

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

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

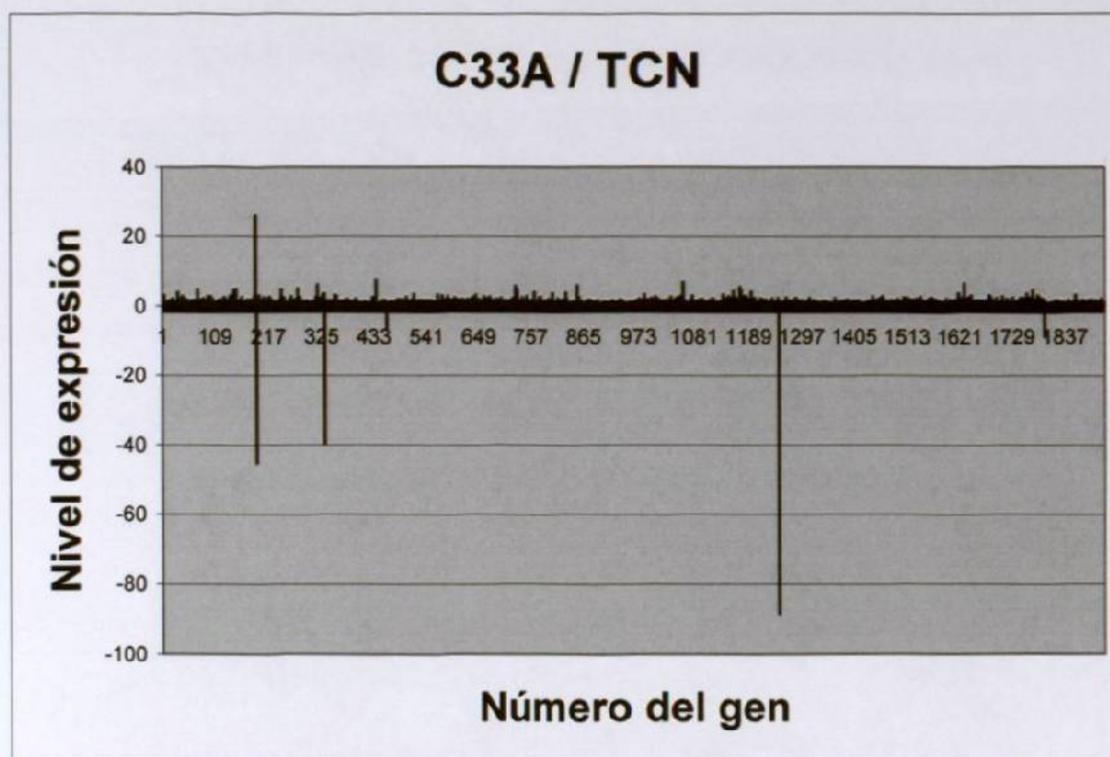


Figura 18. Gráfica de los datos normalizados. Una vez procesados los datos se obtuvieron las diferencias en los niveles de expresión de cada gen en cada sistema de expresión estudiados. Al graficar, poniendo el nivel de expresión en el eje "y" los genes en el eje "x" se obtuvo una gráfica como la que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

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

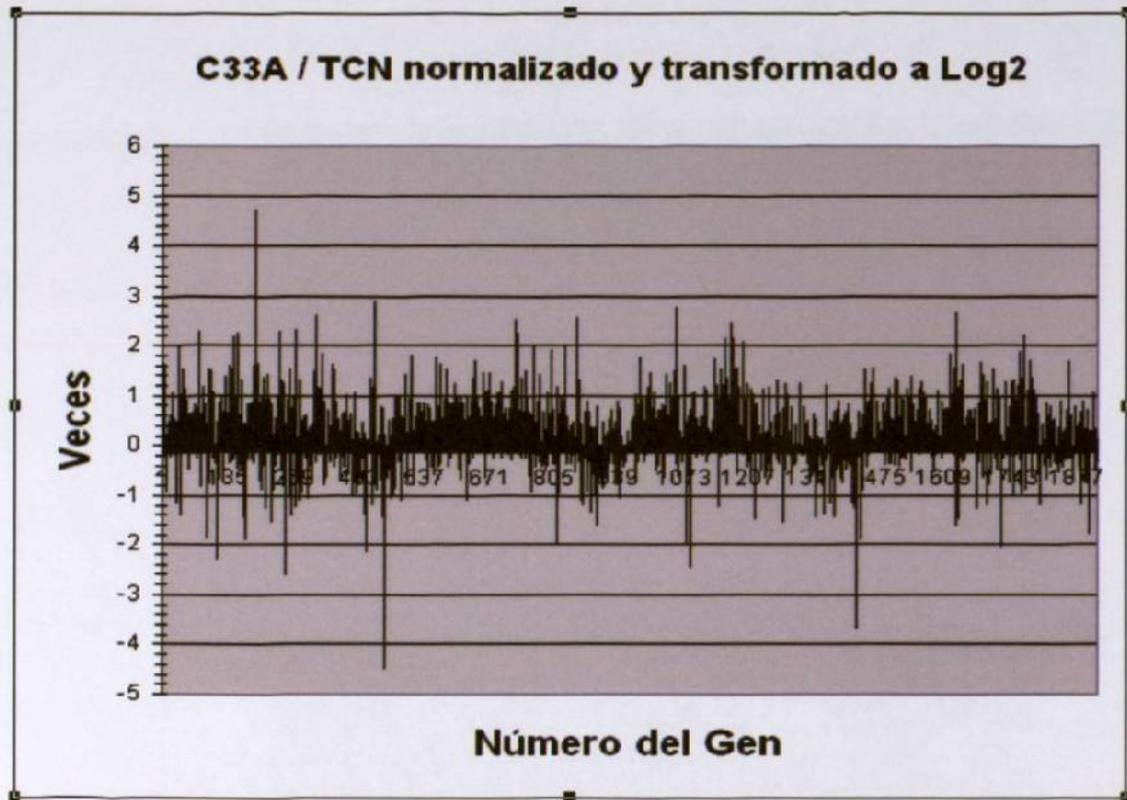


Figura 19. Datos normalizados y transformados. Como se apreciaba en la figura 18, los cambios en la expresión en algunos genes eran muy pronunciados, lo cual al graficar enmascara los niveles de expresión de genes que no tienen cambios tan grandes. Para evitar esta situación, todos los datos son transformados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

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

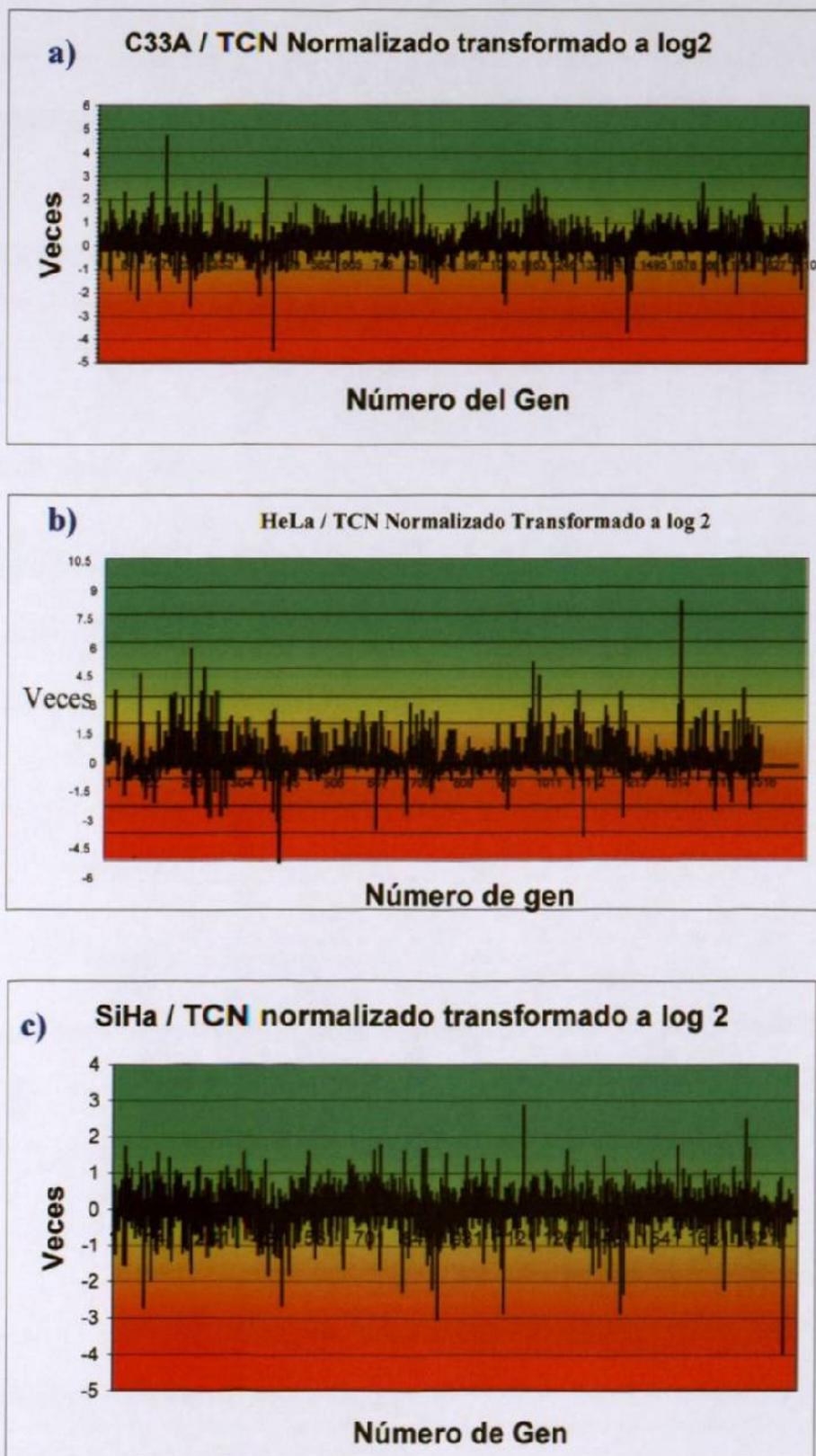


Figura 20. Gráficas de los tres sistemas analizados, con los resultados normalizados y transformados. Se muestran los tres sistemas de expresión analizados: a) C33A/TCN, b) HeLa/TCN y c) SiHa/TCN.

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

4.3.4. Selección de los genes.

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

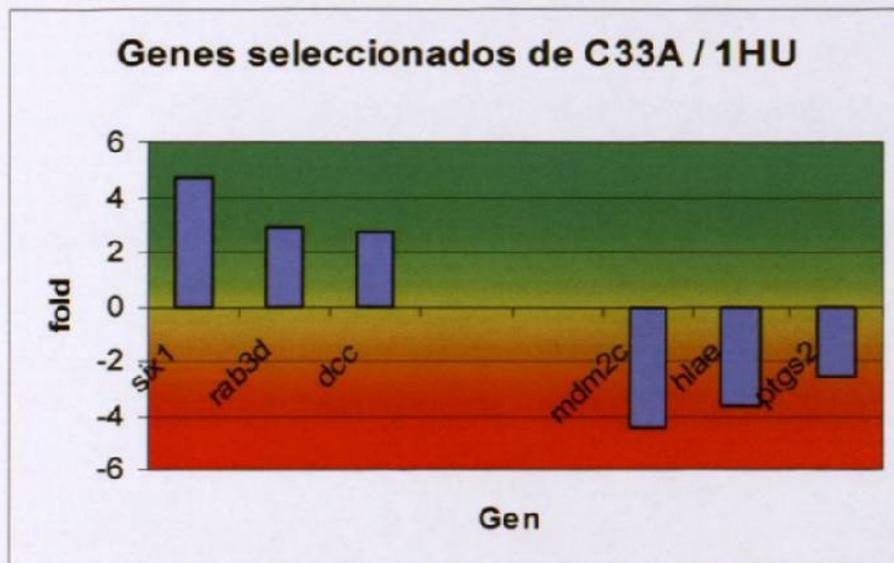


Figura 21. Genes seleccionados en el sistema C33A/TCN. En el eje y se muestran los niveles de expresión y en el eje x los genes seleccionados. Los genes sobre-expresados son six1, rab3d y dcc1 y los genes sub-expresados son mdm2c, hla-e y ptgs2.

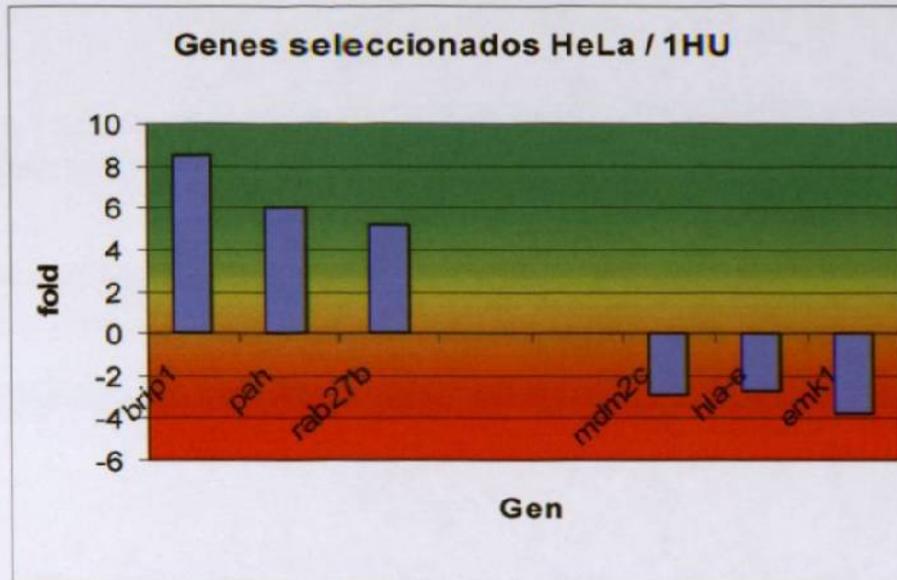


Figura 22. Genes seleccionados en el sistema HeLa/TCN. En el eje y se muestran los niveles de expresión y en el eje x los genes seleccionados. Los genes sobre-expresados son brip1, pah y rab27 y los genes sub-expresados son mdm2c, hla-e y emk-1.

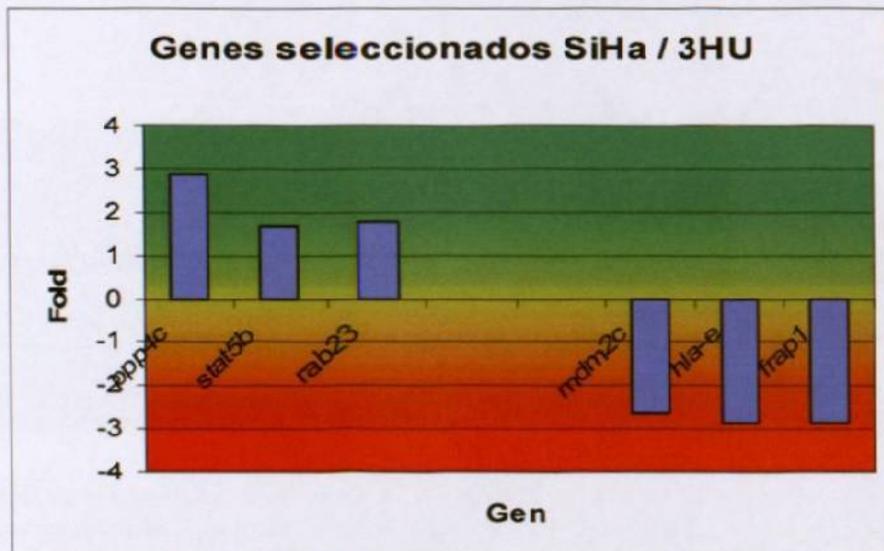


Figura 23. Genes seleccionados en el sistema SiHa/TCN. En el eje y se muestran los niveles de expresión y en el eje x los genes seleccionados. Los genes sobre-expresados son ppp4c, rab3 y stat5 y los genes sub-expresados son mdm2c, hla-e y frap1.

4.3.5. Validación de los resultados de microarreglos.

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

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

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

4.3.6.1.1. Gen six 1 (GC14M059102).

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

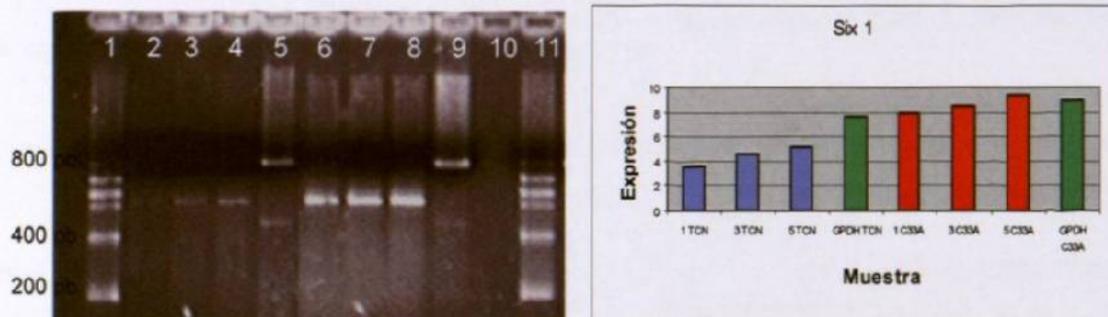


Figura 24. Gel de la amplificación del gen six-1 y gráfica de microdensitometría. En promedio se detecta 0.8 veces más expresión del gen en la C33A que en TCN. Los carriles 2 a 4 son el producto amplificado del DNAc de tejido cervical normal, los carriles 6 a 8 son el producto amplificado del DNAc de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

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

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

4.3.6.1.2. Gen rab3d (GC19M011296).

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

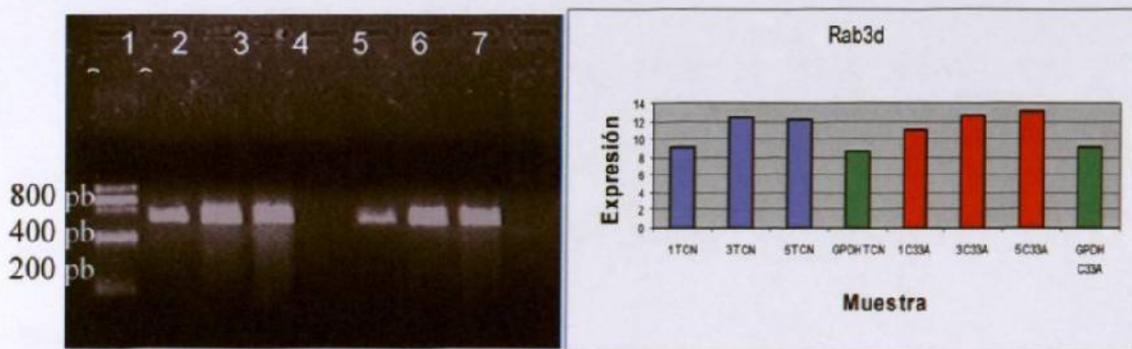


Figura 25. Gel de la amplificación del gen rab3d y gráfica de microdensitometría. No se detecta una diferencia de expresión significativa entre los dos sistemas. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de tejido cervical normal, los carriles 6 a 8 a la muestra de C33A y los carriles 5 y 9 a GAPDH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

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

4.3.6.1.3. Gen dcc1. (MGC5528).

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

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

4.3.6.2. Genes subexpresados en el sistema C33A/TCN

4.3.6.2.1. Gen *ptgs2* (GC01M183879).

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

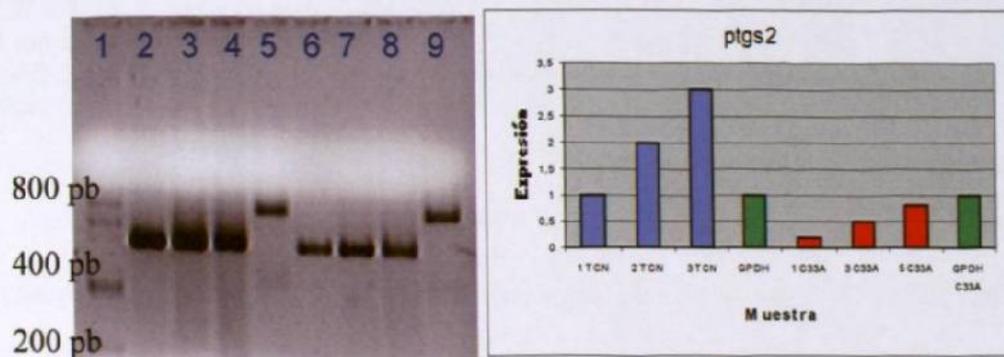


Figura 26. Gel de la amplificación del gen *ptgs2* y gráficas de microdensitometría. En promedio se detecta una expresión 3.7 veces mayor en TCN que en C33A. Los carriles 2 a 4 representan el DNAc del tejido cervical normal, los carriles 6 a 8 el producto amplificado del DNAc de C33A y los carriles 5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

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

4.3.6.2.2. Gen *mdm2c* (GC12P067488).

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

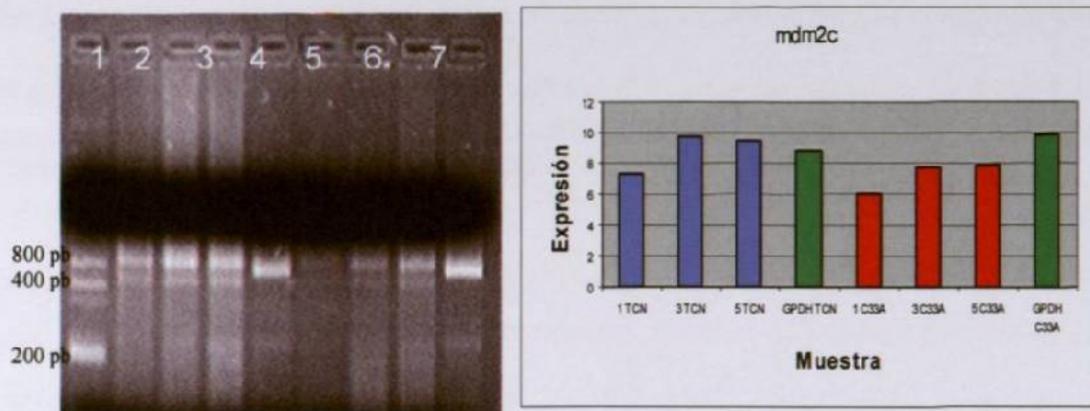


Figura 27. Gel de la amplificación del gen mdm2c y gráfica de microdensitometría sistema C33A/TCN. El gen está en promedio sobreexpresado 0.7 veces más en TCN que en C33A. Los carriles 2 a 4 corresponden a las muestras de TCN, los carriles 6 a 8 corresponden a C33A y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN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

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

4.3.6.2.3. Gen hla-e (GC06P030563).

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

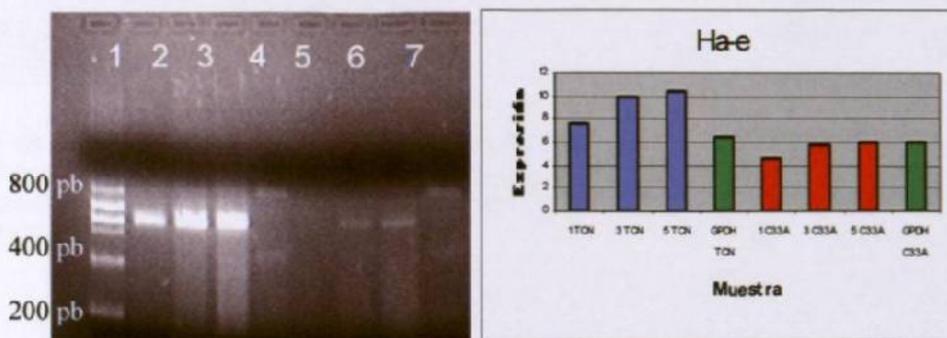


Figura 28. Gel de la amplificación del gen hla-e y gráficas de microdensitometría sistema C33A/TCN. El gen está 0.3 veces más expresado en TCN que en C33A. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de C33A y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y C33A respectivamente.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

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

4.3.7. Estudios de expresión de HeLa/TCN.

4.3.7.1. Genes sobreexpresados en el sistema HeLa/TCN

4.3.7.1.1. Gen *brip1* (GC17M060234).

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

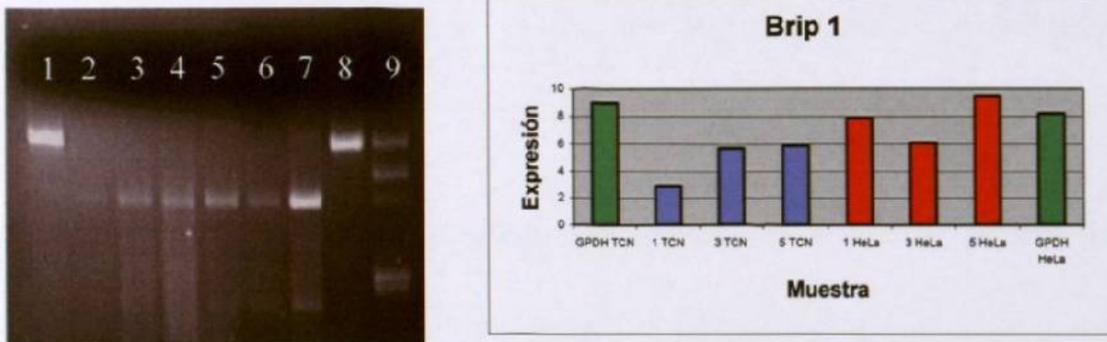


Figura 29. Gel de la amplificación del gen *brip1* y gráfica de microdensitometría. El gen está 0.8 veces más expresado en HeLa que en TCN. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 5 a 7 a la muestra de HeLa y los carriles 1 y 8 a GAPDH de TCN y HeLa respectivamente. Los niveles de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

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

4.3.7.1.2. Gen rab27B (GC18P050644)

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

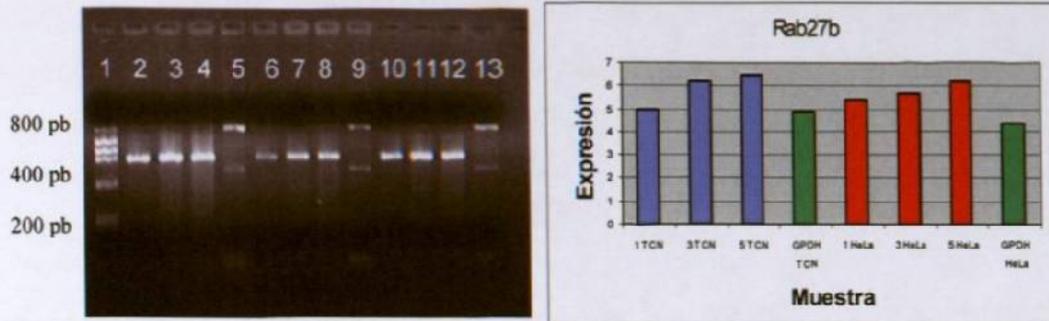


Figura 30. Gel de la amplificación del gen rab27b y gráfica de microdensitometría. Rab27b no muestra cambios significativos en su expresión en tejido cervical o en la línea HeLa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 10 a 12 a la muestra de HeLa y los carriles 5, 9 y 13 a GAPDH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

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

4.3.7.1.3. Gen pah (GC12M101735).

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

4.3.7.2. Genes subexpresados en el sistema HeLa/TCN

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

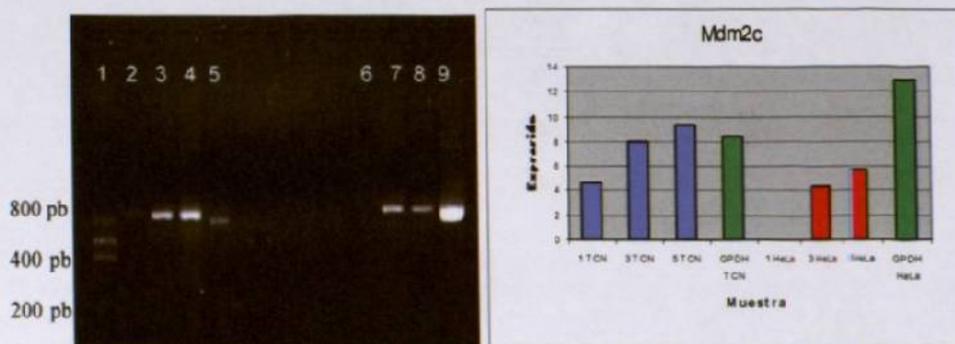


Figura 31. Gel de la amplificación del gen mdm2c y gráfica de microdensitometría sistema HeLa/TCN. El gen esta 0.7 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa. Sin embargo, los niveles de expresión de GAPDH son muy dispares en ambas muestras con una variación de 0.5 veces, habiendo mayor expresión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

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

4.3.7.2.2. Gen hla-e (GC06P030563).

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

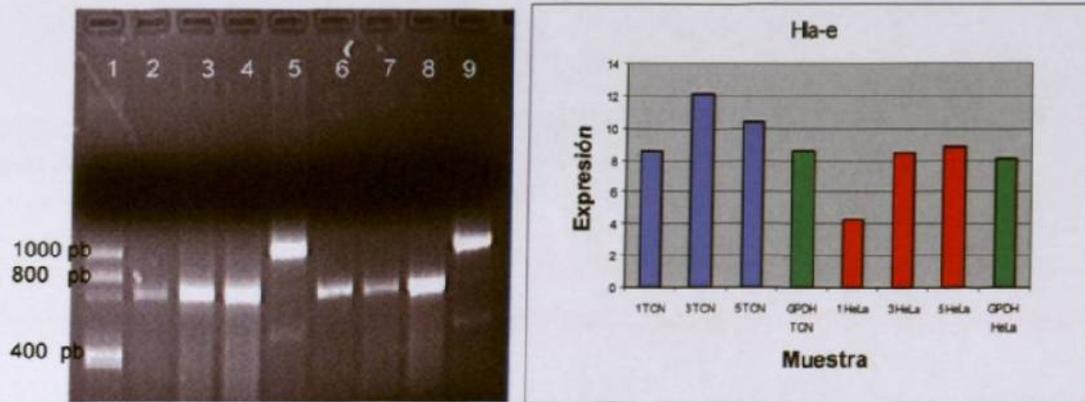


Figura 32. Gel de la amplificación del gen hla-e y gráfica de microdensitometría sistema HeLa/TCN. El gen esta 0.5 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de HeLa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y HeLa respectivamente.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

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

4.3.7.2.3. Gen emk-1 (GC11P063382).

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

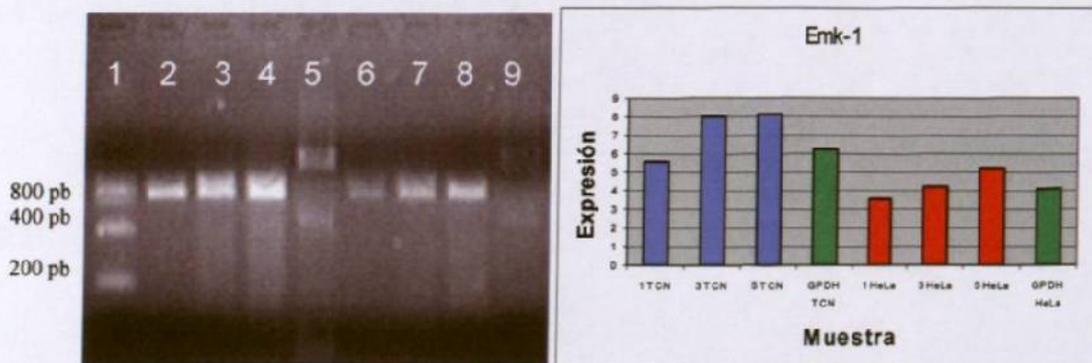


Figura 33. Gel de la amplificación del gen emk-1 y gráfica de microdensitometría. El gen esta 0.6 veces más expresado en promedio en TCN que en HeLa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de HeLa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y HeLa respectivamente. La expresión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

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

4.3.8. Estudios de expresión en SiHa/TCN

4.3.8.1. Genes sobreexpresados en el sistema SiHa/TCN

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

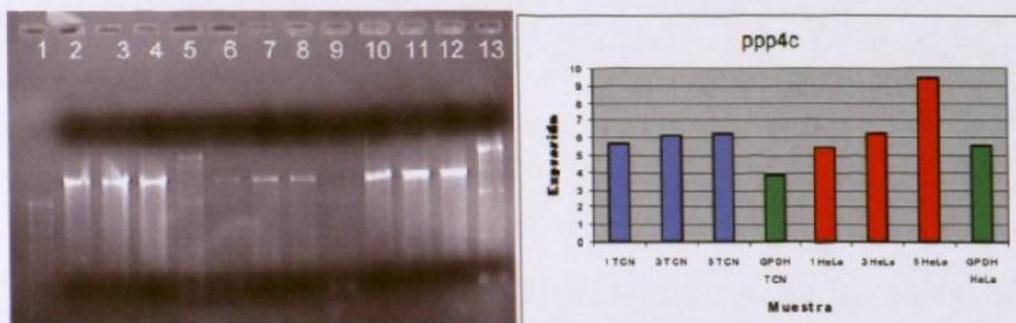


Figura 34. Gel de la amplificación del gen *ppp4c* y gráfica de microdensitometría. El gen está 0.2 veces más expresado en SiHa que en TCN. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 10 a 12 a la muestra de SiHa y los carriles 5, 9 y 13 a GAPDH de TCN y SiHa respectivamente, los carriles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

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

4.3.8.1.2. Gen *stat5b* (GC17M040726).

Los resultados se muestran en la figura 35.

4.3.8.1.3. Gen rab23 (GC06M057100).

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



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

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

4.3.8.2. Genes subexpresados en el sistema SiHa/TCN.

4.3.8.2.1. Gen frap1. (GC01M010876).

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

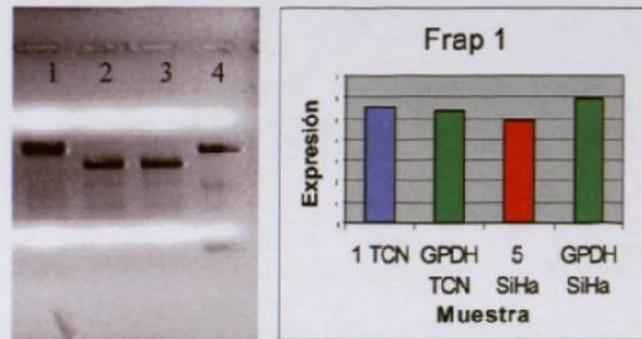


Figura 36. Gel de la amplificación del gen *frap1* y gráfica de microdensitometría. No se observa una diferencia significativa en los niveles de expresión en las muestras analizadas, la diferencia detectada es de 0.1 veces.

En este gen no se observa diferencia en los niveles de expresión en ambas muestras. En el caso de GAPDH se observa una expresión mas marcada en el caso de tejido cervical normal.

4.3.8.2.2. Gen *mdm2c* (GC12P067488).

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

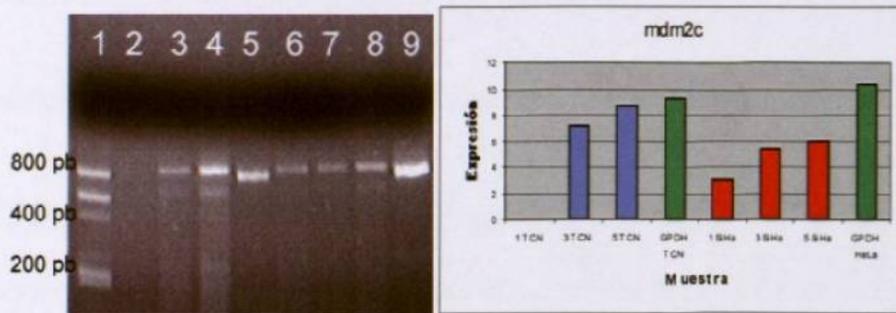


Figura 37. Gel de la amplificación del gen *mdm2c* y gráfica de microdensitometría. El gen está 0.55 veces más expresado en TCN que en SiHa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de SiHa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y SiHa respectivamente. La diferencia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

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

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

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

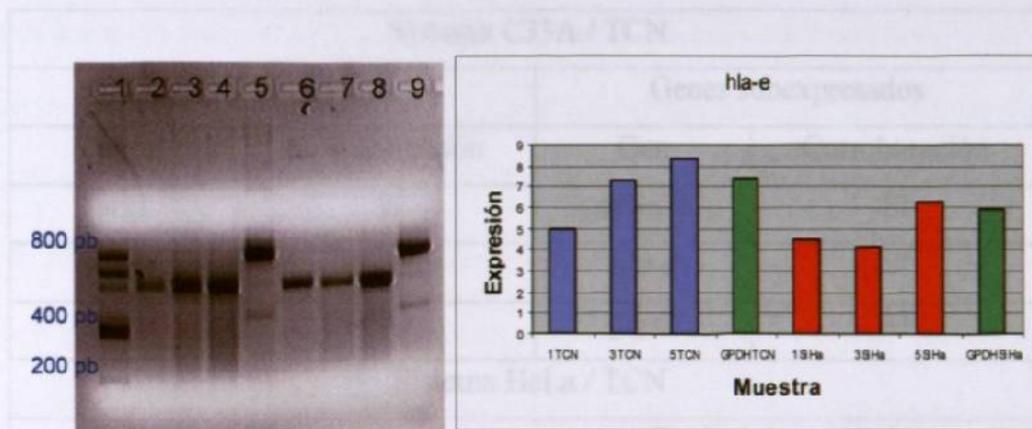


Figura 38. Gel de la amplificación del gen *hla-e* y gráfica de microdensitometría. El gen está 0.4 veces más expresado en TCN que en SiHa. Los carriles 2 a 4 corresponden a la muestra de TCN, los de 6 a 8 a la muestra de SiHa y los carriles 5 y 9 a GAPDH de TCN y SiHa respectivamente.

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

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

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

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

TABLA 12

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

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

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

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

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

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

5.1. Perfil de expresión de los genes virales.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2. Perfil de expresión de los genes celulares.

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

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

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

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

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

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

CAPÍTULO VII

PERSPECTIVAS

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

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

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics 1998. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 6-29.
- ² Lazcano-Ponce EC, Moss S, Alonso de Ruiz P, Salmeron Castro J, Hernandez Avila M. Cervical cancer screening in developing countries: why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res* 1999; 30: 240-250.
- ³ Zambrana RE, Breen N, Fox SA, Gutierrez-Mohamed ML. Use of cancer screening practices by Hispanic women: analyses by subgroup. *Prev Med* 1999; 29: 466-477.
- ⁴ Howe SL, Delfino RJ, Taylor TH, Anton-Culver H. The risk of invasive cervical cancer among Hispanics: evidence for targeted preventive interventions. *Prev Med* 1998; 27: 674-680.

- ⁵ Robles SC, White F, Peruga A. Trends in cervical cancer mortality in the Americas. *Bull Pan Am Health Organ* 1996; 30: 290-301.
- ⁶ Slattery ML, Overall JC Jr, Abbott TM, French TK, Robison LM, Gardner J. Sexual activity, contraception, genital infections, and cervical cancer: support for a sexually transmitted disease hypothesis. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 248-258.
- ⁷ Ramirez AG, Suarez L, Laufman L, Barroso C, Chalela P. Hispanic women's breast and cervical cancer knowledge, attitudes, and screening behaviors. *Am J Health Promot* 2000; 14: 292-300.
- ⁸ Hirose K, Hamajima N, Takezaki T, Kuroishi T, Kuzuya K, Sasaki S, Tokudome S, Tajima K. Smoking and dietary risk factors for cervical cancer at different age group in Japan. *J Epidemiol* 1998; 8: 6-14.
- ⁹ Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51: 96-103.
- ¹⁰ Segnan N. Socioeconomic status and cancer screening. *IARC Sci Publ* 1997. 138: 369-376.

- ¹¹ Koopman LA, van Der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1669-1677.
- ¹² Krul EJ, Schipper RF, Schreuder GM, Fleuren GJ, Kenter GG, Melief CJ. HLA and susceptibility to cervical neoplasia. *Hum Immunol* 1999; 60: 337-342.
- ¹³ Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma shows papillomavirus-type specificity. *Nat Genet* 1994; 6: 157-162.
- ¹⁴ Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol* 2000; 13: 243-251.
- ¹⁵ Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 1999; 73: 5887-5893.
- ¹⁶ Sternberg S. S. *Diagnostic Surgical Pathology*, 1999.
- ¹⁷ Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51: 96-103.
- ¹⁸ Shepherd JH. Cervical and vulvar cancer: changes in FIGO definitions of staging. *Br J Obst Gyn* 1996; 103(5): 405-406

- ¹⁹ Hopkins, MP; Morley, GW. The prognosis and management of cervical cancer associated with pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 1992; 80(1): 9-13
- ²⁰ Duenas-Gonzalez A, Lopez-Graniel C, Gonzalez-Enciso A, Cetina L, Rivera L, Mariscal I, Montalvo G, Gomez E, de la Garza J, Chanona G, Mohar A. A phase II study of multimodality treatment for locally advanced cervical cancer: neoadjuvant carboplatin and paclitaxel followed by radical hysterectomy and adjuvant cisplatin chemoradiation. *Ann Oncol.* 2003 Aug;14(8):1278-84.
- ²¹ Martinez Monge R, Jurado M, Azinovic I, Aristu J, Fernandez-Hidalgo O, Lopez G, Calvo FA. Preoperative chemoradiation and adjuvant surgery in locally advanced or recurrent cervical carcinoma. *Rev Med Univ Navarra.* 1997 Apr-Jun;41(2):19-26. Review.
- ²² Morris M, Eifel PJ, Jiandong L, Grisby PW, Levenback Ch, Stevens RE et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Eng J Med* 340(15): 1137-1143
- ²³ Omura GA. Chemotherapy for cervix cancer. *Semin Oncol* 1992; 42(2): 145-149
- ²⁴ Howley PM. Role of humanpapillomaviruses in human cancer. *Cancer Re* 1991; 51: suppl:5019-5022.

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

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

- ³⁷ Storey A., Thomas M., Kalita A., Harwood C., Gardiol d., Mantovani F., Breuer J., Leigh I. M., Matlashewski G., and Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-234.
- ³⁸ Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136.
- ³⁹ Paulovich, AG, Toczyski, DP, Hartwell, LH. When check point fails. *Cell* 1997; 17: 315-321
- ⁴⁰ Adams, JM y Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 381: 1322-1326.
- ⁴¹ Thornberry, NA y Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1313-1316
- ⁴² Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 1999; 73: 5887-5893.

- ⁴³ Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology* 1998; 10: 19-29.
- ⁴⁴ Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol* 2000; 192: 280-288.
- ⁴⁵ Bonalume, R. Brazilian scientists team up for cancer genome project. *Nature* 1999; 398: 450-455.
- ⁴⁶ Augenlicht, L. H. y Kobrin D. Cloning and screening of sequences expressed in a mouse colon tumor. *Cancer Res.* 1982; 42: 1088-1093.
- ⁴⁷ Lockhart D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. y Brown, E. L. Expresión monitoring by hidridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* 1996; 14: 1675-1680 1996.
- ⁴⁸ Días Neto E, Garcia Correa R, Verjovski-Almeida S, Briones MR, Nagai MA, da Silva W Jr, Zago MA, Bordin S, et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3491-3496.

-
- ⁴⁹ von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research. *Biotechniques* 2000; 29: 1066-1070.
- ⁵⁰ Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 2001; 75(9): 4283-96.
- ⁵¹ Cheng Q, Lau WM, Tay SK, Chew SH, Ho TH, Hui KM. Identification and characterization of genes involved in the carcinogenesis of human squamous cell cervical carcinoma. *Int J Cancer.* 2002 Mar 20; 98(3): 419-26.
- ⁵² Ruutu M, Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33-positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration. *Int J Cancer.* 2002 Jul 20; 100(3): 318-26.
- ⁵³ Berger AJ, Baege A, Guillemette T, Deeds J, Meyer R, Disbrow G, Schlegel R, Schlegel R. Insulin-like growth factor-binding protein 3 expression increases during immortalization of cervical keratinocytes by human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *Am J Pathol.* 2002; 161(2): 603-10.

- ⁵⁴ Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley MA, Coleman N. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res.* 2002; 62(23): 6959-65.
- ⁵⁵ Lee KA, Shim JH, Kho CW, Park SG, Park BC, Kim JW, Lim JS, Choe YK, Paik SG, Yoon DY. Protein profiling and identification of modulators regulated by the E7 oncogene in the C33A cell line by proteomics and genomics. *Proteomics.* 2004; 4(3): 839-48.
- ⁵⁶ Achary MP, Jaggernauth W, Gross E, Alfieri A, Klinger HP, Vikram B. Cell lines from the same cervical carcinoma but with different radiosensitivities exhibit different cDNA microarray patterns of gene expression. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; 91: 39-43.
- ⁵⁷ Wong YF, Selvanayagam ZE, Wei N, Porter J, Vittal R, Hu R, Lin Y, Liao J, Shih JW, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Yip SK, Ngong DT, Siu N, Chan IK, Chan CS, Kong T, Kutlina E, McKinnon RD, Denhardt DT, Chin KV, Chung TK. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(15): 5486-92.

- ⁵⁸ Chen Y, Miller C, Mosher R, Zhao X, Deeds J, Morrissey M, Bryant B, Yang D, Meyer R, Cronin F, Gostout BS, Smith-McCune K, Schlegel R. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res.* 2003; 63(8): 1927-35.
- ⁵⁹ J. Sambrock, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Pres. Segunda Edición. 1989
- ⁶⁰ Frederick M. Ausubel, Roger Brent. *Short Protocols in Molecular Biology*. Editorial Wiley. Cuarta Edición 1999..
- ⁶¹ Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, Kalantari M, Chuang LS, Li BF, Bernard HU. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology.* 2004 Jul 1;324(2):483-92.

APÉNDICE 1

CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES SELECCIONADOS.

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

Gen six 1 (GC14M059102).

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

Gen *rab3d* (GC19M011296).

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

Gen *ptgs2* (GC01M183879).

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

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

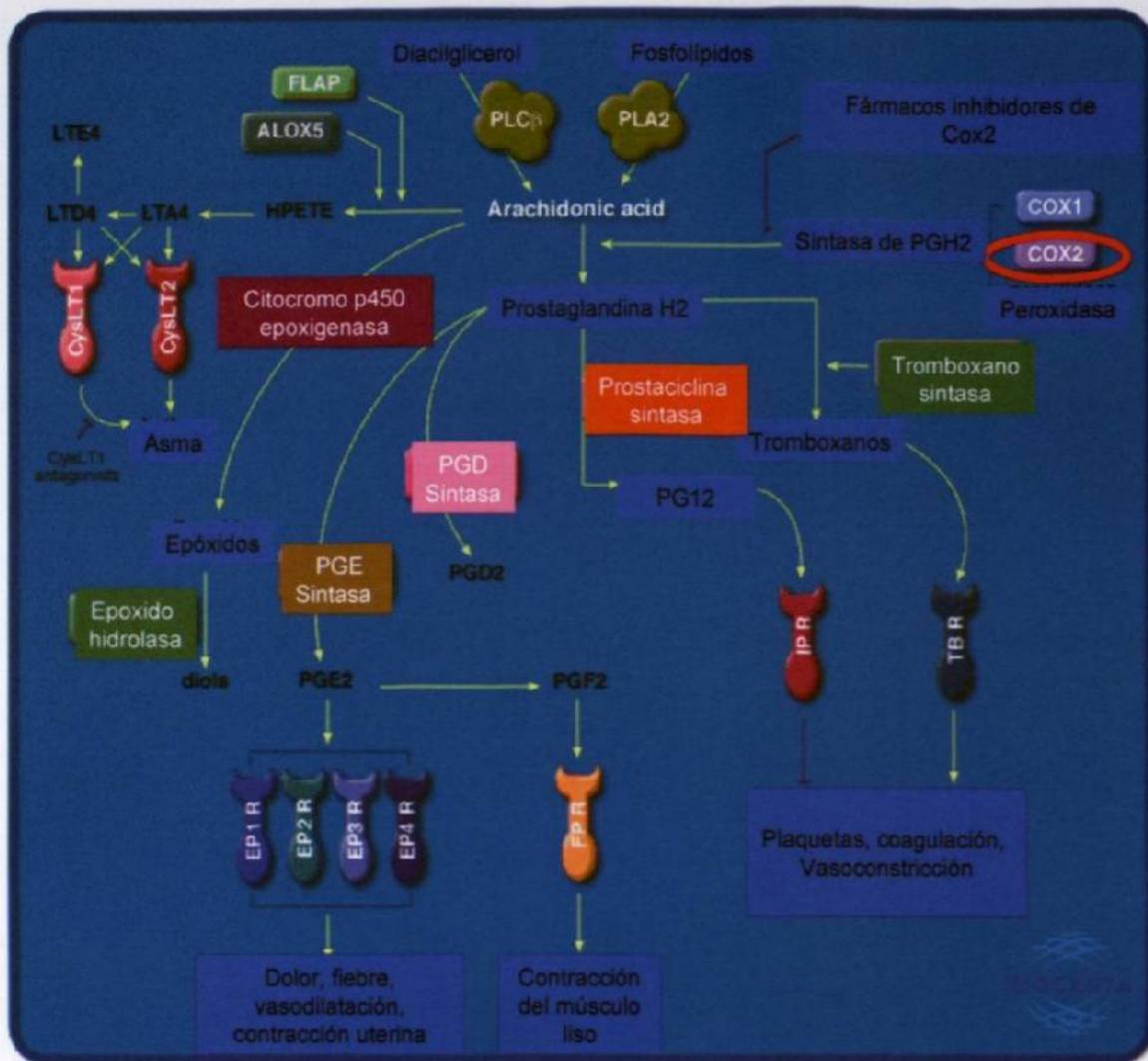


Figura 39. Rutas metabólicas donde participa el gen *ptgs2*, también denominado **COX2.** Marcado con un círculo rojo se localiza el gen *ptgs2* en la esquina superior derecha. Como puede observarse es uno de los elementos iniciales que participa en una cadena de reacciones que termina en muchos efectos como dolor, fiebre, vasodilatación, contracción uterina, contracción del músculo liso, vasoconstricción, activación de plaquetas y coagulación. www.biocarta.com

Gen *mdm2c* (GC12P067488).

El producto del gen *mdm2c* es una fosfoproteína nuclear con una masa molecular aparente de 90 kd que forma un complejo con p53. El *mdm2* humano fue identificado como un producto homólogo del gen “murine double minute 2” del ratón. El gene *mdm2* aumenta el

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

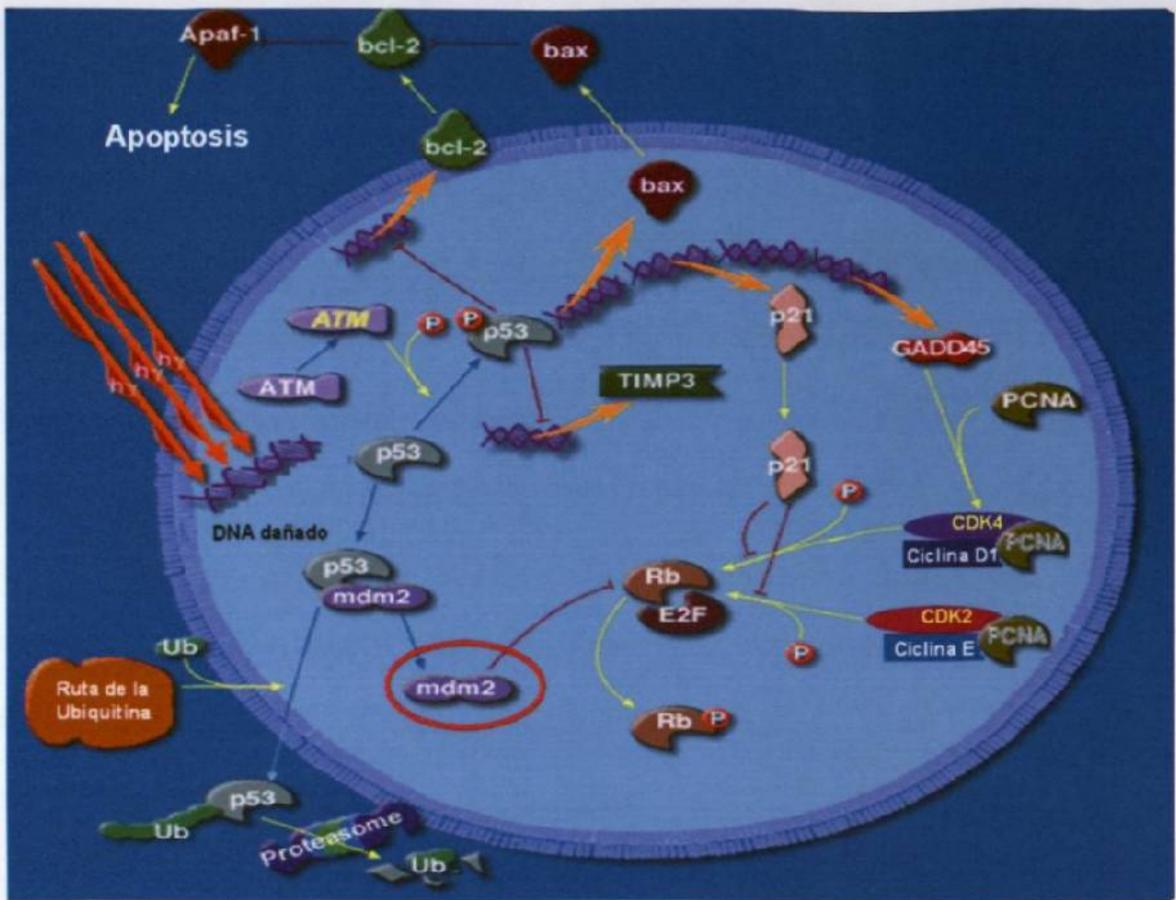


Figura 40. Rutas donde participa el gen mdm2c en el ciclo celular. El gen mdm2 interactúa con p53 y la inactiva, previniendo con esto las funciones de p53. También capacidad de bloquear las funciones de Rb. Debido a que tiene efectos de regulación negativa sobre dos de los principales controladores del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

Gen hla-e (GC06P030563).

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

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

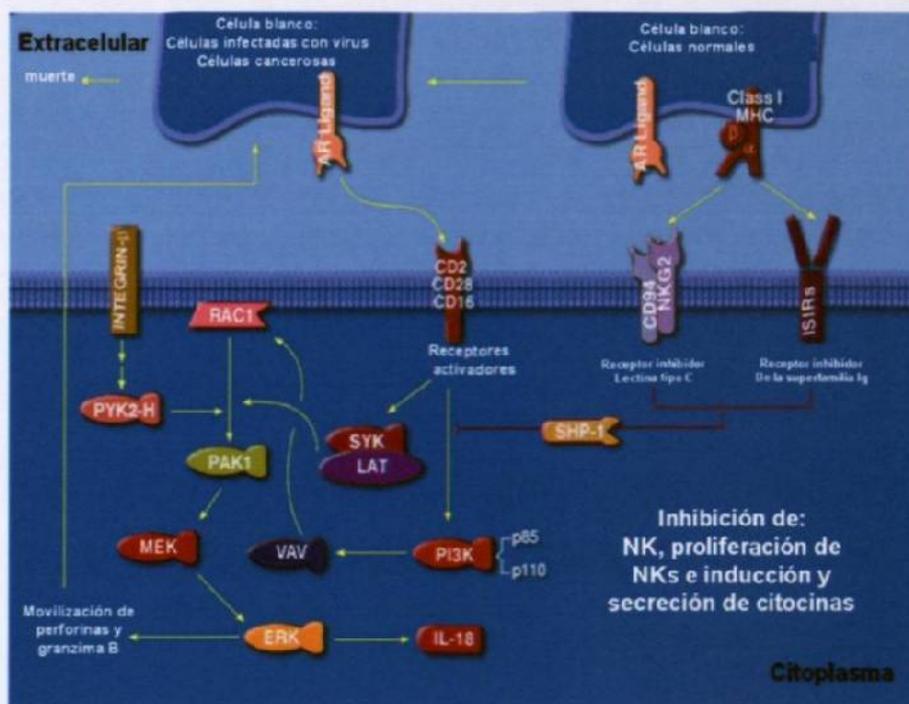


Figura 41. Esquema donde se muestra la función de hla-e. Este marcador de membrana debe interactuar con el receptor CD94/NKG2 para evitar que este ataque a la célula. Las células que no presentan la proteína hla-e son atacadas por perforinas del NK. www.biocarta.com

Gen *brip1* (GC17M060234).

Gen *rsb271* (GC11P020544).

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

de vesículas con sus transportes de membranas apropiados.

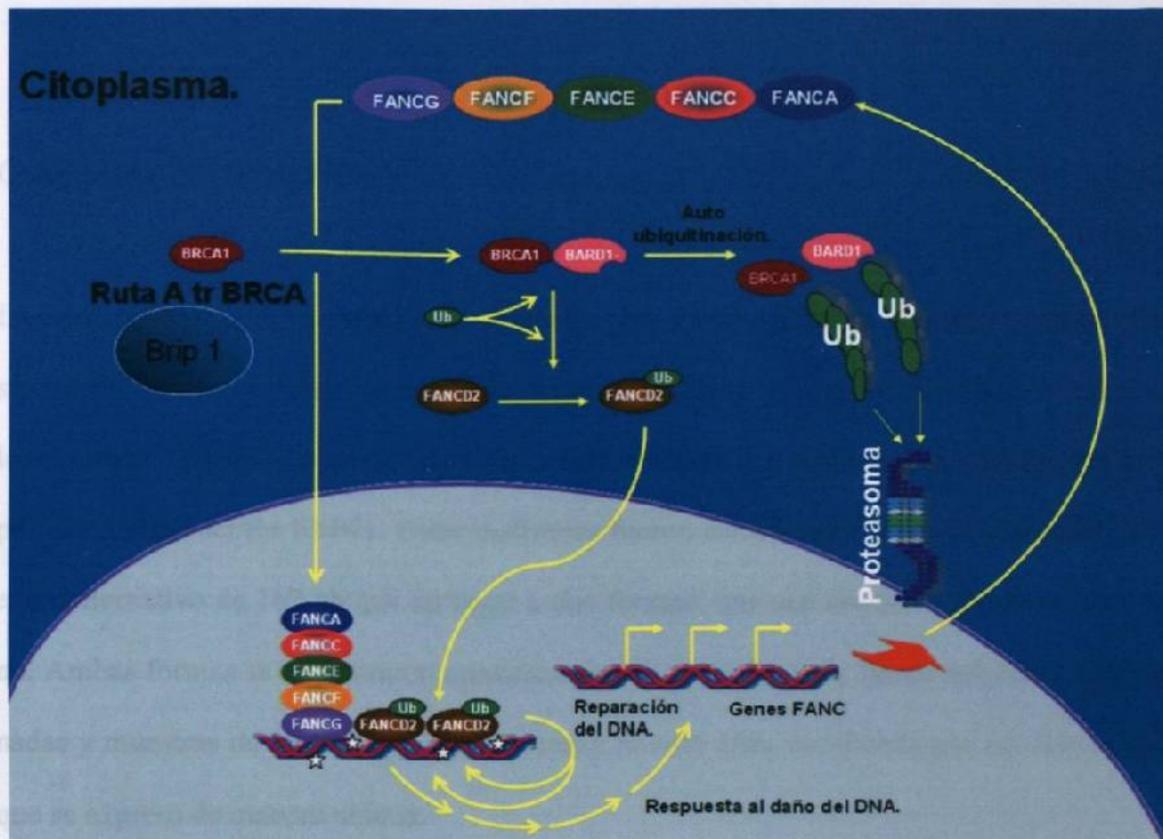


Figura 42. Dibujo esquemático de la función del gen BRCA1. Para que BRCA1 sea activo este tiene que interactuar primero con *brip1* para que sea funcional y pueda participar en el resto de la cascada de reacciones. www.biocarta.com

Gen rab27B (GC18P050644).

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

Gen emk-1 (GC11P063382).

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

Gen ppp4c (GC16P030126).

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

Gen stat5b (GC17M040726).

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

ducción de señales y activación de la transcripción. Se localiza en el núcleo, llevada ahí en respuesta a fosforilación. Es reprimida por NCOR2. En la figura 43 se observa un diagrama esquemático de su participación en las cascadas de señalamiento.

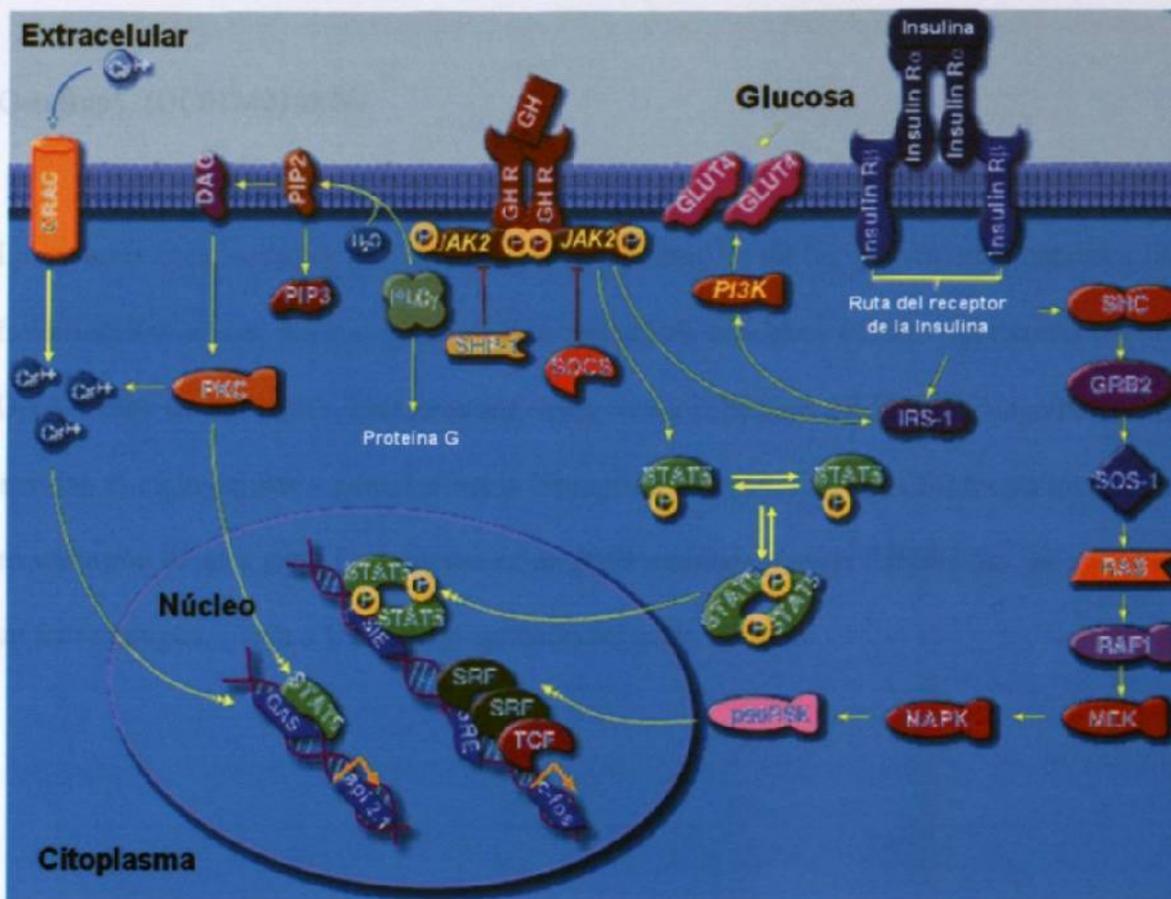


Figura 43. Dibujo esquemático que muestra las múltiples rutas de señalamiento donde participa la proteína stat5. Stat5 puede actuar como monómero o como dímero, la fosforilación promueve la dimerización. Su acción es como factor transcripcional directamente sobre el DNA. www.biocarta.com

Gen rab23 (GC06M057100).

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

Gen frap1. (GC01M010876).

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



