

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^{1,2,3}.

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 anormalidades 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.

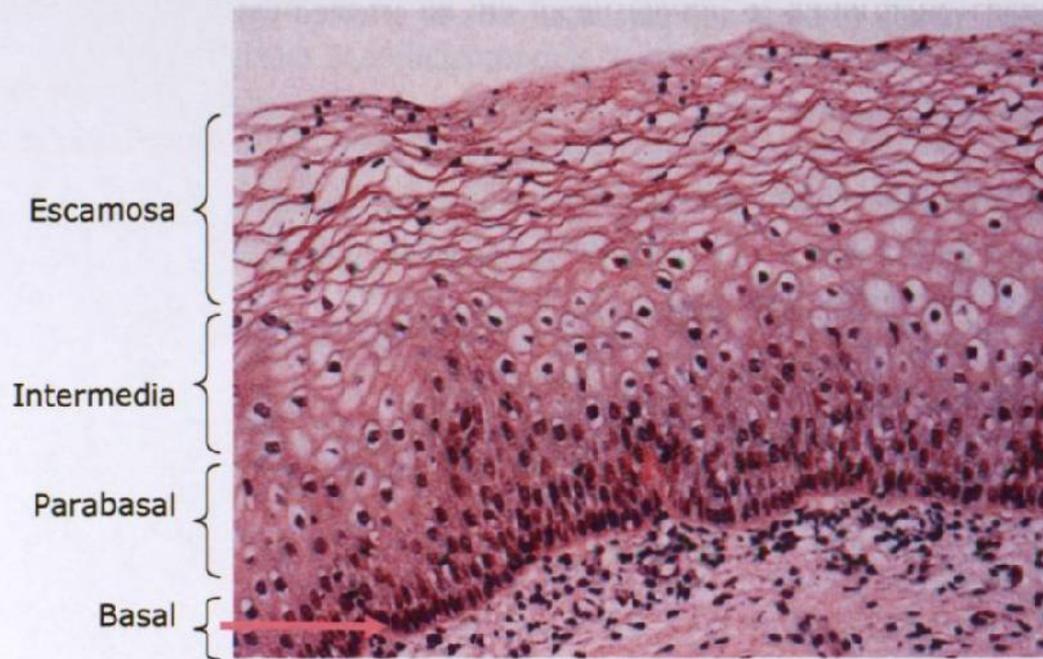


Figura 1. Epitelio cervical normal. Se observan las cuatro capas principales de la zona de transición del epitelio cervical normal, comenzando en la parte inferior con la capa basal, luego la parabasal, intermedia y escamosa, con estas tres últimas proliferando a partir de la capa basal¹⁶.

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.

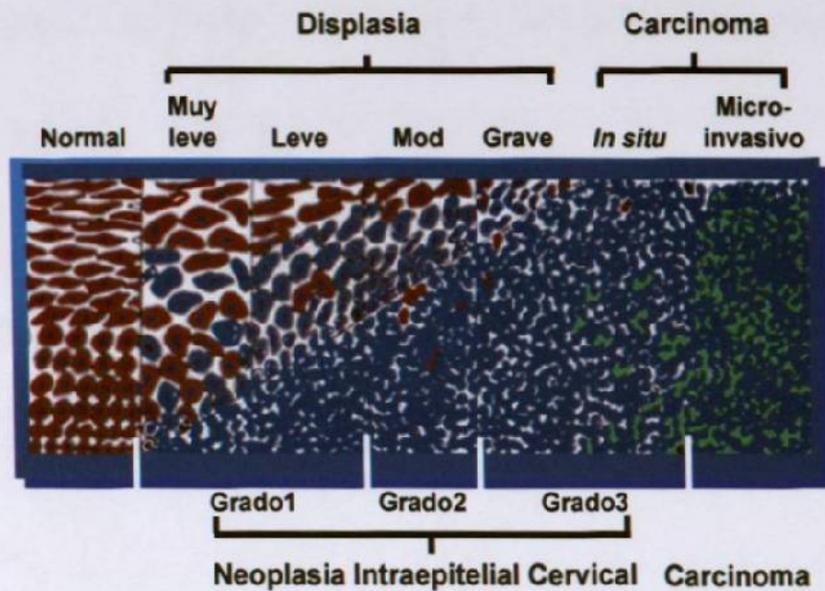


Figura 2. Esquemas de clasificación de progresión y estadios del CaCU. Existen dos esquemas de clasificación del grado de avance del CaCU, el primero (arriba) puede diferenciar entre displasia y carcinoma y establece niveles de desarrollo que van desde muy leve hasta carcinoma microinvasivo. El segundo (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 cervix 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 HPVs 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 fistulas 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 CaCU 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 sí 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}.

1.2.1. Biología Molecular del HPV.

Los HPVs son virus de DNA pequeños, no envueltos, con un genoma circular de doble cadena de aproximadamente 7,200 a 8,000 pb. Todos sus marcos de lectura abierta (ORFs) están restringidos a una sola cadena. Las secuencias codificantes han sido clasificadas como tempranas (E, del inglés early) y tardías (L, del inglés late), para indicar su secuencia de expresión en el ciclo de vida viral. (Ver figura 3).

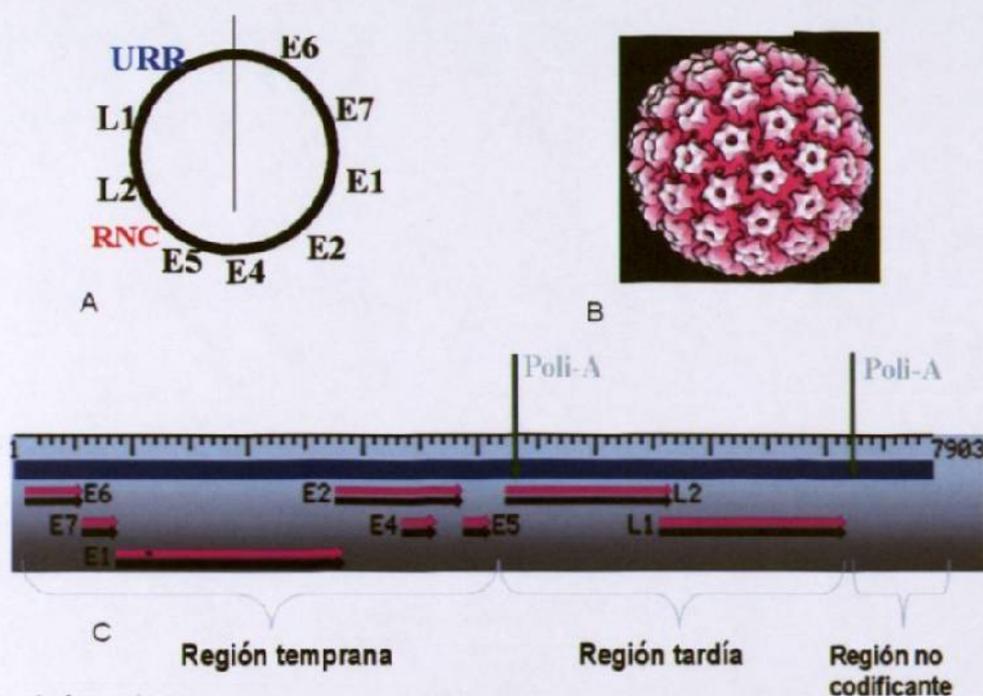


Figura 3. Anatomía del virus del papiloma humano tipo 16. A) El genoma viral consta de 7904 pares de bases distribuidas en 8 genes y una región reguladora (URR). B) Presenta una cápside compuesta por las proteínas L1 y L2. C) Muestra los sitios de poliadenilación, ubicados al final del gen E5 y de L1, respectivamente.

Los genomas de HPV contienen hasta ocho genes tempranos y la mayoría contienen los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (E3 se encuentra solamente en los BPV1). Estos codifican para la replicación viral y transformación celular, y la expresión de estos genes pue-

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 LCR, 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.

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 involucra 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 compite 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 E. 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.

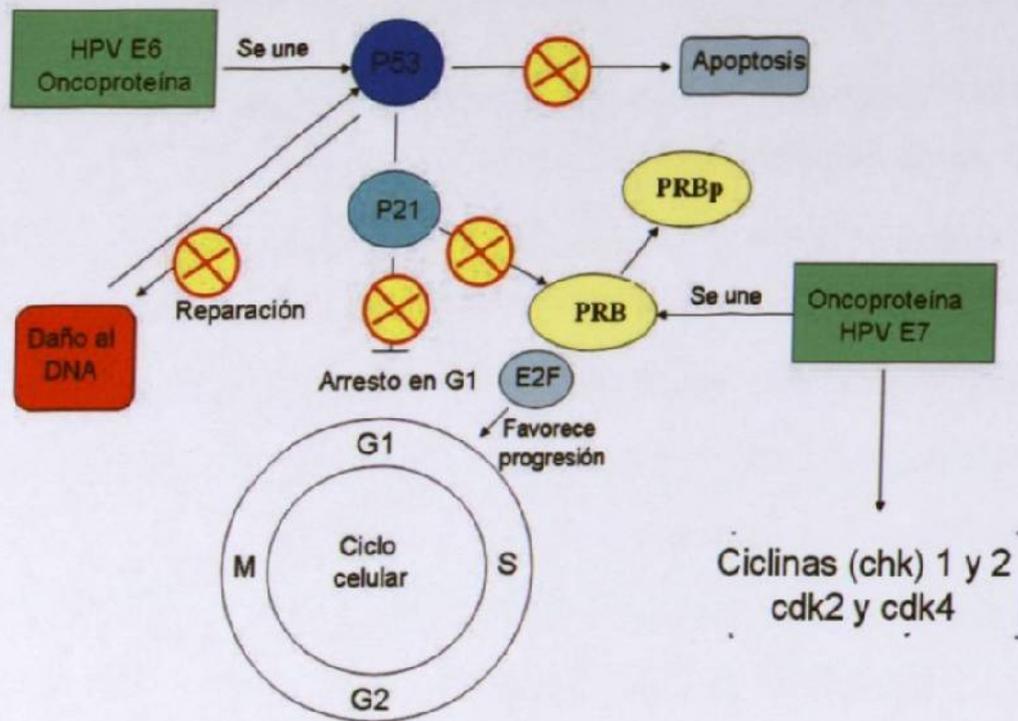


Figura 4. Esquema general de la regulación del ciclo celular. Cuando hay daño en el DNA, éste se detecta y la célula responde activando factores de reparación e inhibidores de la progresión del ciclo celular. Dos de las proteínas que responden al daño del DNA son la supresora de tumor P53 y la ciclina 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.

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 está claro³⁹.

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 HHPVs 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 infección 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 esto, 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 Northern, 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 sí 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

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 o 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

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

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

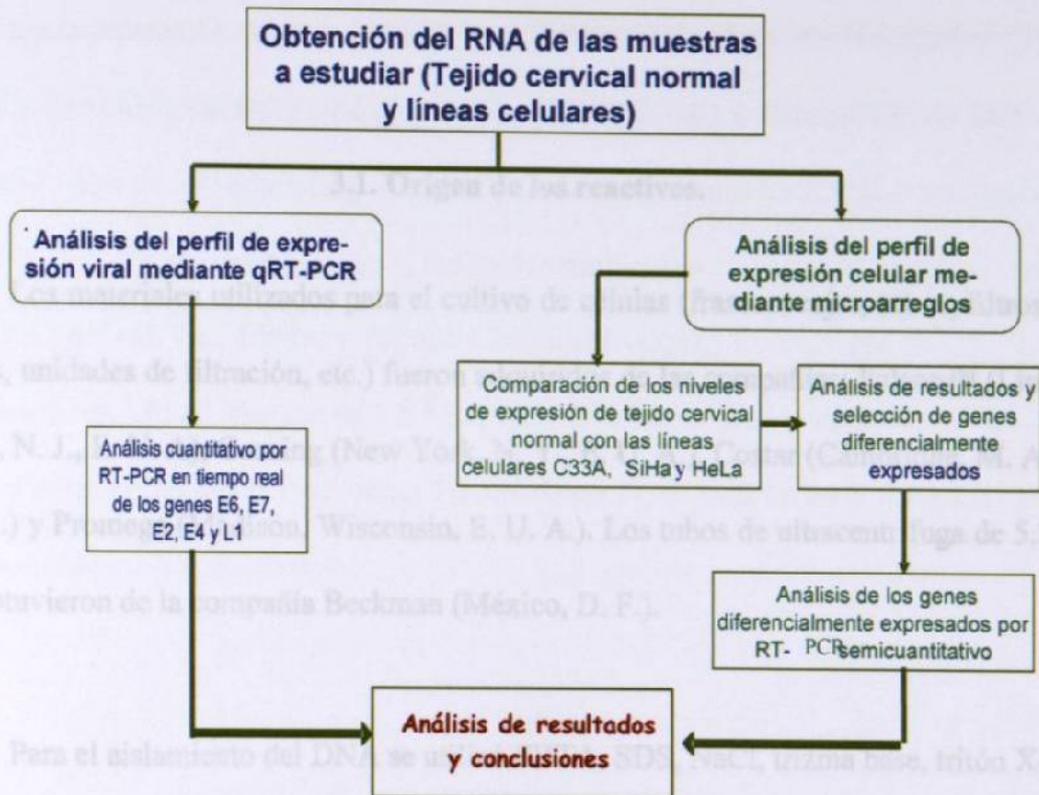


Figura 5. Esquema general del desarrollo experimental. La estrategia consistió en la obtención de RNA de los tejidos a estudiar y líneas celulares y llevar a cabo estudios de expresión de los genes virales seleccionados y el estudio de expresión de los genes celulares mediante microarreglos, para luego, 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 ultracentrífuga 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), ultracentrífuga Beckman modelo TLX120, un termociclador de la compañía MJ Research Inc (San Francisco, CA, E. U. A.) modelo PT100, una fuente de poder Gibco BRL, 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 Later®) 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 ULIEG, 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 µl de PBS. Las células luego se trataron con proteinasa K (10 mg/ml) agregando 20 µl 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 Sambrock 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 (50µl de la muestra y 950 µl 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 ultracentrífuga 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.

TABLA 2
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 μ l 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 10 copias	pHPV16 100 copias	pHPV16 1000 copias	pHPV16 10000 copias	pHPV16 100000 copias	pHPV16 1000000 copias
pHPV16 10 copias	pHPV16 100 copias	pHPV16 1000 copias	pHPV16 10000 copias	pHPV16 100000 copias	pHPV16 1000000 copias
DNAc HeLa	DNAc SiHa	DNAc Caski	DNA HeLa	DNA SiHa	DNA Caski
DNAc HeLa	DNAc SiHa	DNAc Caski	DNA HeLa	DNA SiHa	DNA Caski
DNAc HeLa	DNAc SiHa	DNAc Caski	DNA HeLa	DNA SiHa	DNA 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).

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 μ g 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 μ l de agua MiliQ y se cuantificó.

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 μ l	17.5 μ l
Oligo d(T15,20)-Primer (1 μ g/ μ l)	1 μ l	1 μ l
5x RT reaction buffer (superscript II kit, invitrogen)	8 μ l	8 μ l
dNTP master mix	4 μ l	4 μ l
1 mM Cy3-dCTP	0 μ l	4 μ l
1 mM Cy5-dCTP	4 μ l	0 μ l
0.1 M DTT (superscript II Kit, invitrogen)	4 μ l	4 μ l
Superscript II (200 U, Invitrogen)	1.5 μ l	1.5 μ l
RNA	30 μ g (X μ l)	30 μ g (X μ l)
Volumen total	50 μ l	50 μ l

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 μ g) 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: $(n - \text{señal de fondo} / \Sigma n)$ 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

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 INICIADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES SELECCIONADOS

Six1		Rab3d	
Six1-1 5'	CTGGAGAGCCACCAGTTCCTC	Rab3d-1 5'	CTTCCTCAGTACTGTGGCA
Six1-2 3'	CACCTTAGGACCCCAAGTCCA	Rab3d-2 3'	GTTGACAGGAAGGAAGGGAT
Dcc1		Brip1	
dcc-1 5'	GAGATGGAAACACTGGAGCC	Brip1-1 5'	GCATACAGGGCCTTAAACCA
dcc-2 3'	GTGTTTGKTTTGAGGCCCTGT	Brip1-2 3'	CAGGTGTTCCTTCGGTATT
dccABC-1 5'	AGATGTGGTCCCTGTCTTGG	BripABC-1 5'	GGTTTGCTCGGGATGAACTA
dccABC-2 3'	GGTTGTTGGCTCCAGTGT	BripABC-2 3'	CAATGGTACCAACCCAAACC
Mdm2c		Hla-e	
Mdm2c-1 5'	CAGCTTCGGAACAAGAGACC	Hlae-1 5'	GATTTCCGAGTGAACCTGC
Mdm2c-2 3'	GGCCAAACTAGATCCACACTC	Hlae-2 3'	CCTCCATATCACAGCAGCAA
Ptgs2		Pah	
Ptgs2-1 5'	CACITTCITTTGGACTCTGCC	Pah-1 5'	ATGGGGCACAGTGTTC AAG
Ptgs2-2 3'	GICTTATGGCACATTCAGCC	Pah-2 3'	CAATCCTTTGGGIGTATGGG
Rab27b		Erk1	
Rab27b-1 5'	GGTGGGGAAGACAACATTC	Erk1-1 5'	CAAGCTGGACACCTTCTGTG
Rab27b-2 3'	CCATGTGGCGTGGTTACTC	Erk1-2 3'	CTCAGGCCGCTTATTTCTG
Ppp4c		Frap1	
Ppp4c-1 5'	CAAGGAGAGCGAAGTCAAGG	Frap1-1 5'	CCAGCAGGATATCAAGGAGC
Ppp4c-2 3'	TGAGCACCGTCTCATTGAAG	Frap1-2 3'	ATCCCACTGTGCTCCAACCTC
Stat5b		Rab23	
Stat5b-1 5'	GTTGGTGGAAATGACKTGGT	Rab23-1 5'	GGAAGATATGGAAGTCGCCA
Stat5b-2 3'	TGCTTGATCTGTGGCTTCAC	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 basándonos 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.

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
mdm2c	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 dcc1 no se incluyen porque esos genes no se pudieron amplificar

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.

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

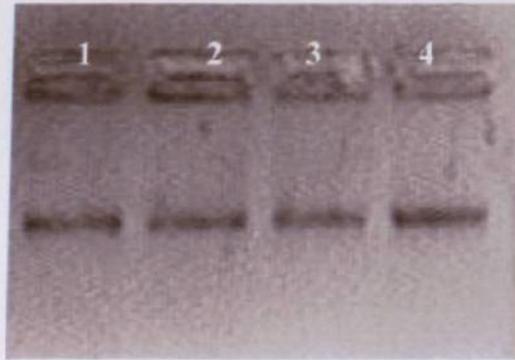


Figura 8. Extracción de DNA genómico a partir de líneas celulares y tejido cervical. El carril 1 corresponde a DNA de SiHa, el 2 a DNA de CaSki, el 3 a DNA de HeLa y el 4 a TCN. El gel es de agarosa al 1% en TBE 1X.

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.

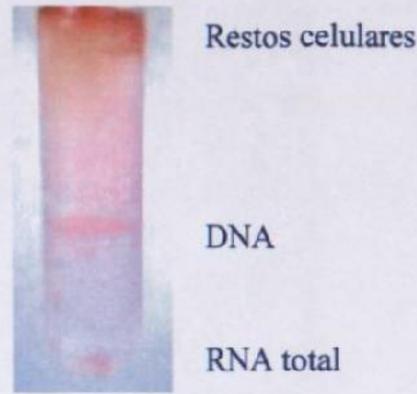


Figura 9. Resultado de la ultracentrifugación del lisado celular para la obtención de RNA. En la parte superior del tubo se observan los restos celulares. En la parte central se observa la banda correspondiente al DNA y en el fondo se observa el botón de RNA. El RNA se extrae perforando el tubo con una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

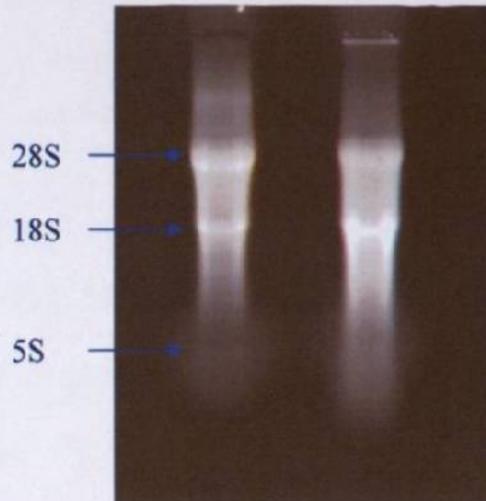


Figura 10. RNA obtenido por el método de ultracentrifugación de gradiente en cloruro de cesio. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1% con isotiocianato de guanidina (0.005 M) en TBE-DEPC 1x.

4.2. Análisis del perfil de expresión de los genes virales

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.

4.2.2 Gen E7.

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.

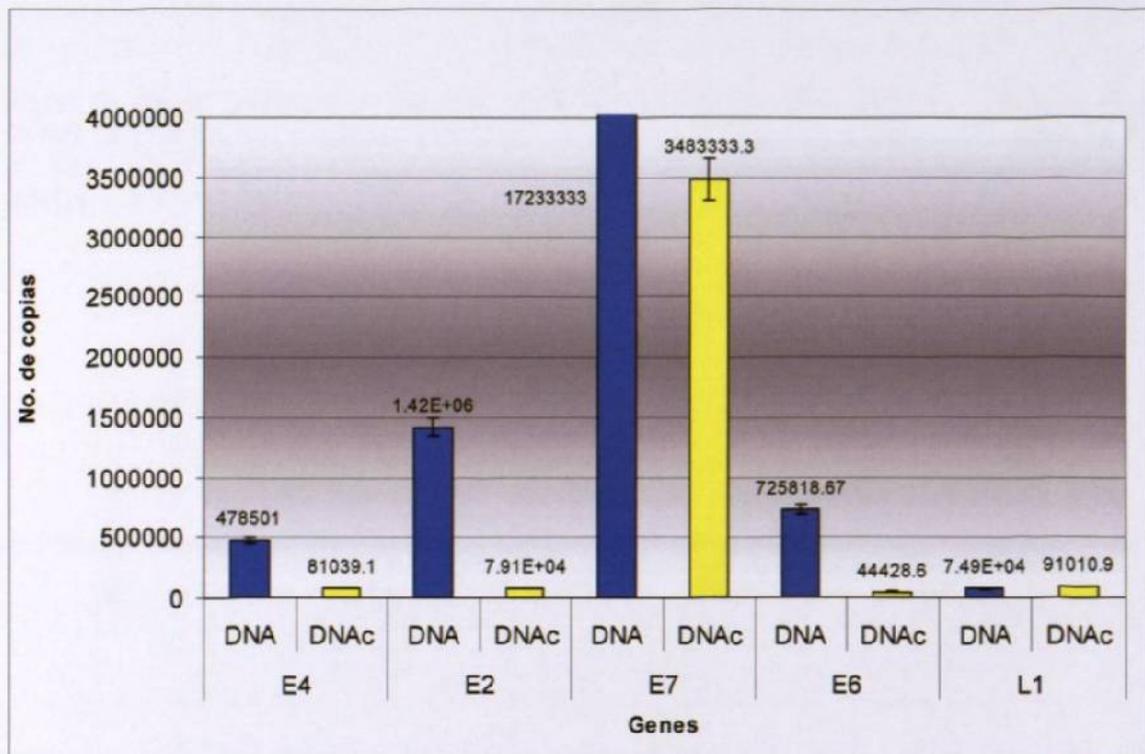


Figura 11. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en CaSki. En esta figura se grafican en amarillo los niveles de expresión (transcritos) y en azul el número de copias, para los genes E4, E2, E7, E6 y L1 en la línea celular CaSki. *Nota:* Los números de copias se 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.

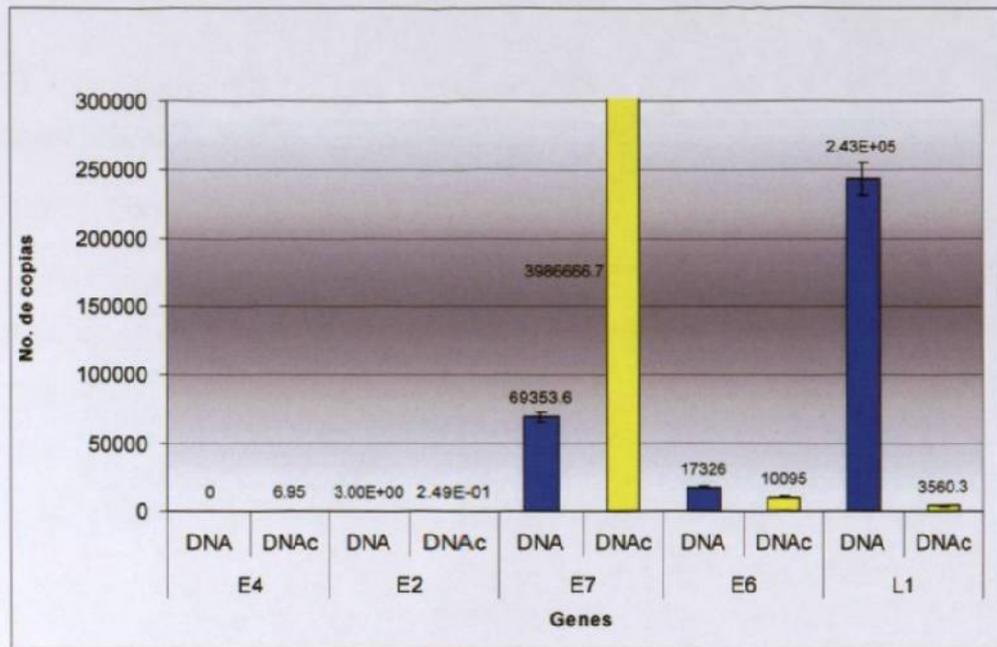


Figura 12. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en SiHa. En esta figura se grafican los niveles de expresión de los genes y el número de copias de los genes E4, E2, E7, E6 y L1 en la línea celular SiHa. *Nota:* en este caso, la barra correspondiente al DNAC de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

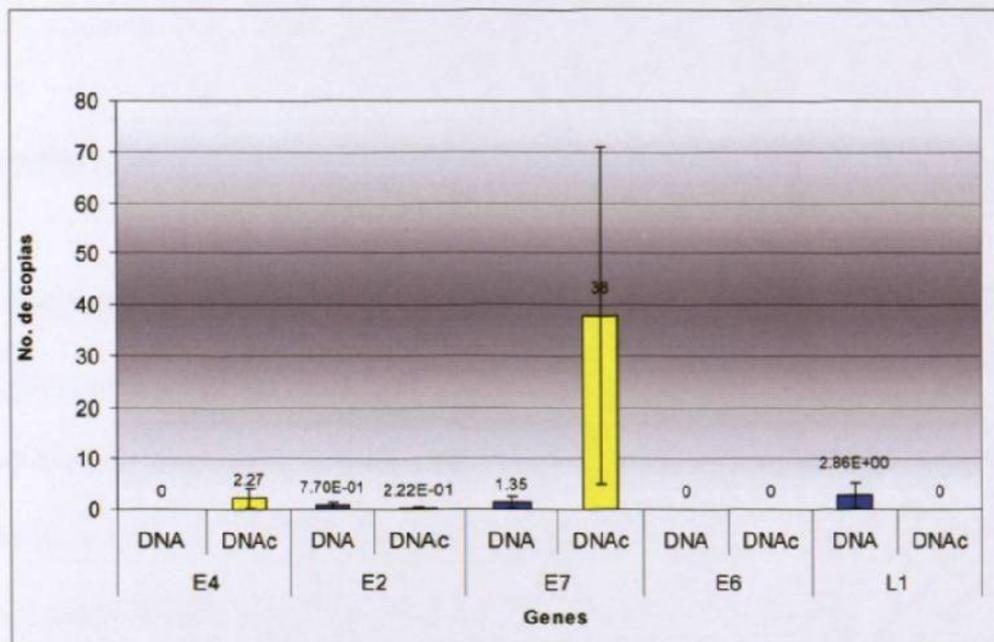


Figura 13. Niveles de expresión y número de copias de los genes seleccionados de HPV-16 en HeLa. En esta figura se grafican los niveles de expresión de los genes y el número de copias de los genes E4, E2, E7, E6 y L1 en la línea celular HeLa. La mayoría de los resultados son de "cero", y en la barra 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.

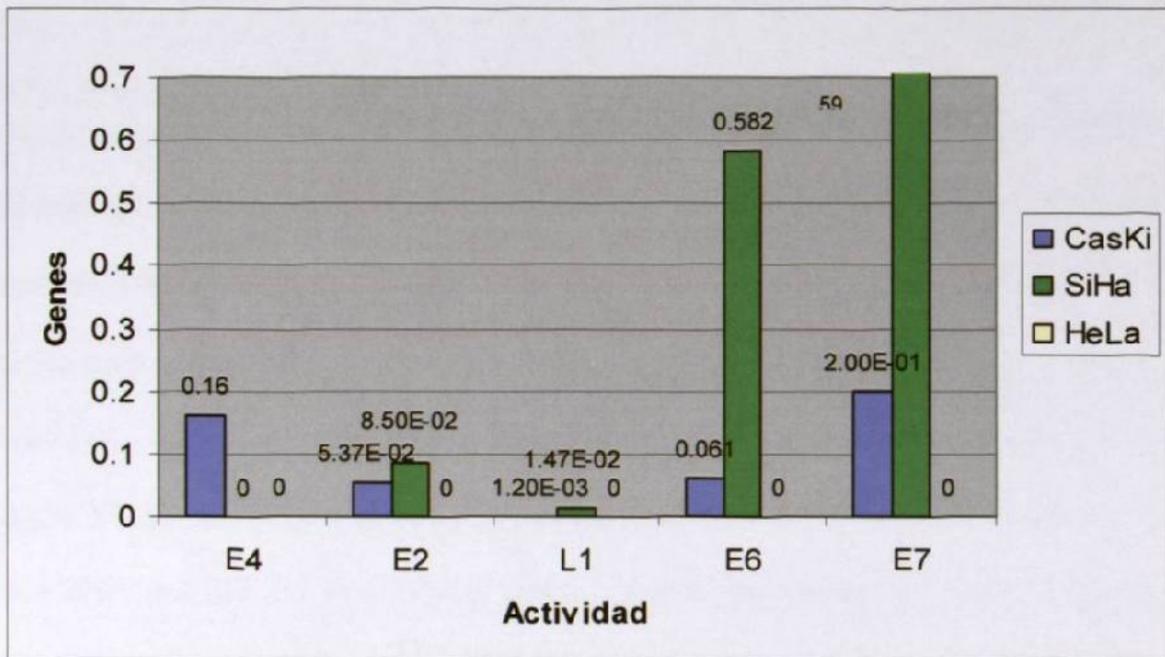


Figura 14. Niveles de actividad de los genes seleccionados de HPV-16 en CasKi, SiHa y HeLa. En esta figura se grafican los niveles de actividad de los genes seleccionados en cada línea celular. La mayor actividad se observó en los genes de SiHa. La barra de actividad de E7 en SiHa está recortada para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

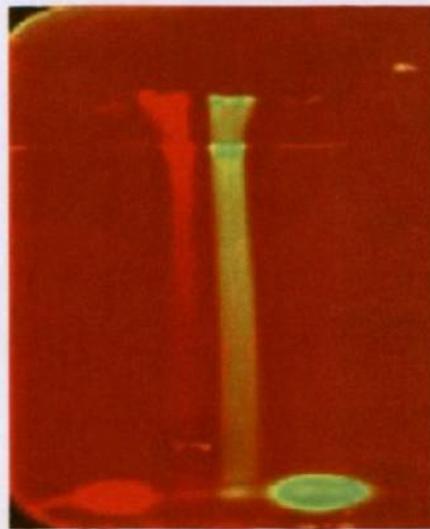


Figura 15. Resultado de la síntesis y marcaje de DNAc para la hibridación a gran escala. En el carril 1 está el colorante Cy5 sin RNA, en el carril 2 RNA marcado con Cy5, en el carril 3 RNA marcado con Cy3 y en el carril cuatro Cy3 sin RNA. Como se puede observar en los carriles donde no hay RNA el colorante 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.

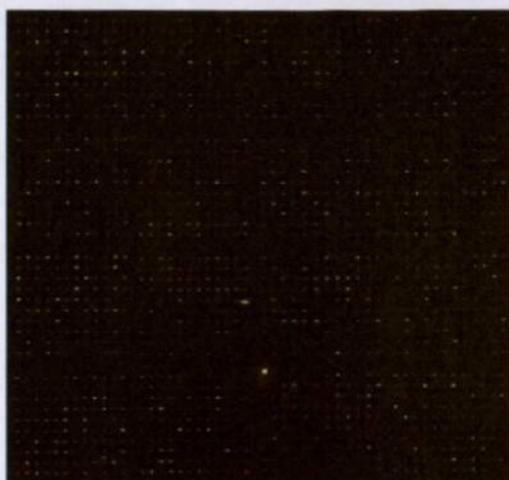
4.3.3. Normalización y transformación de los datos.

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

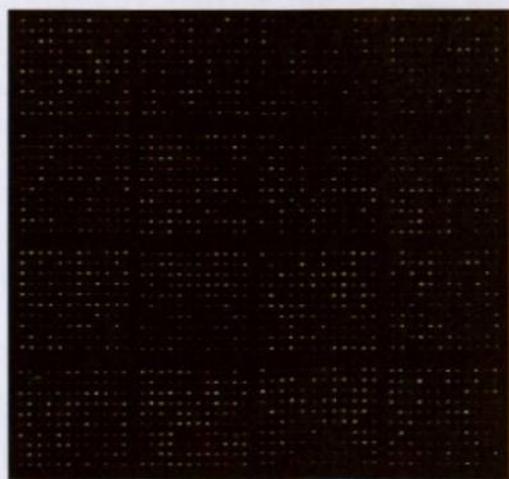


Figura 16. Imágenes de los resultados de la hibridación a gran escala en los tres sistemas de análisis de expresión. De arriba hacia abajo corresponde a: C33A/Tejido cervical normal, HeLa/Tejido cervical normal y SiHA/tejido cervical normal.