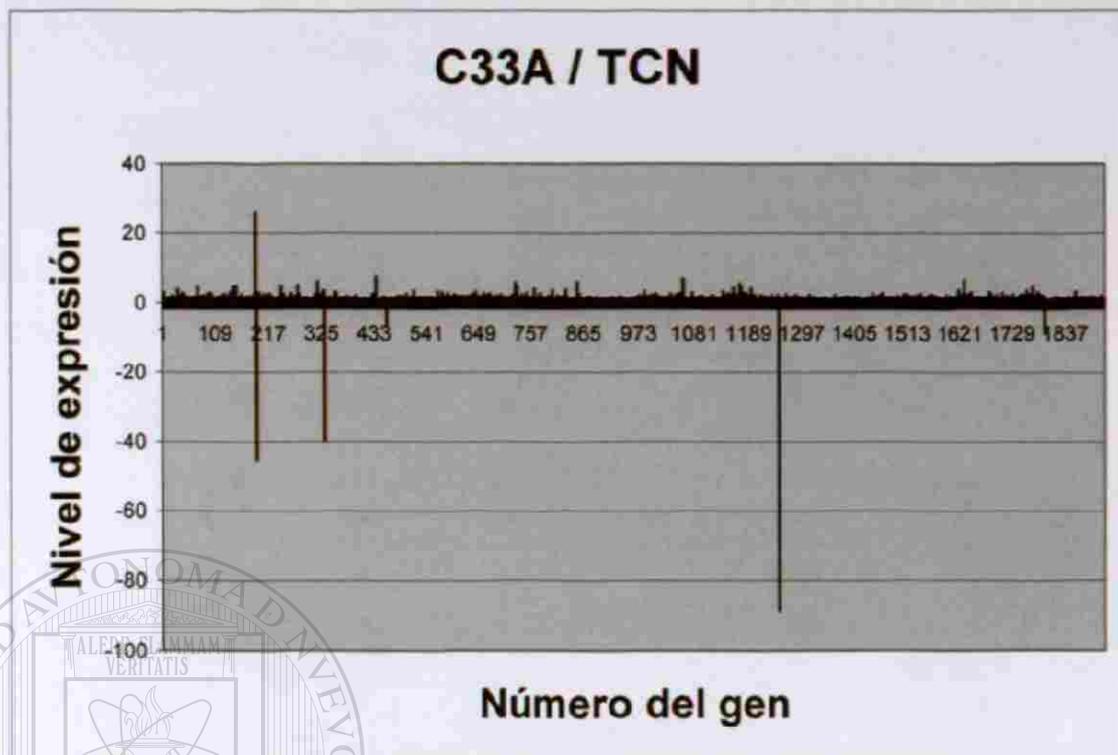


Figura 18. Gráfica de los datos normalizados. Una vez procesados los datos se obtuvieron las diferencias en los niveles de expresión de cada gen en cada sistema de expresión estudiados. Al graficar, poniendo el nivel de expresión en el eje "y" los genes en el eje "x" se obtuvo una gráfica como la que se muestra. Como puede apreciarse, algunos genes presentan picos muy pronunciados. La gráfica que se muestra es la correspondiente al sistema C33A/TCN. Un tratamiento idéntico de los datos se llevó a cabo en los otros 2 sistemas de expresión estudiados.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como las diferencias en expresión de algunos genes son muy grandes, esto hace que la gráfica sea difícil de manejar y de analizar, así como de comparar los niveles de expresión que no están tan marcados, por lo que todos los datos obtenidos de la división de la señal de las muestras de cáncer entre la señal de las muestras de tejido cervical normal se transforman a logaritmo base 2, obteniéndose una imagen que se muestra en la figura 19.



Figura 19. Datos normalizados y transformados. Como se apreciaba en la figura 18, los cambios en la expresión en algunos genes eran muy pronunciados, lo cual al graficar enmascara los niveles de expresión de genes que no tienen cambios tan grandes. Para evitar esta situación, todos los datos son transformados al log2 para obtener una gráfica como la que se muestra en esta figura, la cual corresponde al sistema TCN/C33A. Un tratamiento idéntico de los datos se llevó a cabo en los otros dos sistemas de expresión

Como se puede observar, los niveles de expresión están en forma más uniforme en la figura 19, que los que se observan en la gráfica de la figura 18, sin que afecte la apreciación sobre los genes que están considerablemente sobreexpresados o subexpresados. Las gráficas obtenidas de los tres sistemas analizados mediante este método se muestran en la figura 20.

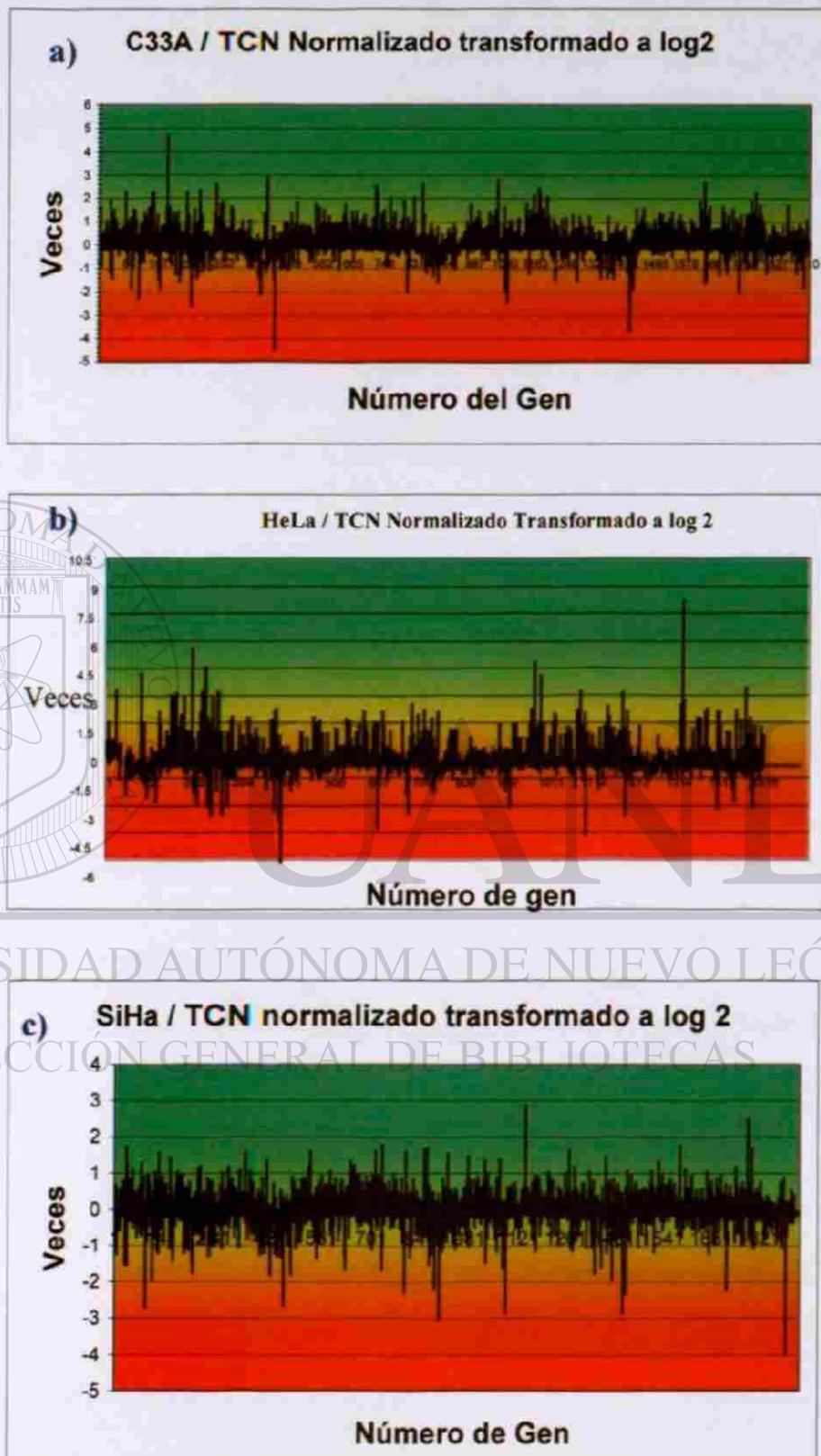


Figura 20. Gráficas de los tres sistemas analizados, con los resultados normalizados y transformados. Se muestran los tres sistemas de expresión analizados: a) C33A/TCN, b) HeLa/TCN y c) SiHa/TCN.

Con base a los objetivos de esta tesis, a partir de las gráficas de logaritmo base 2 generadas (Figura 20), se descartaron todos los genes en los cuales no hubiera por lo menos una diferencia de expresión de 2.5 veces. De los genes que sí cumplían con este criterio, solo se eligieron los 3 genes con sobreexpresión o subexpresión más marcada en cada sistema.

4.3.4. Selección de los genes.

Con base en el análisis matemático, se seleccionaron los genes con mayor diferencia en la expresión. En las figuras 21, 22 y 23 se observan los genes seleccionados en el sistema C33A/TCN, HeLa/TCN y SiHa/TCN respectivamente.

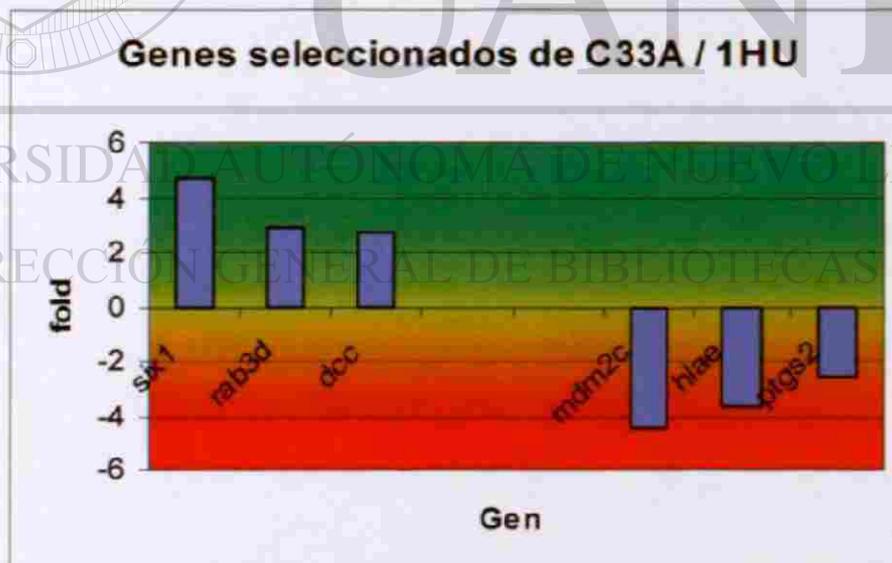


Figura 21. Genes seleccionados en el sistema C33A/TCN. En el eje y se muestran los niveles de expresión y en el eje x los genes seleccionados. Los genes sobre-expresados son six1, rab3d y dcc1 y los genes sub-expresados son mdm2c, hla-e y ptgs2.

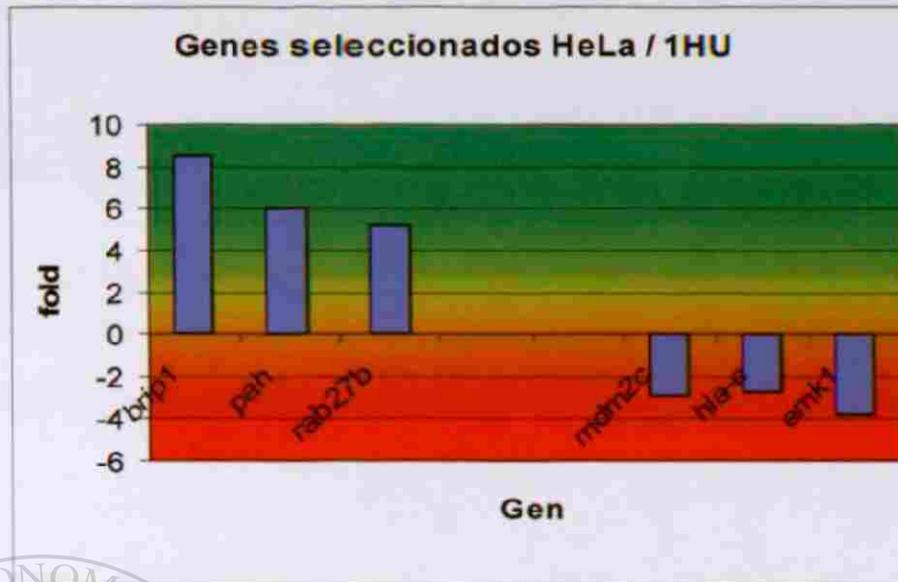


Figura 22. Genes seleccionados en el sistema HeLa/TCN. En el eje y se muestran los niveles de expresión y en el eje x los genes seleccionados. Los genes sobre-expresados son bri1, pah y rab27 y los genes sub-expresados son mdm2c, hla-e y emk-1.

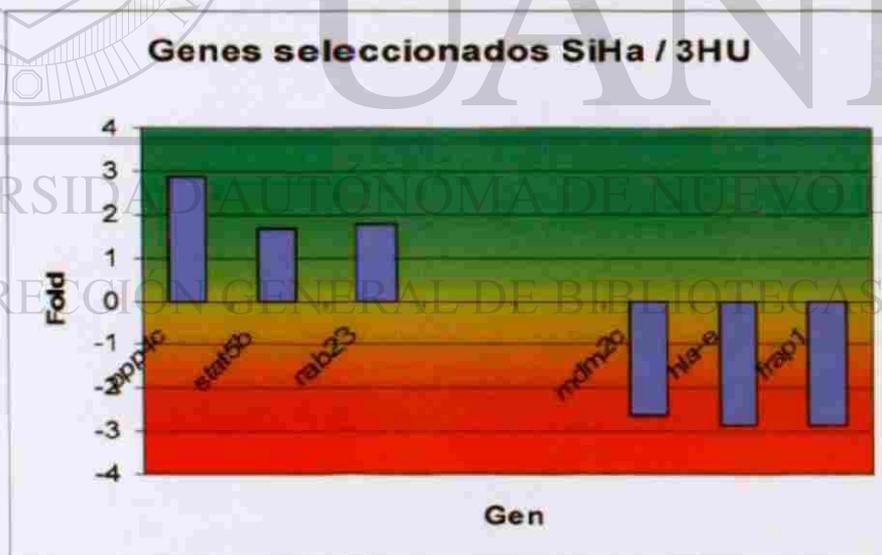


Figura 23. Genes seleccionados en el sistema SiHa/TCN. En el eje y se muestran los niveles de expresión y en el eje x los genes seleccionados. Los genes sobre-expresados son ppp4c, rab3 y stat5 y los genes sub-expresados son mdm2c, hla-e y frap1.

4.3.5. Validación de los resultados de microarreglos.

Los resultados de la validación de la expresión de los genes seleccionados se muestran a continuación.

4.3.6. Estudios de expresión en C33A/TCN mediante RT-PCR semicuantitativa.

4.3.6.1. Genes sobre-expresados en el sistema C33A/TCN.

4.3.6.1.1. Gen six 1 (GC14M059102).

En la figura 24 se observan los resultados de las RT-PCR semicuantitativas.

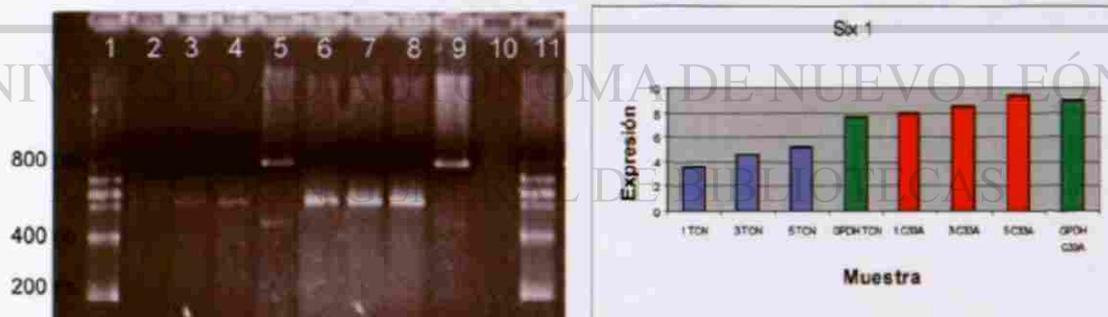


Figura 24. Gel de la amplificación del gen six-1 y gráfica de microdensitometría. En promedio se detecta 0.8 veces más expresión del gen en la C33A que en TCN. Los carriles 2 a 4 son el producto amplificado del DNAc de tejido cervical normal, los carriles 6 a 8 son el producto amplificado del DNAc de C33A y los carriles 5 y 9 son el producto amplificado de GAPDH de tejido cervical normal y C33A respectivamente. Los niveles de expresión de GAPDH en ambas muestras varían muy poco 0.1 veces.

Los resultados de la RT-PCR confirman la sobreexpresión de six1 en la línea celular C33A. Como se puede observar en la gráfica hay una sobreexpresión sostenida en las tres

cantidades de DNAc utilizadas para llevar a cabo la amplificación. En promedio se detecta 0.8 veces mas expresión del gen en la C33A que en TCN.

4.3.6.1.2. Gen rab3d (GC19M011296).

La figura 25 muestra los resultados de la RT-PCR semicuantitativa.

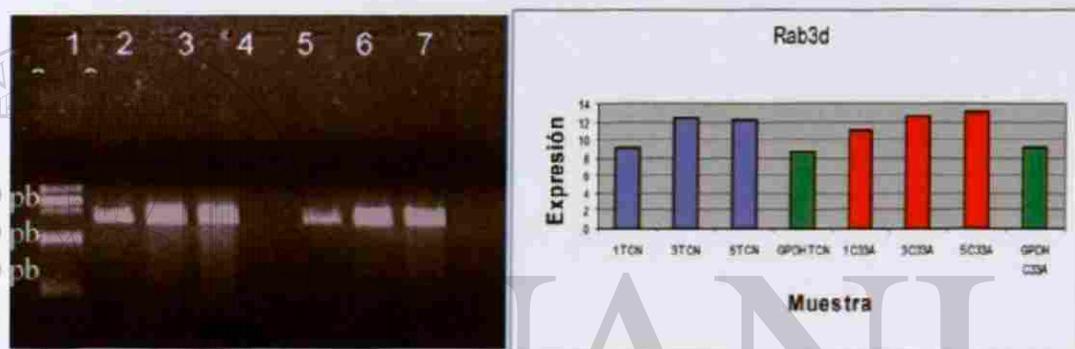


Figura 25. Gel de la amplificación del gen rab3d y gráfica de microdensitometría. No se detecta una diferencia de expresión significativa entre los dos sistemas. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de tejido cervical normal, los carriles 6 a 8 a la muestra de C33A y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y C33A respectivamente. El nivel de expresión de GAPDH aunque tenue está sostenido en ambas muestras y se hace evidente en la gráfica con una variación de 0.07 veces.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

En los resultados de la RT-PCR semicuantitativa no se observa diferencia entre los niveles de expresión del tejido cervical normal y el de las células C33A. E incluso según esta amplificación, los niveles de expresión serían algo menores en C33A; por lo tanto no se detecta una diferencia de expresión significativa entre los dos sistemas.

4.3.6.1.3. Gen dcc1. (MGC5528).

Este gen no fue posible amplificarlo de manera satisfactoria. Se probaron dos juegos de iniciadores diferentes, pero en ambos casos la presencia de bandas adicionales desde la

estandarización no permitió llevar a cabo un análisis comparativo de su expresión en las muestras biológicas de interés de este trabajo.

4.3.6.2. Genes subexpresados en el sistema C33A/TCN

4.3.6.2.1. Gen *ptgs2* (GC01M183879).

En la figura 26 se muestran los resultados de la RT-PCR semicuantitativa.

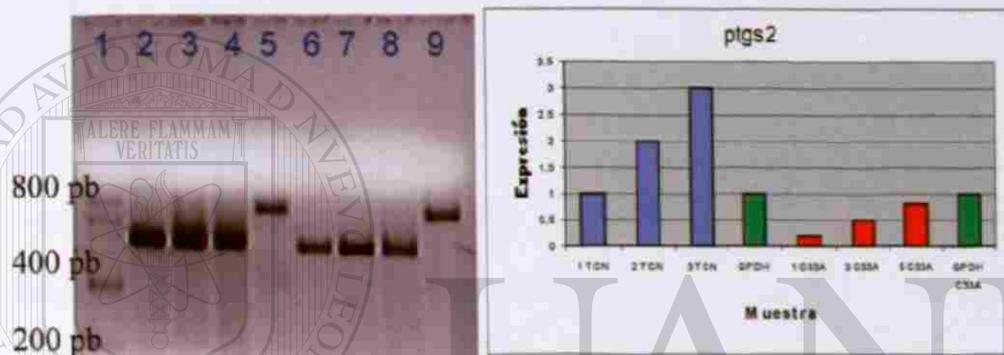


Figura 26. Gel de la amplificación del gen *ptgs2* y gráficas de microdensitometría. En promedio se detecta una expresión 3.7 veces mayor en TCN que en C33A. Los carriles 2 a 4 representan el DNAc del tejido cervical normal, los carriles 6 a 8 el producto amplificado del DNAc de C33A y los carriles 5 y 9 el producto amplificado obtenido de GAPDH de tejido cervical normal y de C33A respectivamente. Los niveles de expresión de GAPDH son iguales también en ambas muestras.

En el caso de este gen, se observan de manera muy evidente, tanto en el gel como en la gráfica, las diferencias en los niveles de expresión en el tejido cervical normal y en la línea celular C33A, existiendo una menor expresión de este gen en la línea celular. En promedio se detecta una expresión 3.7 veces mayor en TCN que en C33A.

4.3.6.2.2. Gen *mdm2c* (GC12P067488).

En la figura 27 se muestran los resultados de la RT-PCR semicuantitativa.

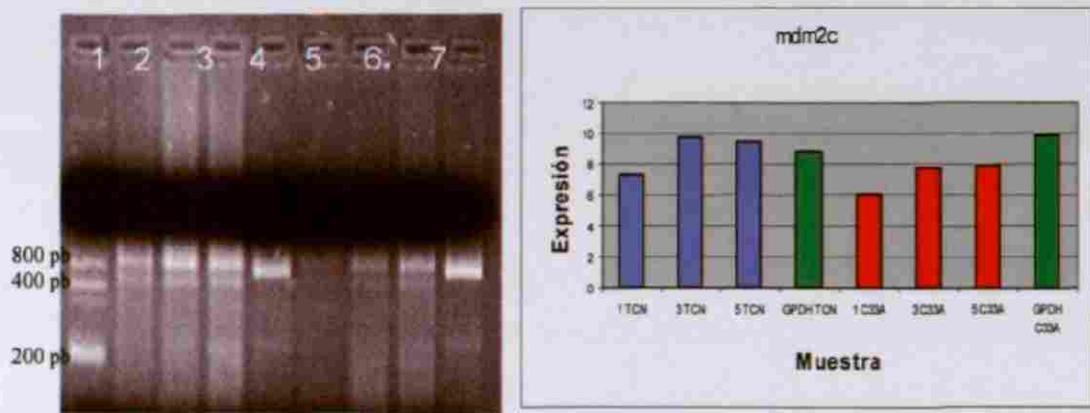


Figura 27. Gel de la amplificación del gen *mdm2c* y gráfica de microdensitometría sistema C33A/TCN. El gen está en promedio sobreexpresado 0.7 veces más en TCN que en C33A. Los carriles 2 a 4 corresponden a las muestras de TCN, los carriles 6 a 8 corresponden a C33A y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y C33A respectivamente. Los niveles de expresión de GAPDH varían 0.09 veces en las muestras.

Los resultados de este gen siempre generaron bandas adicionales en las muestras, mas no así en la estandarización. La expresión en células C33A es menor que en tejido cervical. El gen está en promedio sobreexpresado 0.7 veces más en TCN que en C33A.

4.3.6.2.3. Gen *hla-e* (GC06P030563).

En la figura 28 se muestran los resultados de la RT-PCR semicuantitativa.



Figura 28. Gel de la amplificación del gen *hla-e* y gráficas de microdensitometría sistema C33A/TCN. El gen está 0.3 veces más expresado en TCN que en C33A. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de C33A y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y C33A respectivamente. El nivel de expresión de GAPDH en ambos casos es similar con una variación de 0.09 veces.

En los resultados de la RT-PCR semicuantitativa se observa que los niveles de expresión de este gen son menores en la línea celular C33A que en tejido cervical normal. El gen está 0.3 veces más expresado en promedio en TCN que en C33A.

4.3.7. Estudios de expresión de HeLa/TCN.

4.3.7.1. Genes sobreexpresados en el sistema HeLa/TCN

4.3.7.1.1. Gen brip1 (GC17M060234).

En la figura 29 se muestran los resultados de la RT-PCR semicuantitativa.



Figura 29. Gel de la amplificación del gen brip1 y gráfica de microdensitometría. El gen está 0.8 veces más expresado en HeLa que en TCN. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 5 a 7 a la muestra de HeLa y los carriles 1 y 8 a GAPDH de TCN y HeLa respectivamente. Los niveles de expresión de GAPDH varían 0.1 veces.

El gen muestra niveles de expresión más altos en la línea celular HeLa que en el tejido cervical normal, como puede observarse en el gel y en la gráfica. El gen está 0.8 veces más expresado en HeLa que en TCN.

4.3.7.1.2. Gen rab27B (GC18P050644)

En la figura 30 se muestran los resultados de la RT-PCR semicuantitativa.

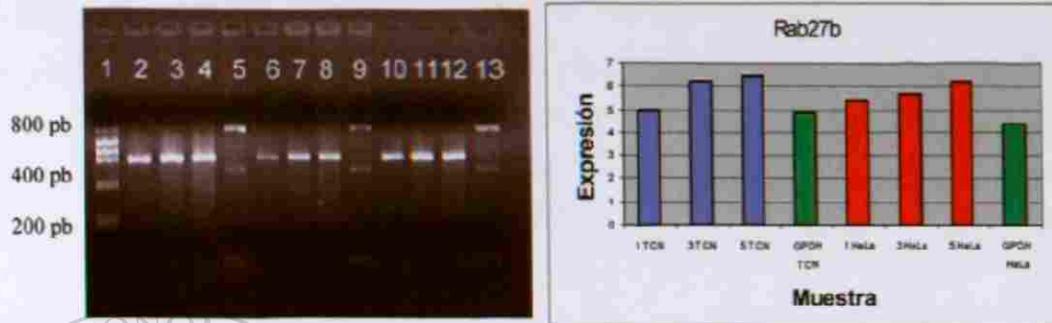


Figura 30. Gel de la amplificación del gen rab27b y gráfica de microdensitometría. Rab27b no muestra cambios significativos en su expresión en tejido cervical o en la línea HeLa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 10 a 12 a la muestra de HeLa y los carriles 5, 9 y 13 a GAPDH de TCN y HeLa respectivamente, los carriles de 6 a 8 son controles de amplificación. Los niveles de GAPDH varían 0.1 veces, siendo menor la expresión en HeLa.

Al igual que en sistema TCN / C33A este gen de la familia Rab, el Rab27b no muestra cambios significativos en su expresión en tejido cervical o en la línea HeLa.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.3.7.1.3. Gen pah (GC12M101735)

El gen pah fue imposible de amplificar. No se obtuvo señal en ninguna de las condiciones probadas con el juego de iniciadores disponibles.

4.3.7.2. Genes subexpresados en el sistema HeLa/TCN

4.3.7.2.1. Gen mdm2c (GC12P067488). En la figura 31 se observan los resultados de la RT-PCR semicuantitativa.

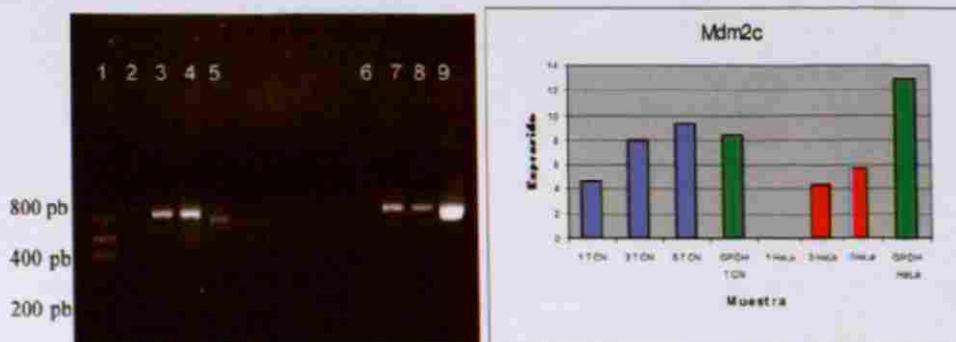


Figura 31. Gel de la amplificación del gen *mdm2c* y gráfica de microdensitometría sistema HeLa/TCN. El gen está 0.7 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa. Sin embargo, los niveles de expresión de GAPDH son muy dispares en ambas muestras con una variación de 0.5 veces, habiendo mayor expresión en HeLa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de HeLa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y HeLa respectivamente. Sin embargo, los niveles de expresión de GAPDH son muy dispares con una diferencia de 0.5 veces. Existiendo mayor expresión en HeLa.

En este ensayo, en el punto de 1 μ l de DNAC de HeLa no se obtuvo señal, pero en el resto de los puntos ensayados se ve claramente que el nivel de expresión de este gen está disminuido en la línea celular HeLa. El gen está 0.7 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa.

4.3.7.2.2. Gen *hla-e* (GC06P030563).

Los resultados de la RT-PCR se muestran en la figura 32.

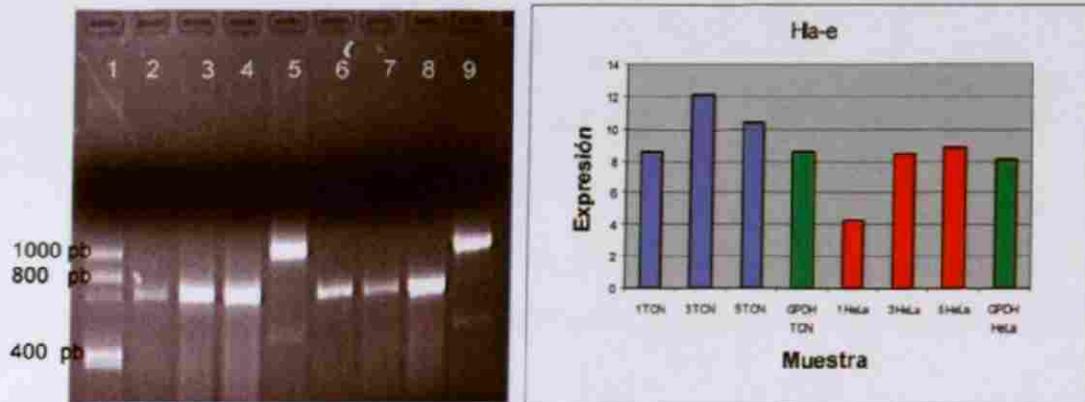


Figura 32. Gel de la amplificación del gen hla-e y gráfica de microdensitometría sistema HeLa/TCN. El gen esta 0.5 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de HeLa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y HeLa respectivamente. Los niveles de GAPDH son similares con una variación de 0.05 veces, detectándose menor expresión en HeLa.

En este gen se muestra una clara disminución de sus niveles de expresión en la línea celular HeLa que en tejido cervical normal. El gen esta 0.5 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa.

4.3.7.2.3. Gen emk-1 (GC11P063382).

Los resultados de la RT-PCR semicuantitativa se muestran en la figura 33.

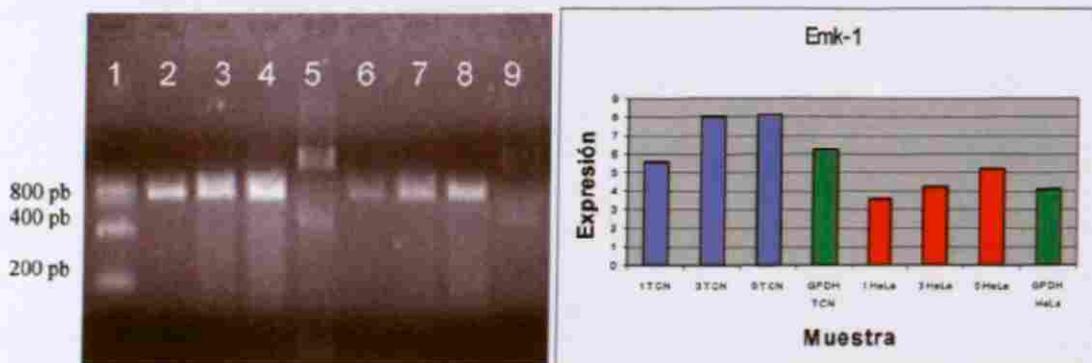


Figura 33. Gel de la amplificación del gen emk-1 y gráfica de microdensitometría. El gen esta 0.6 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de HeLa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y HeLa respectivamente. La expresión de GAPDH es menor también en HeLa con una diferencia de 0.4 veces.

Para este gen se observa menor expresión en HeLa que en tejido cervical normal. El gen está 0.6 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa.

4.3.8. Estudios de expresión en SiHa/TCN

4.3.8.1. Genes sobreexpresados en el sistema SiHa/TCN

4.3.8.1.1. Gen *ppp4c* (GC16P030126). Los resultados de la RT-PCR semicuantitativa se observan en la figura 34.

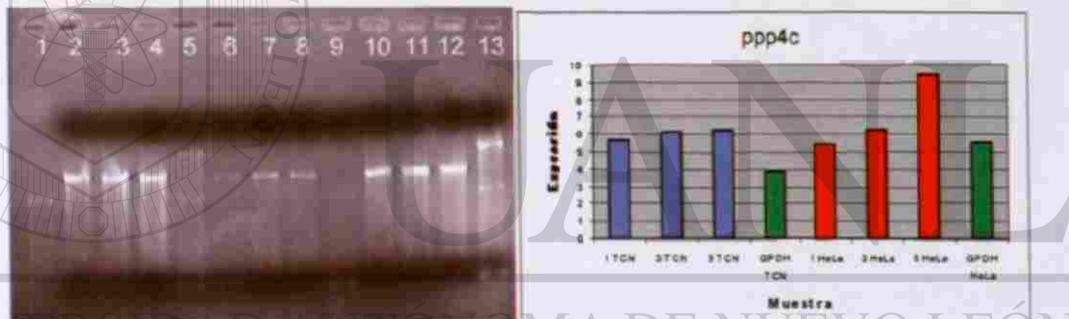


Figura 34. Gel de la amplificación del gen *ppp4c* y gráfica de microdensitometría. El gen está 0.2 veces más expresado en SiHa que en TCN. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 10 a 12 a la muestra de SiHa y los carriles 5, 9 y 13 a GAPDH de TCN y SiHa respectivamente, los carriles de 6 a 8 son controles de amplificación.

En este gen se observa una sobreexpresión ligera en la línea celular SiHa. El gen está 0.2 veces más expresado en SiHa que en TCN.

4.3.8.1.2. Gen *stat5b* (GC17M040726).

Los resultados se muestran en la figura 35.

4.3.8.1.3. Gen rab23 (GC06M057100).

Los resultados del análisis de ambos genes (stat5b y Rab23) por RT-PCR semicuantitativa se muestran en la figura 35.

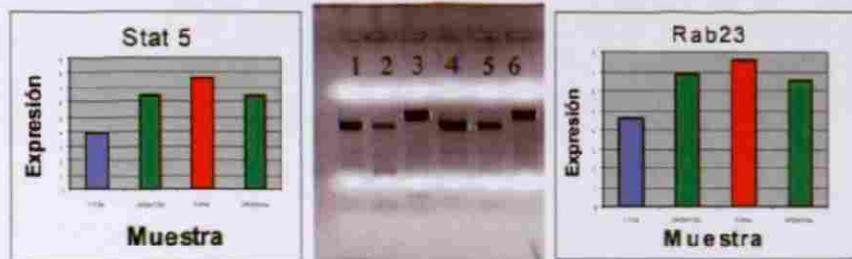


Figura 35. Gel de la amplificación de los genes stat5b y rab23 y gráficas de microdensitometría. Stat5b esta 0.3 veces más expresado en SiHa que en TCN. El gen rab23 también presenta este mismo comportamiento, el gen esta 0.5 veces más expresado en SiHa que en TCN. Los carriles 1 y 2 representan la amplificación para el gen Stat5 de la línea celular SiHa y TCN respectivamente; los carriles 4 y 6 son la amplificación de GAPDH de SiHa y TCN respectivamente. Los carriles 4 y 5 representan a TCN y SiHa respectivamente. Los niveles de expresión de GAPDH son similares en ambos tejidos con una variación de 0.05 veces en el caso de Rab23.

En el análisis por RT-PCR semicuantitativa, la expresión del gen Stat5b es mayor en la línea celular SiHa que en el tejido cervical normal, el gen esta 0.3 veces más expresado en SiHa que en TCN. El gen rab23 también presenta este mismo comportamiento, el gen esta 0.5 veces más expresado en SiHa que en TCN.

4.3.8.2. Genes subexpresados en el sistema SiHa/TCN.

4.3.8.2.1. Gen frap1. (GC01M010876).

Los resultados de la RT-PCR semicuantitativa se muestran en la figura 36.

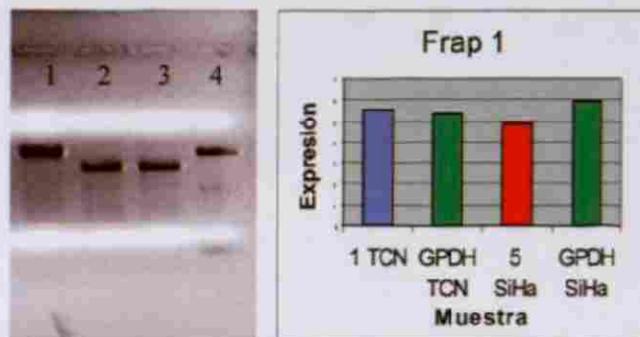


Figura 36. Gel de la amplificación del gen *frap1* y gráfica de microdensitometría. No se observa una diferencia significativa en los niveles de expresión en las muestras analizadas, la diferencia detectada es de 0.1 veces.

En este gen no se observa diferencia en los niveles de expresión en ambas muestras.

En el caso de GAPDH se observa una expresión mas marcada en el caso de tejido cervical normal.

4.3.8.2.2. Gen *mdm2c* (GC12P067488).

Los resultados de la RT-PCR semicuantitativa se muestran en la figura 37.

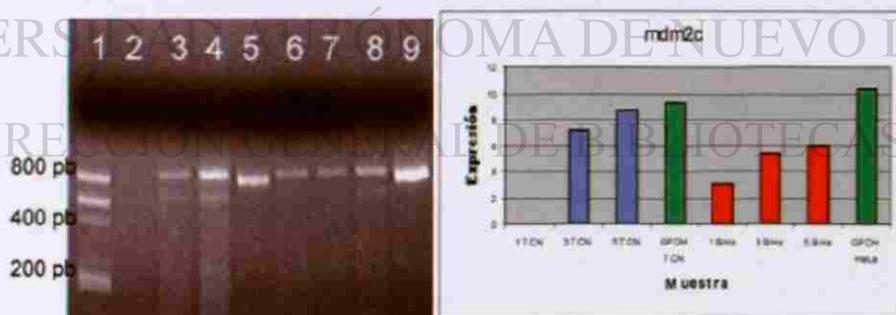


Figura 37. Gel de la amplificación del gen *mdm2c* y gráfica de microdensitometría. El gen está 0.55 veces más expresado en TCN que en SiHa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de SiHa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y SiHa respectivamente. La diferencia de expresión de GAPDH es de 0.12 veces

El punto de 1 μ l de DNAC no dio señal, pero en el resto de los puntos se observa una disminución clara en los niveles de expresión del gen *mdm2c* en la línea celular SiHa. El gen está 0.55 veces más expresado en TCN que en SiHa.

4.3.8.2.3. Gen *hla-e* (GC06P030563).

Los resultados de la RT-PCR semicuantitativa se muestran en la figura 38.

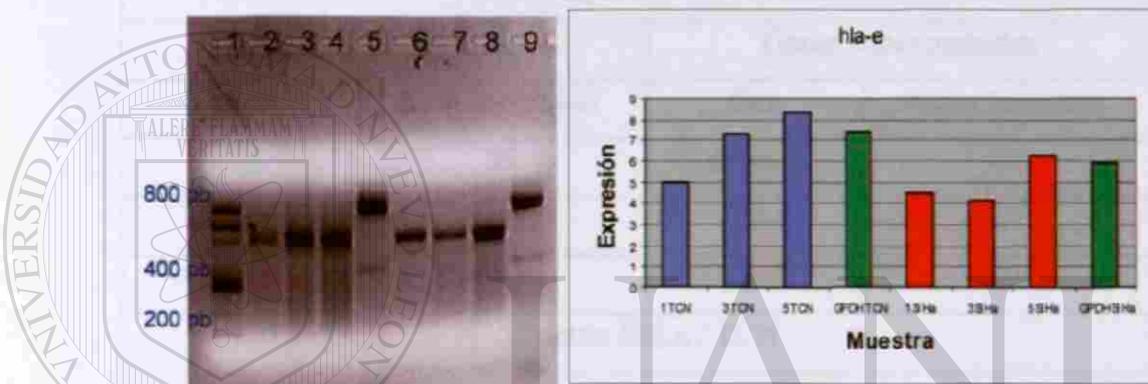


Figura 38. Gel de la amplificación del gen *hla-e* y gráfica de microdensitometría. El gen está 0.4 veces más expresado en TCN que en SiHa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de SiHa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y SiHa respectivamente.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El nivel de expresión de *hla-e* es considerablemente menor en la línea SiHa que en el tejido cervical normal. El gen está 0.4 veces más expresado en TCN que en SiHa.

4.3.9. Resumen de resultados de validación de los genes seleccionados de los experimentos de microarreglos.

Los resultados de la validación en los tres sistemas se muestran en la tabla 12. De los 18 genes seleccionados 13 pudieron ser corroborados, y al hacer un análisis de su me-

canismo de acción se determinaron seis rutas de señalamiento donde estos genes participan.

TABLA 12

RESULTADOS DE LA CORROBORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES SELECCIONADOS.

Sistema C33A / TCN			
Genes sobreexpresados		Genes subexpresados	
Gen	Corroboración	Gen	Corroboración
six1	SI	mdm2c	SI
rab3d	NO	hla-e	SI
dcc	NO	ptgs2	SI
Sistema HeLa / TCN			
Genes sobreexpresados		Genes subexpresados	
Gen	Corroboración	Gen	Corroboración
brip1	SI	emk1	SI
pah	NO	mdm2c	SI
rab27	NO	hla-e	SI
Sistema SiHa / TCN			
Genes sobreexpresados		Genes subexpresados	
Gen	Corroboración	Gen	Corroboración
ppp4c	SI	frap1	NO
rab3	SI	mdm2c	SI
stat5b	SI	hla-e	SI

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El CaCU es un gran problema de salud mundial al que muchos investigadores de diferentes áreas del mundo han dedicado su esfuerzo. Gracias a las herramientas moleculares fue posible estudiar y caracterizar con detalle al agente etiológico o al menos altamente asociado a esta patología: al HPV. En la actualidad, virtualmente existe una explosión de información y de nuevas investigaciones sobre la biología molecular del virus y su papel en el desarrollo del cáncer de cérvix. A la vez, se amplía la lista de genes del huésped que se asocian y/o participan en el desarrollo de esta patología. Recientemente, a raíz de la información de miles de genes secuenciados con el Proyecto del Genoma Humano y del surgimiento de nuevas herramientas de alto rendimiento (que permiten el estudio de genomas completos en un mismo ensayo), la manera de abordar tales investigaciones es ahora diferente. Por un lado, se cuenta con metodologías que permiten detectar y cuantificar en forma muy precisa, cantidades mínimas de secuencias de DNA; y por otro lado, existen con metodologías que permiten hacer tamizajes de la expresión de cientos y miles de genes en un solo ensayo. Sin embargo, hasta ahora son muy escasos los trabajos que se han reportado en los que se analiza en forma global la expresión de genes celulares y virales en un modelo de cáncer de cérvix.

El objetivo de este trabajo fue el de analizar y comparar los cambios en los perfiles de expresión de los genes virales y celulares en sistemas de CaCU en los que se tenía incorporado el genoma del VPH; para ello, se utilizaron líneas celulares que estaban infectadas con HPV-16 (Caski y SiHa), con HPV-18 (HeLa) y sin infección (C33A). A su vez, cada línea celular se comparó contra un mismo conjunto de tejidos de cérvix normal, lo que permitió tener un patrón de expresión constante entre los tres sistemas para validar los datos obtenidos.

En este trabajo encontramos que la expresión de los genes seleccionados en la línea celular SiHa es sostenidamente más elevada que en CaSki. En los estudios de expresión de los genes celulares, hubo cambios en un número considerable de los genes seleccionados en el arreglo, pero solo elegimos los genes con mayor o menor subexpresión. Con base a esto, 18 genes fueron estudiados por RT-PCR semicuantitativa y 13 pudieron ser corroborados. Los detalles de los hallazgos se discuten a continuación.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.1. Perfil de expresión de los genes virales.

Para estos experimentos se utilizaron únicamente las líneas celulares Caski y SiHa, que son las que tienen integrado el genoma de HPV 16. Se determinó el número de copias y los niveles de expresión de los genes E4, E6, E7, L1 y L2, ya que éstos dan una clara idea de la actividad viral. Se observó que la línea celular CaSki tiene consistentemente mayor número de copias que los que tiene SiHa; sin embargo, cuando analizamos la acti-

vidad de los genes, ésta no es proporcional al número de copias observado, ya que SiHa es la que presentó mayor actividad.

El hecho de que los genes de la línea celular Caski no presenten niveles de expresión elevados, como se esperaría, indica que debe existir algún mecanismo que inhiba la expresión de los genes en esta línea celular. Recientemente, en un trabajo reportado por Badal S. y cols., en el 2004⁶¹ reportan que el genoma de HPV puede ser eficientemente metilado por las enzimas metilasas del hospedero, y que diferencias en el patrón de metilación podrían explicar las diferencias de la expresión. En este estudio, no se exploraron los patrones de metilación de las líneas celulares analizadas, pero es interesante considerar que cuando se hace el diagnóstico de HPV en una muestra clínica, solamente se detecta la presencia del genoma viral, pero nunca se determina si los genes de éste, están o no expresándose, ni tampoco se determina la actividad de éstos; lo cual pudiera tener implicaciones importantes en la evolución de la infección del HPV en el tejido cervical.

Finalmente, debido a que los niveles de expresión y la actividad de los genes virales varían ampliamente entre sí, se dificulta establecer una relación entre éstos y el estado fisiológico de las líneas celulares o determinar la situación funcional del virus en estas líneas de manera clara.

A pesar de estas diferencias de niveles de expresión en las líneas celulares y entre genes, las células están transformadas o como en el caso de la línea celular C33A la cual está transformada sin siquiera estar infectada por HPV. Esto indicaría que los niveles de expresión de las proteínas E6 y E7, necesarios para iniciar la transformación maligna son

muy bajos, o que se requiere una susceptibilidad previa dentro de los mecanismos de regulación celulares, para que pequeñas cantidades de las oncoproteínas E6 y E7 puedan ser efectivas. Tampoco se descarta que sea necesaria una serie de eventos moleculares posteriores para lograr la transformación maligna, de los cuales la infección viral y la interacción de las oncoproteínas E6 y E7 serían solamente unos de los primeros fenómenos requeridos.

Dentro de la biología estos sistemas, la integración del genoma viral en el genoma celular, y el posterior descontrol de la expresión de los genes virales que lleva a un “secuestro” de las proteínas E6 y E7, genera una situación desfavorable para el desarrollo natural del virus, por lo que es evidente que el mismo virus se ve afectado al momento en que las células se transforman, dejando de lado el modelo del patógeno que daña al hospedero para favorecer su propia biología.

Con todo esto el papel del virus de HPV-16 en el CaCU parece ser un elemento secundario a un desbalance en los mecanismos de regulación y/o vigilancia celulares, lo que a su vez favorece la integración del virus y hace que la célula sea más susceptible al efecto de las oncoproteínas E6 y E7 y lleva a la posterior transformación.

En cuanto a los genes E2, E4, y L1 solo se observó una variación en sus niveles de expresión y actividad en ambos sistemas, pero siguiendo el mismo comportamiento, estando estos más activos en la línea celular SiHa. Los efectos y actividad de los productos de estos genes en las células son menos claras que las actividades de E6 y E7.

5.2. Perfil de expresión de los genes celulares.

A partir de los experimentos de microarreglos se seleccionaron 18 genes en los tres sistemas de expresión estudiados, de los cuales 13 fueron validados por RT-PCR semicuantitativa. Estos genes pertenecen a diferentes rutas, de las cuales seis pudieron ser identificadas, y se describen en el apéndice 1. Sin embargo las rutas donde participan estos genes son de mecanismos muy diversos, que van desde mecanismos relacionados con el sistema inmune, hasta rutas metabólicas, pasando por cascadas de señalamiento y formación y estabilidad de los microtúbulos.

Con relación a los estudios ya reportados sobre el perfil de expresión del CaCU, en todos los casos se detectan rutas de señalamiento diversas alteradas en comparación a las diversas muestras que se usan como control. Nuestro estudio coincide con el de Ruutu M y cols del 2002 en que el gen FRAP está subexpresado, aunque en este trabajo ese gen no se pudo validar por RT-PCR semicuantitativa. Con relación a los demás trabajos, todos reportan modificaciones en genes y rutas de señalamiento diferentes. Sin embargo, hay una coincidencia entre los reportes de Nees M y cols 2001, Ruutu M y cols 2002 y Achary y cols 2000, quienes encuentran al gen NF-kappa B sobreexpresado en los tumores. En nuestro trabajo también se incluyó este gen, pero en los tres sistemas estudiados se encuentra dentro de los genes con cambio no significativo. El gen NF-kappa beta esta involucrado en la generación de p50, p105 y en el desarrollo de la apoptosis. En este trabajo encontramos a los genes mdm2b y a hla-e con baja expresión en los tres sistemas, lo cual

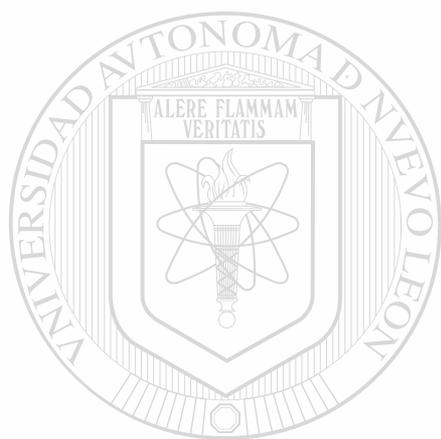
es de notar, ya que en otros tumores, la expresión de mdm2b siempre está elevada, y al ser una molécula de control de P53, favorece la desregulación del ciclo celular; la proteína hla-e es una molécula de identificación de las células, si esta molécula no está correctamente expresada o en las cantidades adecuadas, las células NK lo detectan y eliminan a las células con esta molécula expresada defectuosamente, según nuestros resultados, las células de CaCU utilizadas deberían de ser muy susceptibles al ataque de los NK.

Es importante recalcar que no sólo el papel de las rutas de señalamiento identificadas queda por esclarecer, sino también el papel de los mismos genes, ya que aunque todos han sido previamente relacionados con cáncer en otros tejidos, no se ha determinado el papel concreto que juegan en cada caso y mucho menos en el caso específico del CaCU. Por lo tanto, es necesario que éstos genes sean explorados individualmente con mayor detalle para poder establecer o descartar un papel importante en el desarrollo del CaCU.

Las variaciones entre los trabajos son debidas en parte a que no se utilizan los mismo sistemas de estudio del transcriptoma, e incluso, los grupos de genes incluidos en los arreglos estudiados son diferentes; pero también debido a que las alteraciones del transcriptoma son muy considerables, no solo en el impacto sobre la expresión de un gen determinado, sino sobre la cantidad de genes que se alteran en relación con un tejido no transformado.

Finalmente, además del posible papel que tengan los genes descritos en este trabajo sobre la biología del CaCU, un análisis de la expresión en muestras de displasias sería muy útil para poder determinar si alguno de los genes identificados pueda servir como

marcador temprano de desarrollo del CaCU o si el efecto en su expresión solo se da cuando la célula ya ha sido transformada.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Se implementó un sistema de cuantificación de la expresión de los genes del HPV mediante la técnica de PCR y qPCR y se determinaron los niveles de expresión de los genes clave del HPV-16.

- Se determinó la actividad de los genes E4, E6, E6, L1 y L2 de HPV 16, con base a los resultados de expresión, en las líneas celulares Caski y SiHa (que tienen integrado el genoma de HPV-16)

- Se analizaron tres sistemas de líneas celulares de cérvix en relación a tejido cervical normal y se seleccionaron 18 genes con los niveles de expresión más diferenciados (6 por cada sistema)

- De estos genes 13 fueron corroborados por RT-PCR semicuantitativa y se detectaron 6 rutas de señalización celular donde estos genes están involucrados.

- Se implementó el sistema básico de estudio del transcriptoma (para HPV y celular) en CaCU.

CAPÍTULO VII

PERSPECTIVAS

Es necesario determinar las causas de la elevada expresión de los genes de HPV en la línea celular SiHa y en diferentes tejidos de cáncer de cérvix para identificar si estos cambios en los niveles de expresión son debidos a multiplicación de los genes o a alteraciones en la maquinaria transcripcional.

Se deben llevar a cabo un análisis con un número mayor de genes, para poder establecer posibles relaciones sutiles entre los niveles de expresión de grupos determinados de genes y el desarrollo del CaCÚ.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics 1998. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 6-29.

² Lazcano-Ponce EC, Moss S, Alonso de Ruiz P, Salmeron Castro J, Hernandez Avila M. Cervical cancer screening in developing countries: why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res* 1999; 30: 240-250.

³ Zambrana RE, Breen N, Fox SA, Gutierrez-Mohamed ML. Use of cancer screening practices by Hispanic women: analyses by subgroup. *Prev Med* 1999; 29: 466-477.

⁴ Howe SL, Delfino RJ, Taylor TH, Anton-Culver H. The risk of invasive cervical cancer among Hispanics: evidence for targeted preventive interventions. *Prev Med* 1998; 27: 674-680.

⁵ Robles SC, White F, Peruga A. Trends in cervical cancer mortality in the Americas. Bull Pan Am Health Organ 1996; 30: 290-301.

⁶ Slattery ML, Overall JC Jr, Abbott TM, French TK, Robison LM, Gardner J. Sexual activity, contraception, genital infections, and cervical cancer: support for a sexually transmitted disease hypothesis. Am J Epidemiol 1989; 130: 248-258.

⁷ Ramírez AG, Suarez L, Laufman L, Barroso C, Chalela P. Hispanic women's breast and cervical cancer knowledge, attitudes, and screening behaviors. Am J Health Promot 2000; 14: 292-300.

⁸ Hirose K, Hamajima N, Takezaki T, Kuroishi T, Kuzuya K, Sasaki S, Tokudome S, Tajima K. Smoking and dietary risk factors for cervical cancer at different age group in Japan. J Epidemiol 1998; 8: 6-14.

⁹ Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. J Clin Pathol 1998; 51: 96-103.

¹⁰ Segnan N. Socioeconomic status and cancer screening. IARC Sci Publ 1997. 138: 369-376.

¹¹ Koopman LA, van Der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1669-1677.

¹² Krul EJ, Schipper RF, Schreuder GM, Fleuren GJ, Kenter GG, Melief CJ. HLA and susceptibility to cervical neoplasia. *Hum Immunol* 1999; 60: 337-342.

¹³ Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma shows papillomavirus-type specificity. *Nat Genet* 1994; 6: 157-162.

¹⁴ Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol* 2000; 13: 243-251.

¹⁵ Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 1999; 73: 5887-5893.

¹⁶ Sternberg S. S. *Diagnostic Surgical Pathology*, 1999.

¹⁷ Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51: 96-103.

¹⁸ Shepherd JH. Cervical and vulvar cancer: changes in FIGO definitions of staging. *Br J Obst Gyn* 1996; 103(5): 405-406

¹⁹ Hopkins, MP; Morley, GW. The prognosis and management of cervical cancer associated with pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 1992; 80(1): 9-13

²⁰ Duenas-Gonzalez A, Lopez-Graniel C, Gonzalez-Enciso A, Cetina L, Rivera L, Mariscal I, Montalvo G, Gomez E, de la Garza J, Chanona G, Mohar A. A phase II study of multimodality treatment for locally advanced cervical cancer: neoadjuvant carboplatin and paclitaxel followed by radical hysterectomy and adjuvant cisplatin chemoradiation. *Ann Oncol.* 2003 Aug;14(8):1278-84.

²¹ Martinez Monge R, Jurado M, Azinovic I, Aristu J, Fernandez-Hidalgo O, Lopez G, Calvo FA. Preoperative chemoradiation and adjuvant surgery in locally advanced or recurrent cervical carcinoma. *Rev Med Univ Navarra.* 1997 Apr-Jun;41(2):19-26. Review.

²² Morris M, Eifel PJ, Jiandong L, Grisby PW, Levenback Ch, Stevens RE et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Eng J Med* 340(15): 1137-1143

²³ Omura GA. Chemotherapy for cervix cancer. *Semin Oncol* 1992; 42(2): 145-149

²⁴ Howley PM. Role of human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Re* 1991; 51: suppl:5019-5022.

- ²⁵ Herber R, Liem A, Pitot H, Lambert PF. Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol* 1996; 70: 1873-1881.
- ²⁶ Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- ²⁷ Zhao W, Chow LT, Broker TR. Transcription activities of human papillomavirus type 11 E6 promoter-proximal elements in raft and submerged cultures of foreskin keratinocytes. *J Virol* 1997; 7: 8832-8840.
- ²⁸ Carr J, Gyorfí. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med* 2000; 20: 235-255.
- ²⁹ Shenk T. Adenoviridae: The virus and their replication. In Fields BN ed. *Fields Virology*, 3rd edition. Lippincott-Raven Publisher. Philadelphia. 1996; 2111-2148.
- ³⁰ Zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 4 27-447.

- ³¹ Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- ³² Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71: 2463-2472.
- ³³ Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol* 2000; 13: 243-251.
- ³⁴ Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 83: 449-455.
- ³⁵ Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-937.
- ³⁶ Thomas, M., D. Pim, and L. Banks. 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18:7690-7000.

³⁷ Storey A., Thomas M., Kalita A., Harwood C., Gardiol d., Mantovani F., Breuer J., Leigh I. M., Matlashewski G., and Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-234.

³⁸ Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.

³⁹ Paulovich, AG, Toczyski, DP, Hartwell, LH. When check point fails. *Cell* 1997; 17: 315-321

⁴⁰ Adams, JM y Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 381: 1322-1326.

⁴¹ Thornberry, NA y Lazcbnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1313-1316

⁴² Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 1999; 73: 5887-5893.

⁴³ Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology* 1998; 10: 19-29.

⁴⁴ Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol* 2000; 192: 280-288.

⁴⁵ Bonalume, R. Brazilian scientists team up for cancer genome project. *Nature* 1999; 398: 450-455.

⁴⁶ Augenlicht, L. H. y Kobrin D. Cloning and screening of sequences expressed in a mouse colon tumor. *Cancer Res.* 1982; 42: 1088-1093.

⁴⁷ Lockhart D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. y Brown, E. L. Expresión monitoring by hidridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* 1996; 14: 1675-1680 1996.

⁴⁸ Días Neto E, García Correa R, Verjovski-Almeida S, Briones MR, Nagai MA, da Silva W Jr, Zago MA, Bordin S, et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3491-3496.

⁴⁹ von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research. *Biotechniques* 2000; 29: 1066-1070.

⁵⁰ Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 2001; 75(9): 4283-96.

⁵¹ Cheng Q, Lau WM, Tay SK, Chew SH, Ho TH, Hui KM. Identification and characterization of genes involved in the carcinogenesis of human squamous cell cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 2002 Mar 20; 98(3): 419-26.

⁵² Ruutu M, Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33-positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration. *Int J Cancer.* 2002 Jul 20; 100(3): 318-26.

⁵³ Berger AJ, Baege A, Guillemette T, Deeds J, Meyer R, Disbrow G, Schlegel R, Schlegel R. Insulin-like growth factor-binding protein 3 expression increases during immortalization of cervical keratinocytes by human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *Am J Pathol.* 2002; 161(2): 603-10.

⁵⁴ Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley MA, Coleman N. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res.* 2002; 62(23): 6959-65.

⁵⁵ Lee KA, Shim JH, Kho CW, Park SG, Park BC, Kim JW, Lim JS, Choe YK, Paik SG, Yoon DY. Protein profiling and identification of modulators regulated by the E7 oncogene in the C33A cell line by proteomics and genomics. *Proteomics.* 2004; 4(3): 839-48.

⁵⁶ Achary MP, Jaggemauth W, Gross E, Alfieri A, Klinger HP, Vikram B. Cell lines from the same cervical carcinoma but with different radiosensitivities exhibit different cDNA microarray patterns of gene expression. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; 91: 39-43.

⁵⁷ Wong YF, Selvanayagam ZE, Wei N, Porter J, Vittal R, Hu R, Lin Y, Liao J, Shih JW, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Yip SK, Ngong DT, Siu N, Chan I.K, Chan CS, Kong T, Kutlina E, McKinnon RD, Denhardt DT, Chin KV, Chung TK. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(15): 5486-92.

⁵⁸ Chen Y, Miller C, Mosher R, Zhao X, Deeds J, Morrissey M, Bryant B, Yang D, Meyer R, Cronin F, Gostout BS, Smith-McCune K, Schlegel R. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res.* 2003; 63(8): 1927-35.

⁵⁹ J. Sambrock, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Pres. Segunda Edición. 1989

⁶⁰ Frederick M. Ausubel, Roger Brent. *Short Protocols in Molecular Biology*. Editorial Wilcy. Cuarta Edición 1999..

⁶¹ Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, Kalantari M, Chuang LS, Li BF, Bernard HU. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology.* 2004 Jul 1;324(2):483-92.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



APÉNDICE 1

CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES SELECCIONADOS.

Las características de los genes se recopilaron de las bases de datos del internet mencionadas en los materiales y métodos.

Gen six 1 (GC14M059102).

Los genes SIX de los vertebrados son homólogos de los genes “sine oculis” de *Drosophila*, los cuales son expresados primariamente en el sistema visual en desarrollo de la mosca. Los miembros de la familia de genes SIX codifican para proteínas que están caracterizadas por un heterodominio divergente de unión al DNA y un dominio SIX río arriba, el cual puede estar involucrado en determinar la especificidad de unión al DNA y en mediar las interacciones proteína - proteína. Los genes de la familia SIX han mostrado que juegan papeles en el desarrollo de insectos y vertebrados o han sido implicados en el mantenimiento del estado diferenciado de los tejidos. El gen six-1 se expresa principalmente en tejido muscular esquelético y liso. Su producto es una proteína de 284 aminoácidos de 32210 Da, cuya función parece estar involucrada en el desarrollo de tendones y ligamentos (por similitud). Su localización celular es nuclear y pertenece a la familia de genes SIX/SINE oculis homeobox.

Gen rab3d (GC19M011296).

El producto del gen rab3d es una GTPasa Ras-like, la cual es un regulador clave del transporte intracelular de vesículas durante la exocitosis. Se ha mostrado que las GTPasas Rab3 son abundantes en las células con rutas de secreción reguladas y se piensa que confieren la especificidad de anclaje y fusión durante la exocitosis regulada. A diferencia de otras isoformas Rab3, la rab3d está enriquecida en un número de tejidos no neuronales y localizada en los gránulos secretorios en el citoplasma de estas células. La proteína que codifica es de 219 aminoácidos con un peso de 24267 Da. El gen es altamente expresado en granulocitos de sangre periférica. Se expresa constitutivamente a bajos niveles en todas las líneas celulares hematopoyéticas que se han investigado y se activa durante la diferenciación mielóide. Pertenece a la subfamilia Rab y a la superfamilia de las GTPasas pequeñas. Se le ha asociado a tumores de glioma recurrente, tumores metastáticos de colon, tumores de mama, próstata y cerebro.

Gen ptgs2 (GC01M183879).

El producto de este gen es la prostaglandin endoperoóxido sintasa (PTGS), también conocida como ciclooxigenasa, que es la enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas, y actúa como una dioxigenasa y como una peroxidasa. Existen dos isotipos de la PTGS: una PTGS1 que es constitutiva y la PTGS2 que es inducible, las cuales difieren en su regula-

ción de la expresión y en la distribución en los tejidos. Este gen codifica para la PTGS2, que en los humanos se expresa en un número limitado de tipos celulares y es regulada por eventos estimulantes específicos, sugiriendo que es responsable de la biosíntesis de prostanoïdes, los cuales a su vez están involucrados en la inflamación y en la mitogénesis. La expresión de este gen está desregulada en tumores epiteliales. PTGS2 un potente mediador de la inflamación y mitógeno y juega un papel menor en la carcinogénesis colorectal, se sobreexpresa en carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, y putativamente ha sido involucrada en la respuesta del tejido tumoral a la necrosis. Otra de sus funciones es como transportador de electrones, ya que es una óxidorreductasa. PTGS2, de 604 aminoácidos, y 68,996 Da de masa molecular, participa en el primer paso en la formación de prostaglandinas y tromboxanos. Se le encuentra asociada a membrana de los microsomas. Su expresión se induce por la presencia de citocinas y mitógenos. Esta enzima es el blanco de los antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina. Pertenece a la familia de prostaglandina G/H sintasa. Se le ha encontrado sobreexpresada en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y en retinoblastoma, en adenocarcinomas de colon y tumores mamarios. En la figura 39 se observa un esquema de las rutas en las que participa.

potencial tumorigénico de las células cuando está sobreexpresado y codifica para un factor de transcripción putativo. La formación de un complejo fuerte con el gen p53 puede inhibir la transactivación mediada por p53. MDM2 se enlaza a p53 y la amplificación de MDM2 en sarcomas lleva a un escape del control de crecimiento regulado por p53. Este mecanismo de tumorigénesis paralelo al de los tumores inducidos por virus en los cuales los productos de los oncogenes virales se enlazan e inactivan funcionalmente a p53. La sobreexpresión del oncogen *mdm2c* se encontró en leucemias. La inactivación de los genes supresores de tumor lleva a una desregulación de la proliferación celular y es un factor clave en la tumorigénesis humana. MDM2 interactúa físicamente y funcionalmente con la proteína RB y puede inhibir su capacidad de regulación de crecimiento. Tanto la proteína p53 como RB pueden ser sujetas de regulación negativa por el producto de un solo protooncogene celular. El gen *mdm* sufre empalme alternativo produciendo 5 variantes de transcrito a partir del gen completo. Los transcritos alternativos tienden a ser expresados en tejido tumoral, mientras que el *mdm2* completo es expresado en tejido normal. Su función principal es como punto de control en G1 para la supervivencia celular. Su expresión está amplificada en sarcomas humanos, en gliomas malignos, angiosarcomas, liposarcomas bien diferenciados y en astrocistoma anaplástico y en linfomas difusos de células B. Se encuentra sobreexpresado en leucemias. En la figura 40 se muestra un diagrama de las rutas de señalamiento en las que participa.

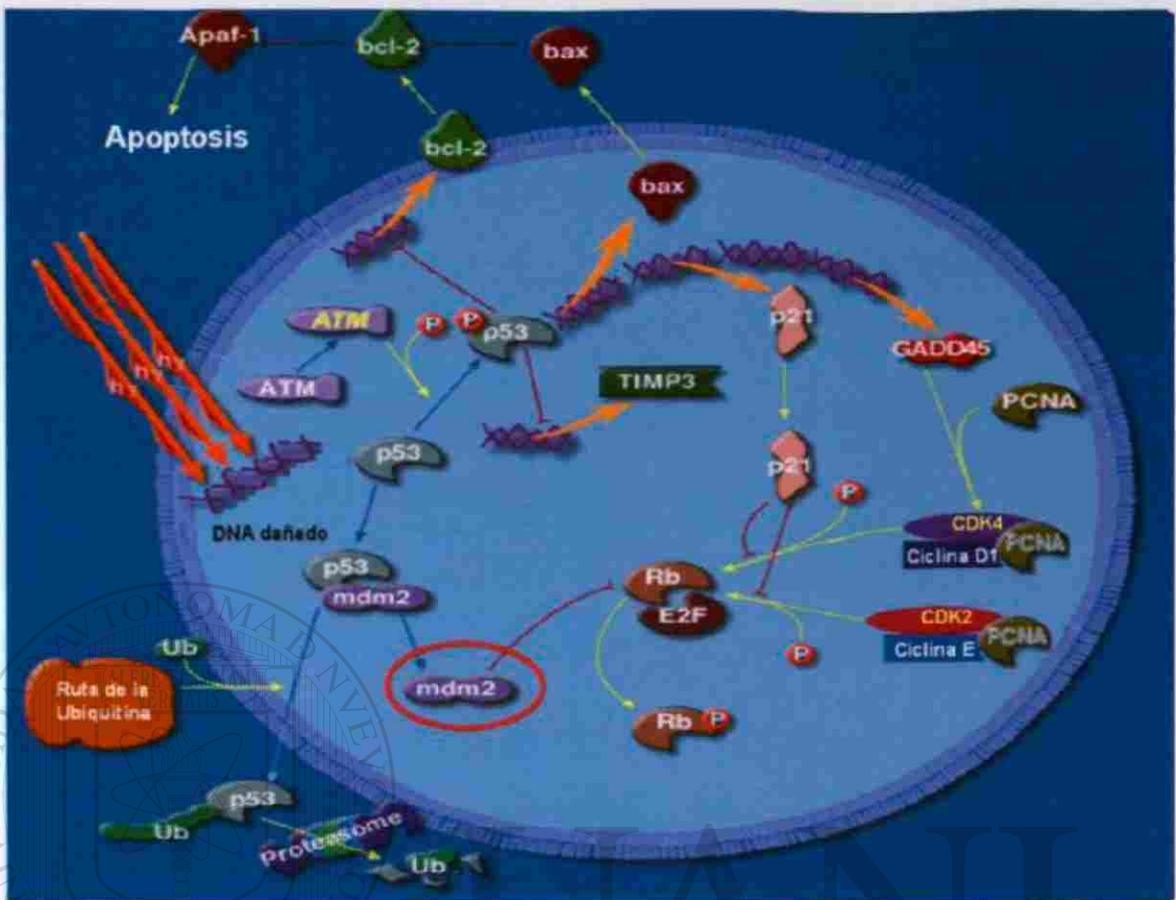


Figura 40. Rutas donde participa el gen mdm2c en el ciclo celular. El gen mdm2 interactúa con p53 y la inactiva, previniendo con esto las funciones de p53. También capacidad de bloquear las funciones de Rb. Debido a que tiene efectos de regulación negativa sobre dos de los principales controladores del ciclo celular a este gen se le ha relacionado con muchos procesos de desarrollo de cáncer. www.biocarta.com

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Gen hla-e (GC06P030563).

El hla-e pertenece a la clase I de HLA de parálogos de cadenas pesadas. Esta clase I de molécula es un heterodímero que consiste de una cadena pesada y una cadena ligera (beta-2 microglobulina). La cadena pesada está anclada a la membrana. La proteína hla-e se enlaza a un subgrupo de péptidos derivados de los péptidos líderes de otras moléculas clase I. La cadena pesada es de aproximadamente 45 kDa y su gen contiene 8 exones. El exón uno codifica para el péptido líder, los exones 2 y 3 codifican para los dominios alfa 1 y alfa2,

los cuales se enlazan al péptido, el exón 4 codifica para el dominio alfa 3, el exón 5 para la región transmembranal y los exones 6 y 7 para la cola citoplasmática. Se localiza en la membrana plasmática y su función parece tener características estructurales que le confieren especificidad para el enlace con el péptido a presentar en correlación con la unión de un péptido líder de la clase I de MHC. También juega un papel central en la inmunotolerancia durante el embarazo temprano, modulando la producción de citocinas de células dendríticas generadas de monocitos durante las primeras etapas del embarazo. La expresión de este gen y la interacción de su producto con el receptor CD94/NKG2 de las células NK, evita que las células sean atacadas por ellos. La proteína es de 358 aminoácidos con un peso de 40130 Da. En la figura 41 se muestra un diagrama esquemático de su función como marcador de membrana.

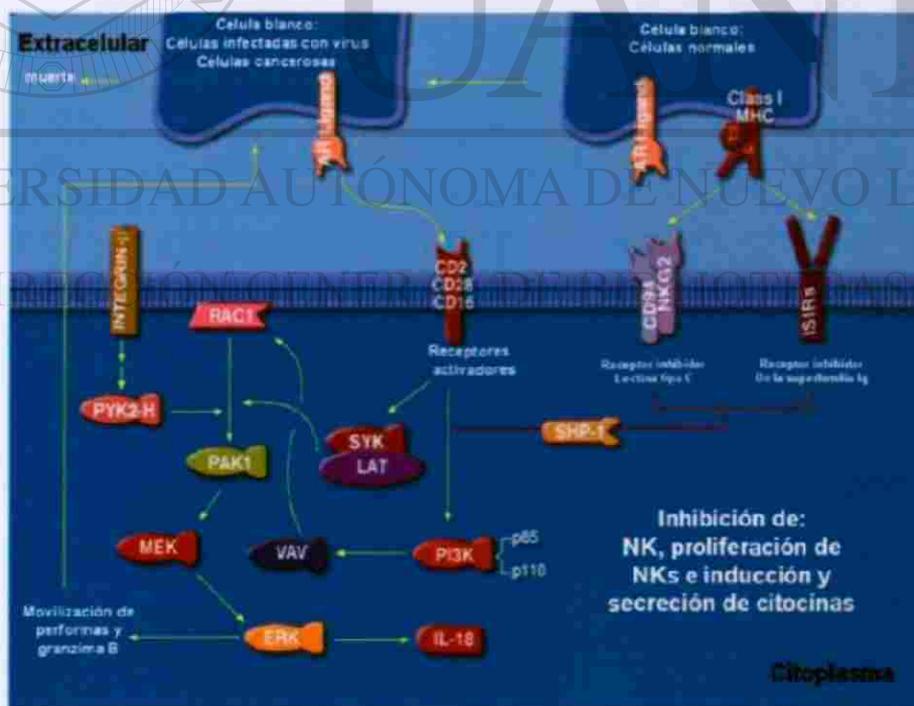


Figura 41. Esquema donde se muestra la función de hla-e. Este marcador de membrana debe interactuar con el receptor CD94/NKG2 para evitar que este ataque a la célula. Las células que no presentan la proteína hla-e son atacadas por perforinas del NK. www.biocarta.com

Gen bripl (GC17M060234).

La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia RecQ DEAH helicasa e interactúa con las repeticiones BRCT del BRCA1. El complejo unido es importante en la función normal de reparación de rupturas de la doble hebra de BRCA1. Al igual que el gen BRCA1, este gen puede ser un blanco de mutaciones inductoras de cáncer de línea germinal. Mutaciones en este gen han sido asociadas a cáncer de mama. En la figura 42 se observa un diagrama esquemático de su participación en la ruta de señalamiento del BRCA1.

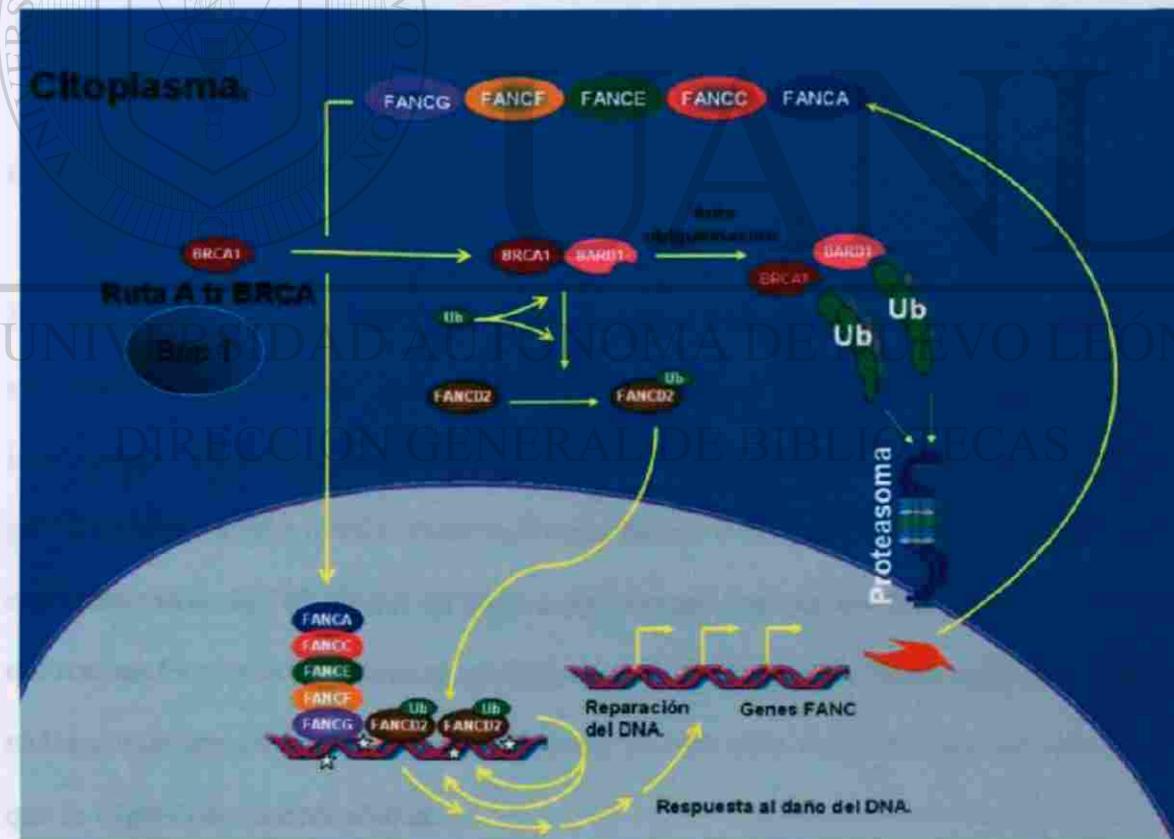


Figura 42. Dibujo esquemático de la función del gen BRCA1. Para que BRCA1 sea activo este tiene que interactuar primero con bripl para que sea funcional y pueda participar en el resto de la cascada de reacciones. www.biocarta.com

Gen rab27B (GC18P050644).

Este gen codifica para una proteína de 218 aminoácidos con un peso de 24608 Da. Esta proteína se encuentra asociada a membrana, y pertenece a la superfamilia de pequeñas GTPasas, de la subfamilia RAB. También se encuentra en gránulos del citoplasma. Su expresión primaria es en testículos. Juega un efecto clave de exocitosis de gránulos citotóxicos, vesículas de transporte y en la dinámica de organelos, manejando el transporte y fusión de vesículas con sus receptores de membrana apropiados.

Gen emk-1 (GC11P063382).

La proteína EMK (E1.K1. motif kinasa) es miembro de una pequeña familia de proteínas cinasas ser/thr involucradas en el control de la polaridad de la célula, estabilidad de microtúbulos y cáncer. Varias clonas de DNAc han sido aisladas que codifican dos isoformas de la proteína cinasas ser/thr EMK1. Estas isoformas fueron caracterizadas por la presencia de un exón alternativo de 162 pb que da lugar a dos formas, una que contiene el exón y otra que no. Ambas formas se encontraron coexpresadas en un número de líneas celulares seleccionadas y muestras de tejido. La EMK1 humana mostró estar codificada por un solo mRNA que se expresa de manera ubicua.

Gen ppp4c (GC16P030126).

Este gen produce una proteína de 307 aminoácidos con un peso de 35080 Da. Puede estar involucrado en la organización de microtúbulos. Se localiza en el citoplasma y en el núcleo, así como en los centrosomas. Pertenece a la familia PPP de fosfatasas, de la subfamilia PP-X. Putativamente involucrada en la regulación de la mitosis. Se localiza en el citoplasma, citoesqueleto, microtúbulos, y centrosomas. Varias translocaciones de este gen han sido asociadas con leucemia aguda.

Gen stat5b (GC17M040726).

La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia STAT de factores de transcripción. En respuesta a citocinas y a factores de crecimiento, los miembros de la familia stat son fosforilados por el receptor asociado a cinasas, y luego forman homo o heterodímeros que se van al núcleo celular donde actúan como activadores transcripcionales. Esta proteína media la señal de transducción activada por varios ligandos celulares tales como la IL2, IL4, el CSF1 y diferentes hormonas de crecimiento. Se ha demostrado que está involucrada en diversos procesos biológicos, tales como señalador de TCR, en la apoptosis, en el desarrollo de las glándulas mamarias en los adultos, y en el dimorfismo sexual de la expresión genética del hígado. Este gen se encontró que se fusiona al receptor alfa del ácido retinoico (RARA) en un pequeño subgrupo de leucemias promielocíticas agudas (APLL). La desregulación de las rutas de señalamiento mediadas por esta proteína puede ser la causa de APLL. La proteína es de 786 aminoácidos con un peso de 89880 Da. Funciona en la trans-

Gen rab23 (GC06M057100).

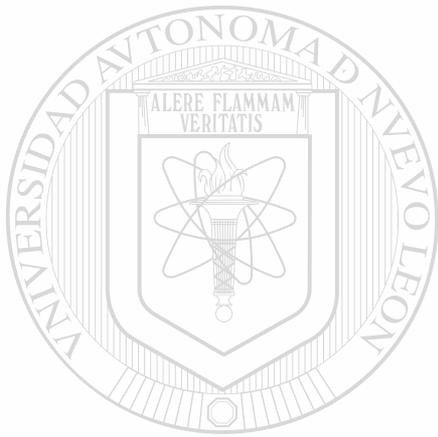
Codifica para una proteína de 237 aminoácidos, de 26659 Da de peso. Pertenecce a la super-familia de GTPasas pequeñas de la familia Rab considerándosele un protooncogen.

Gen frap1. (GC01M010876).

La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de las cinasas relacionadas a fosfatidilinositol cinasa. Estas cinasas median respuestas celulares a estrés tales como daño al DNA y falta de nutrientes. Esta proteína actúa como el blanco del FKBP12-rapamicina que arrestan el ciclo celular y genera efectos inmunosupresivos. El gene CDT6 esta localizados en un intrón de este gen. La proteína es de 2549 aminoácidos de 288888 Da. Se considera un anti-oncogen. Lleva a G1 en la progresión del ciclo celular.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



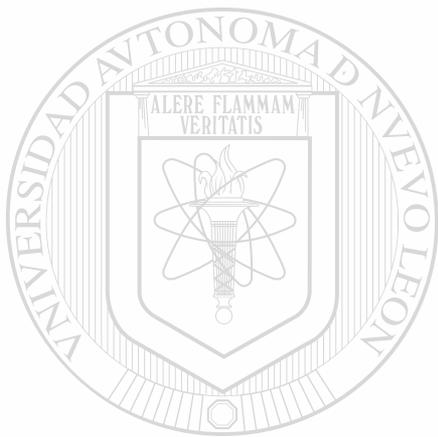
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

