

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

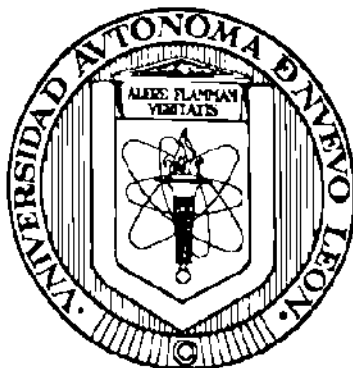
Septiembre, 2004

TD
RC280
.U8
B6
2004
c.1



1080126305

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



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

TESIS PRESENTADA POR:

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

TO

RL280

.08

BL

2004

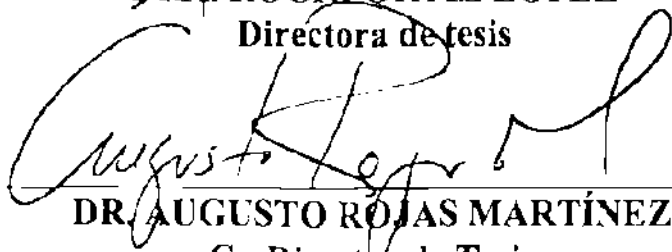


ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL CÁNCER CERVICAL

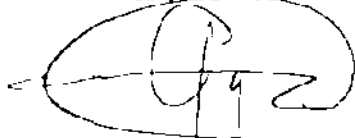
Aprobación de Tesis:



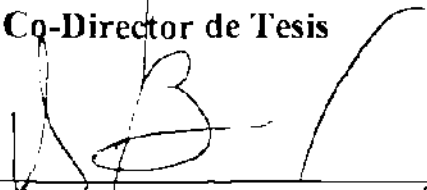
DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ
Directora de tesis



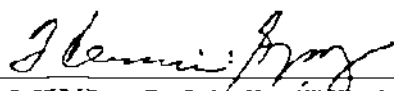
DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Co-Director de Tesis



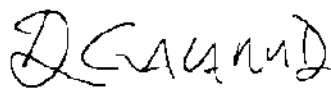
DR. RICARDO M. CERDA FLORES
Co-Director de Tesis



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



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.

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

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.

...

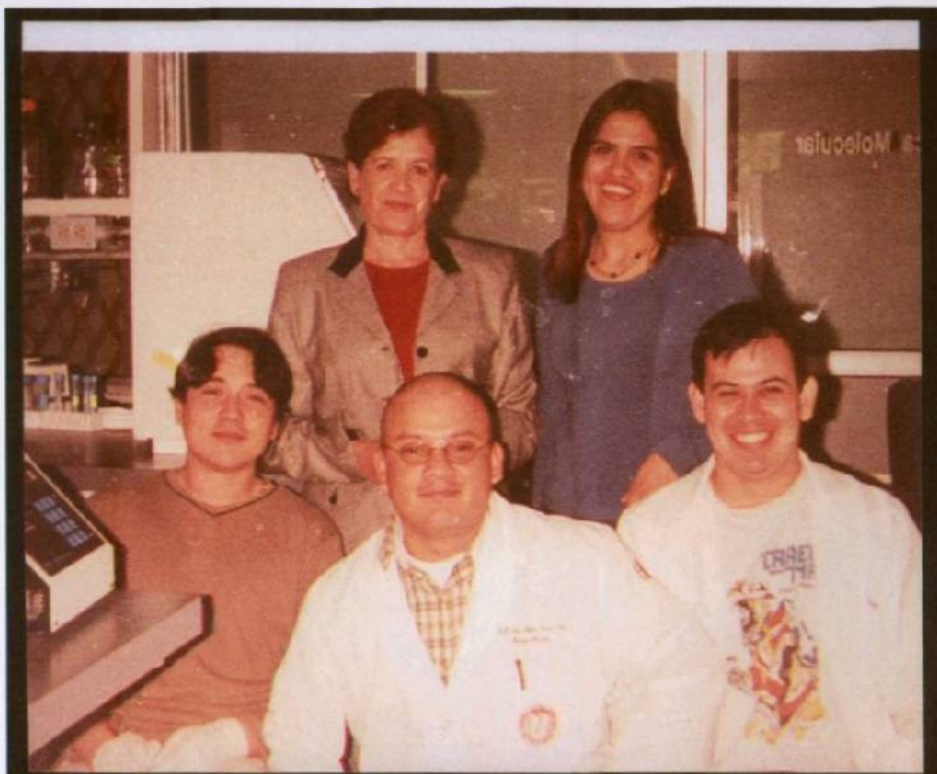
A Fabiola, por tu paciencia, por tu ayuda, por tu tiempo, por tu ánimo, por tu contagiosa frescura en la forma de ver la vida, por haber estado conmigo, gracias.

...

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

**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 HPVs.	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
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 dcc1. (MGC5528).	77
4.3.6.2. Genes subexpresados en el sistema C33A/TCN.	78
4.3.6.2.1. Gen ptgs2 (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	
CARÁCTERÍSTICAS 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
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 SiHa/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