



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DETECCIÓN DE ALTERACIONES GÉNICAS EN  
CÁNCER DE LARINGE MEDIANTE  
MICROARREGLOS DE ADN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA**

**PRESENTA :  
RAÚL PERALTA RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS**

**MÉXICO, D.F.**

**2005**

*m350305*



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El trabajo experimental de esta tesis se llevo a cabo en el laboratorio de oncología genómica de la unidad de investigación médica en enfermedades oncológicas del centro médico nacional siglo XXI, IMSS**

**A LA**  
***UNION PERALTA***

## **AGRADECIMIENTOS**

***A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación otorgada.***

***Agradezco en general a todos los miembros del Laboratorio de Oncología Genómica de la Unidad de Investigación Médica en enfermedades Oncológicas del IMSS todo el apoyo y todas las facilidades otorgadas para la realización de la presente investigación.***

***Agradezco al Dr. Mauricio Salcedo Vargas todo el apoyo y enseñanzas otorgadas.***

***Agradezco a la Dra. Rocío Ortiz todas las facilidades y asesorías otorgadas para el uso y manejo del lector de microarreglos.***

***Agradezco a la todos los miembros de la sección de epidemiología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas por facilitarme la obtención de las muestras analizadas.***

## INDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
INTRODUCCION.....	8
La Laringe.....	8
Cáncer de Laringe.....	9
Virus de Papiloma Humano en cáncer de laringe.....	10
Hibridación Genómica Comparativa en cáncer de laringe.....	12
Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
MATERIALES Y METODOS.....	20
Tejidos y muestras.....	20
Extracción y purificación de ADN.....	20
Detección y tipificación del Virus de Papiloma Humano.....	21
<i>PCR</i> .....	21
<i>Secuenciación de ADN</i> .....	22
<i>Tipificación</i> .....	22
Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos.....	23
<i>Amplificación y marcaje</i> .....	23
<i>Hibridación</i> .....	24
<i>Visualización y análisis</i> .....	24
RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	41
REFERENCIAS.....	42
ANEXO 1.....	50

## **ABREVIATURAS**

ADN, Ácido 2' Desoxirribonucleico

HGC, Hibridación Genómica Comparativa

HGCm, Hibridación Genómica Comparativa sobre metafases

HGCa, Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos

VPH, Virus de Papiloma Humano

PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa

EGFR, Receptor del factor de crecimiento epidermoide

RBP1, 2, Proteína que une retinol 1 y 2

## RESUMEN

A la fecha ha sido ampliamente documentado que en las células transformadas, hay alteraciones cromosómicas y alteraciones en la expresión génica. La tecnología de Hibridación Genómica Comparativa (HGC) sobre metafases ha sido aplicada al estudio del cáncer de laringe. Mediante esta metodología se ha definido un patrón específico de desbalances cromosómicos en este tumor así como en otros tumores. Sin embargo, dada su limitada resolución la HGC sobre metafases, únicamente ha proporcionado información general de posibles blancos génicos que presenten cambios en el número de copias de ADN. Actualmente para definir los cambios en el número de copias de ADN y en especial en genes determinados se utiliza la Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos (HGCa) la cual está siendo utilizada más ampliamente en el estudio de neoplasias. Aplicando esta metodología en el estudio de la biología del cáncer de laringe, en este trabajo se analizaron 21 muestras de laringe (2 lesiones premalignas y 19 tumores invasivos) utilizando el sistema HGC sobre microarreglos de la plataforma GenoSensor para definir los blancos génicos que presenten cambios en el número de copias de ADN. La ganancia más frecuente de ADN detectada por HGC sobre microarreglos en los tumores invasivos se presentó en el gen RBP1,2 (3q21-q22) en el 52.6% de las muestras y en el gen EGFR (7p12.3-p12.1) en el 47.3% de las muestras, en cuanto a pérdidas no se observó ninguna en especial. Adicionalmente a las muestras estudiadas, se les realizó la detección de secuencias de Virus de Papiloma Humano (VPH) mediante amplificación por PCR, encontrando que el 42% de las muestras invasivas contienen secuencias de VPH tipo 16 y en las dos muestras de lesiones premalignas, secuencias de VPH tipo 11. Basados en los resultados, se observa que la mitad de los casos positivos a VPH 16 se asocia a la ganancia de RBP1,2 y EGFR. Estos resultados nos sugieren que no existe una relación entre la infección de VPH en los tumores invasores y la presencia de alteraciones génicas específicas en esta neoplasia.

## INTRODUCCIÓN

### La Laringe

La laringe es un órgano del sistema respiratorio en forma tubular, compuesto básicamente por cartílagos y músculos, ambos revestidos por mucosa y epitelio, este órgano comunica la faringe con la traquea y cumple funciones en la respiración, deglución, protección de la vía aérea y vocalización. En este órgano, la vibración de las cuerdas vocales al paso del aire produce la voz, aunque la fonación final se modula por los diferentes órganos del sistema respiratorio.<sup>1</sup>

Anatómicamente la cavidad de la laringe se divide en tres regiones, la parte superior o supraglotis, formada básicamente por una cavidad, que se comunica en la parte superior con la epiglotis y en la parte inferior con las cuerdas vocales superiores, la parte media o glotis, en esta región formada por un vestíbulo, se localizan las cuerdas vocales, dos inferiores o pliegues vocales verdaderos y dos superiores o pliegues vocales falsos y la parte inferior o subglotis, formado por una cavidad que se comunica en la parte inferior con la traquea y en la parte superior con las cuerdas vocales inferiores.<sup>1</sup>

Histológicamente la laringe esta revestida en la superficie de las cuerdas vocales por epitelio estratificado plano no queratinizado, al igual que la mayor parte de la epiglotis, el resto está cubierto por epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, intercalada por una gran cantidad de glándulas serosas y mucosas, que es del tipo característico del tubo respiratorio.<sup>2</sup>

Las patologías laringeas se clasifican en, lesiones traumáticas, infecciones y tumores. Los tumores a su vez se subdividen en benignos y malignos. Por el tipo histológico, los tumores de origen epitelial son los que se presentan con más frecuencia en la laringe. Uno de los tumores benignos que se presentan con mayor frecuencia son los papilomas, de etiología viral (infección por VPH), mientras que los tumores malignos que se presentan con mayor frecuencia son los carcinomas epidermoides.<sup>3</sup>

## **Cáncer de Laringe**

El cáncer de laringe es un problema de salud pública con 160 000 casos nuevos estimados para el 2005 en todo el mundo. La elevada incidencia de esta enfermedad, fundamentalmente en hombres mayores de 50 años, resalta su importancia como problema de salud pública.<sup>4</sup>

En México, de acuerdo a los datos de la Secretaría de Salud, este tumor se presenta en poco más del 1% de todas las neoplasias malignas y se encuentra entre las 10 principales neoplasias malignas en hombres en edad productiva (45-64 años) y en edad postproductiva (65 y más años).<sup>5</sup>

Por su posición anatómica, la laringe es el segundo sitio más común de desarrollo de cáncer en la región de cabeza y cuello, después de la cavidad oral. Por su tipo histológico el carcinoma epidermoide ocupa el 95% de los casos.<sup>6</sup>

El sitio más frecuente de origen del cáncer de laringe es en la glotis o pliegues vocales verdaderos (59 %), le sigue la supraglotis (40%) y por último la subglotis (1 %).<sup>6</sup>

Entre los factores de riesgo que están involucrados en la etiología del cáncer laríngeo se encuentra el tabaquismo, la radiación ionizante y la infección por VPH.<sup>6</sup>

La susceptibilidad del epitelio laríngeo a infección por VPH, origina la aparición de papilomas. La papilomatosis laríngea es causada por infección de VPH del tipo 6 y 11 considerados de bajo riesgo, esta infección suele aparecer en la unión del epitelio escamoso con epitelio ciliado en las cuerdas vocales verdaderas.<sup>7</sup>

La predominancia de infección del epitelio laríngeo por VPH de alto riesgo, tipo 16 en los tumores laríngeos y debido al papel que desempeña la infección de VPH en otros tipos de tumores del mismo origen epitelial, como es el cervical, la infección del epitelio laríngeo por este virus, también nos indica que participa como factor etiológico.

## **Virus de Papiloma Humano en cáncer de laringe**

La presencia del Virus de Papiloma Humano (VPH) en las células y la expresión de sus oncoproteínas E6 y E7 pueden transformar a las células, debido a su capacidad de interferir en los mecanismos celulares cruciales tales como la regulación del ciclo celular y apoptosis. Las oncoproteínas de VPH, utilizan como blanco principalmente a los genes supresores de tumor.<sup>8</sup>

Para mostrar el papel de VPH en el desarrollo de la carcinogénesis laringea se han realizado estudios epidemiológicos y de laboratorio en donde se han analizado líneas celulares establecidas de carcinomas laringeos y muestras de biopsias.<sup>9-29</sup> De esta manera se ha asociado al VPH como un agente causal para algunos carcinomas de laringe. (Tabla 1)

En esta tabla se muestra a un total de 605 casos estudiados, de los cuales en 213 se detectaron secuencias del Virus de Papiloma Humano (35.2%) y una variabilidad en el porcentaje de detección, entre 31 y 90%. Esta variabilidad, esta distribuida por regiones geográficas, encontrándose la mayor prevalencia en Estados Unidos con un porcentaje >80% seguido de Países Europeos (Reino Unido, España, Italia, Francia, Grecia) y China con un porcentaje entre 50 y 75%. En los Países Latinoamericanos (México y Cuba) y Canadá con un porcentaje entre 40 y 50% y los de menor prevalencia en los Países Escandinavos (Finlandia y Noruega) India y Japón con un porcentaje entre 30 y 40%.

Desde el punto de vista citogenético, una de las características que se presentan en las células neoplásicas es la presencia de alteraciones cromosómicas.<sup>30-32</sup> Estas alteraciones, surgen potencialmente, como consecuencia de la acumulación de mutaciones en genes mutadores, involucrados en mantener la estabilidad del genoma, reparación, replicación, segregación cromosomal y mitosis.<sup>33</sup> La hibridación genómica comparativa en metafases (HGCM) es una metodología de citogenética molecular que ha sido utilizada para estudiar los desbalances cromosómicos asociados al cáncer.

**Tabla 1** Detección de Virus de Papiloma Humano en cáncer de laringe.

ESTUDIO	PAIS	AÑO	VPH POSITIVO	%
Watts <i>et al.</i>	Estados Unidos	1991	27(30)	90
Kasperbauer <i>et al.</i>	Estados Unidos	1993	17(20)	85
Pou <i>et al.</i>	Estados Unidos	1995	24(29)	82
Morgan <i>et al.</i>	Reino Unido	1991	12(16)	75
Gorgoulis <i>et al.</i>	Grecia	1994	11(16)	69
Wang L <i>et al.</i>	China	1999	17(25)	68
Alvarez <i>et al.</i>	España	1996	15(26)	58
Peréz-Ayala <i>et al.</i>	España	1990	29(51)	57
Azzimonti B <i>et al.</i>	Italia	1999	28(50)	56
Venuti A <i>et al.</i>	Italia	2000	13(25)	52
Fouret <i>et al.</i>	Francia	1995	6(12)	50
Garcia-Milian <i>et al.</i>	Cuba	1998	16(33)	49
Fliss DM <i>et al.</i>	Canadá	1994	13(29)	45
<b>Presente estudio</b>	<b>México</b>	<b>2005</b>	<b>8(19)</b>	<b>42</b>
Anwar <i>et al.</i>	Japón	1993	16(43)	37
Atula S <i>et al.</i>	Finlandia	1999	14(38)	36
Jacob SE <i>et al.</i>	India	2002	15(44)	34
Lie <i>et al.</i>	Noruega	1996	13(39)	33
Hoshikawa <i>et al.</i>	Japón	1990	11(34)	33
Mineta H <i>et al.</i>	Japón	1998	8(26)	31

En esta tabla se muestra un resumen de resultados de detección de VPH por la técnica de PCR. En la columna ESTUDIO se indica al autor principal del estudio; en la columna PAIS se indica el sitio de origen del grupo que realiza el estudio; en la columna AÑO se indica el año del estudio; en la columna VPH POSITIVO se indica el numero de muestras positivas a VPH y el total de muestras analizadas; en la columna % se indica el porcentaje de muestras positivas.

## **Hibridación Genómica Comparativa en cáncer de laringe**

Desde su desarrollo en 1992, la Hibridación Genómica Comparativa en metafases (HGCM) ha sido aplicada a prácticamente todos los tumores sólidos, detectándose patrones de alteraciones específicos para cada neoplasia, así como otros patrones que son compartidas por un gran número de ellas.<sup>34</sup>

La HGCM es una metodología de citogenética molecular que no requiere el establecimiento de células tumorales en cultivo o la obtención de metafases para su análisis, sino que usa como fuente de análisis únicamente el ADN del tumor. La HGCM tiene su fundamento en la comparación de dos muestras de ADN genómico, uno derivado de la muestra tumoral y el otro derivado de una muestra de referencia cariotípicamente normal. Cada una de estas muestras es marcada diferencialmente utilizando fluorocromos diferentes (comúnmente el tumoral con cianina-3 para verde y el de referencia con cianina-5 para rojo). Ambas muestras marcadas diferencialmente se mezclan en cantidades iguales y se hibridan en presencia de ADN Cot-1 no marcado, sobre cromosomas en metafase de un sujeto cariotípicamente normal. La hibridación de estas sondas se llevará a cabo sobre sus secuencias complementarias en las metafases de manera competitiva, de esta forma, la cantidad de ADN normal o tumoral que se una a su secuencia blanco en los cromosomas, estará en proporción a la cantidad de esa secuencia en las muestras. El uso del ADN Cot-1 no marcado permitirá bloquear las secuencias cromosómicas altamente repetitivas presentes en las regiones centroméricas de los cromosomas, eliminando hibridaciones no específicas en estas regiones.<sup>35</sup>

Una vez hibridados los genomas normal y tumoral sobre las metafases, las diferencias en la intensidad de cada fluorocromo se interpretan como cambios en el número de copias entre ambos genomas. Una señal predominantemente verde constituye una amplificación en el genoma tumoral, ya que existen más copias de esa secuencia en particular marcadas con verde en la muestra tumoral que secuencias marcadas con rojo en la

muestra normal compitiendo por el sitio de hibridación. En el caso de una delección en el tumor, la región presentará una fluorescencia predominantemente roja, debido a una mayor cantidad de ADN de referencia en relación al ADN tumoral. De esta forma, la HGCm permite obtener un mapa de las regiones que sufren cambios en el número de copias de ADN en la totalidad del genoma en un solo experimento de hibridación.<sup>35</sup>

A pesar de su gran capacidad de análisis y de la gran cantidad de información que ofrece, el método tiene limitaciones, HGCm solamente detecta alteraciones en el número de copias de ADN, pero no detectará translocaciones balanceadas, rearrreglos cromosómicos o cambios en la ploidía. Sin embargo, la mayor limitación de la HGCm sobre metafases la constituye su baja sensibilidad. Inicialmente, se reportó la detección de pérdidas de ADN en un rango de 10 a 20 Mb, en el caso de las amplificaciones, su detección depende tanto del número de copias involucradas como del tamaño de las mismas, siendo posible detectar una amplificación de más de 50 copias de 300 kb. La manera de considerar que existe una delección o amplificación depende del tipo de parámetros usados para la detección de alteraciones, comúnmente se considera una delección cuando la relación Verde/Roja es menor a 0.8 y las amplificaciones cuando la relación es superior a 1.2.<sup>36</sup>

En el caso particular del cáncer de laringe, en un estudio realizado por Kujwasky y colaboradores en el 2002, se analizaron 20 muestras de tumores laringeos primarios con sus correspondientes tumores metastáticos, encontrando que el patrón de pérdidas y ganancias de ADN era muy similar en ambos casos, con mas frecuencia en los tumores metastáticos que en los primarios y que las pérdidas más frecuentes se localizan en 3p, 5q, 9p, 13p y 13q mientras que las ganancias más frecuentes se localizaron en 1q, 3q, 5p y 11q.<sup>37</sup>

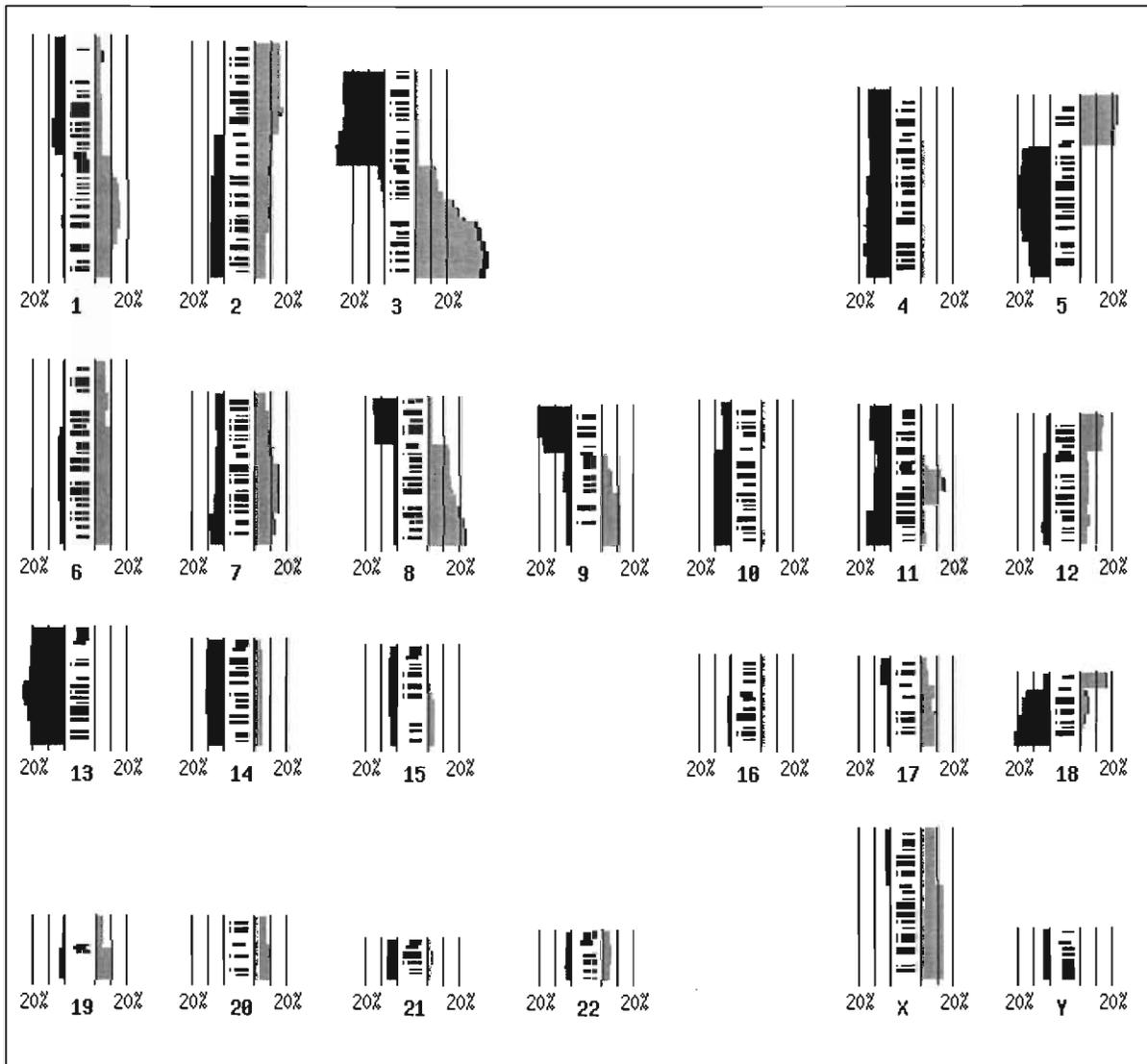
De manera general, hasta la fecha se han analizado más de 80 casos mediante HGCm incluyendo a todos los tipos de tumores laringeos. En tal situación se han encontrado alteraciones en prácticamente todos los cromosomas somáticos y se ha detectado que las

pérdidas mas frecuentes se localizan en 3p, 4, 5q, 9p y 13 mientras que las ganancias mas frecuentes se localizaron en 2p, 3q, 5p y 8q.<sup>38</sup> (figura1)

La limitada sensibilidad del método y la necesidad de evaluar una gran cantidad de cromosomas en cada experimento para obtener un resultado adecuado, han dificultado la automatización del método, por lo que el uso de HGCm no ha sido tan amplio, sobre todo en el diagnóstico. Otro tipo de limitación del método lo constituye una serie de factores necesarios para el éxito del experimento, como la calidad del ADN utilizado, la calidad de las metafases sobre las cuales se está hibridando, la calidad de la reacción de marcaje y de la reacción de hibridación. Debido a sus limitaciones en la sensibilidad para detectar alteraciones pequeñas, con los datos derivados de HGCm no es posible identificar los posibles genes específicos que son blancos de cambios en su número de copias, indicando únicamente la presencia de alteraciones en regiones citogenéticas que pueden contener una gran cantidad de genes dentro de ellas.<sup>39</sup>

Para solucionar estas limitaciones, diversos grupos han desarrollado el método, de HGC sobre microarreglos.

**Figura 1.** Cariograma de los tumores de laringe.



En esta figura se muestra la compilación de las alteraciones cromosómicas detectadas por Hibridación Genómica Comparativa sobre metafases, de tumores de laringe. Las ganancias se muestran en verde y las pérdidas en rojo. El numero de muestras estudiadas es de 88 y fue recolectada en la base de datos de progenetix disponibles en la página [www.progenetix.com](http://www.progenetix.com).

## **Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos (HGCa)**

Recientemente se ha reportado el uso de formatos de HGC basados en microarreglos con mejores resultados que el HGC basado en metafases. El HGCa utiliza el mismo principio pero tiene la ventaja de que permite una alta resolución y mapeo directo de las alteraciones en la secuencia del genoma.<sup>40</sup>

La técnica básicamente es muy similar a la realizada en HGCm. La muestra de ADN de interés se marca con una molécula fluorescente (comúnmente de color verde), lo mismo se hace con una segunda muestra control que se sabe tiene dos copias de ADN a lo largo de todos los cromosomas (comúnmente de color rojo). Al hibridar estas dos muestras al soporte de vidrio que contiene los fragmentos de ADN de todo el genoma, se puede identificar aquellos fragmentos del ADN en los cuales la relación de la señal entre los dos colores es mayor o menor que uno.<sup>40</sup>

En la HGCa se sustituyen las preparaciones de metafases por vectores que contienen clonados fragmentos de los cromosomas humanos, este tipo de clonas, se encuentran por lo general en cromosomas artificiales de bacterias (BACs). Estas clonas son arregladas sobre soportes sólidos utilizando un robot microarreglador. De esta forma, la sensibilidad del método dependerá del tamaño de las sondas inmovilizadas sobre el cristal (aprox. 40 kb para amplificaciones de alto número de copias y 75 a 130 kb para las ganancias y deleciones). Otra ventaja que representa el uso de microarreglos para HGC, además de una mayor resolución, es la facilidad de analizar un alto número de muestras de forma automatizada, abriendo las posibilidades de la aplicación del método al diagnóstico clínico.<sup>41</sup>

La HGCa ha sido aplicada también al estudio de la biología del cáncer, utilizándose microarreglos que contienen regiones que comúnmente sufren alteraciones en el número de copias<sup>42</sup> o utilizando microarreglos que cubren la totalidad del genoma.<sup>43</sup> La aplicación

de este método permite obtener la identidad de los genes o de las secuencias blanco que pueden ser importantes en la progresión o comportamiento biológico de la enfermedad.

Al igual que la HGCm, pero de forma más específica, el uso de los microarreglos está abriendo la posibilidad de llevar a cabo una clasificación de los tumores en base a sus patrones de alteraciones cromosómicas.<sup>44</sup>

En lo que respecta a muestras de cáncer de laringe, hasta la fecha no existen estudios que analicen esta neoplasia, con esta metodología.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el desarrollo del cáncer, la composición del genoma sufre de modificaciones principalmente de pérdidas y ganancias de material genético, estas regiones comúnmente contienen genes que confieren ventajas fenotípicas a las células cancerosas. Mediante la aplicación de la hibridación genómica comparativa sobre metafases ha sido posible la identificación de estas regiones citogenéticas alteradas en el proceso de carcinogénesis. Sin embargo, por esta metodología no es posible identificar a los genes particulares involucrados en el desarrollo del cáncer. Para solucionar estas limitaciones se ha desarrollado la hibridación genómica comparativa sobre microarreglos, con la cual ahora es posible identificar a los genes específicos que tienen relevancia en el desarrollo del cáncer. Hasta la fecha, no existen estudios que analicen el cáncer de laringe, utilizando HGCa.

## **HIPOTESIS**

Dado que en las neoplasias aparecen alteraciones génicas asociadas a la biología de la célula transformada, con la aplicación de la hibridación genómica comparativa sobre microarreglos en muestras de cáncer de laringe esperamos encontrar genes específicos que se alteran molecularmente en este tipo de neoplasia.

## **OBJETIVO GENERAL**

-Determinar las alteraciones génicas en tumores invasores de laringe, así como delimitar posibles marcadores moleculares asociados a esta neoplasia.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

-Determinar la presencia y tipo de Virus de Papiloma Humano en las muestras de tumores de laringe.

-Determinar las alteraciones génicas en muestras de tumores invasores de laringe mediante la aplicación de Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos.

## MATERIALES Y METODOS

### Tejidos y muestras

Se recolectaron a lo largo de 14 meses, 60 muestras de carcinomas de la región de cabeza y cuello. De estas muestras recolectadas en total se analizaron 21 muestras mediante HGCa, 19 muestras de tumores invasores de laringe y 2 muestras de lesiones premalignas de laringe (papilomas laringeos). De las 19 muestras de tumores invasores de laringe de acuerdo a la clasificación clínica de tumores malignos (Tumor, Nodo, Metástasis; TNM) de la unión internacional contra el cáncer (IUAC) se incluyeron: 5 muestras T2N0M0, 1 muestra T2N1M0, 1 muestra T2N3M0, 3 muestras T3N0M0, 2 muestras T3N1M0, 5 muestras T4N0M0 y 2 muestras T4N2M0. Del total de las muestras, 17 muestras provienen de hombres y 4 muestras de mujeres de un rango de edad entre 52 y 74 años, con un promedio de edad de 62 años. Todas las muestras fueron obtenidas mediante consentimiento informado de los pacientes y aprobado por el comité de ética local del Servicio de Cabeza y Cuello del Hospital de Oncología del Centro Medico Nacional siglo XXI del IMSS.

### Extracción y purificación de ADN

El ADN de los tejidos se purificó utilizando el kit, *Wizard SV Genomic DNA* (Promega, Co.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tejido fue homogenizado en Trizol y depositado en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se separaron las fases de ARN, ADN y proteínas con 200µl de cloroformo y centrifugación a 13,000g por 10 min. Para precipitar el ADN se agregaron 300µl de etanol y se centrifugo a 2000g por 5 min. Para separar el trizol se quitó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 1ml de citrato de sodio en etanol 10% con centrifugación a 2000g por 5 min, este procedimiento se realizó tres veces. Para lavar la pastilla se decantó el sobrenadante y se agregó 1ml de etanol 70% y

centrifugación a 2000g por 5 min. Para lisar las células del tejido se quitó sobrenadante y se resuspendió en 600µl de amortiguador de lisis (incluido en el kit) mas 20µl de proteinasa K (20mg/ml) y se incubó durante 72 horas a 56°C. Una vez digerido el tejido, se adicionaron 200µl de la solución de precipitación de proteínas y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se centrifugó por tres minutos a 13,000 g y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo con 600µl de isopropanol frío para precipitar el ADN. El ADN se centrifugó durante 1 min a 13,000 g y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%, para ser finalmente rehidratada en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril. La calidad del ADN fue determinada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y la concentración fue determinada mediante espectrofotometría.

## **Detección y tipificación de Virus de Papiloma Humano**

### ***PCR***

La detección de secuencias de VPH se hizo por la técnica de PCR utilizando la *Taq DNA polymerase* (Promega, Co.) y los iniciadores consenso GP5+/GP6+ para la región conservada L1 de 150 pares de bases del genoma viral y los E6-VPH16f /E6-VPH16r, que amplifican una región de 126 pares de bases del gen E6 específica para VPH16 (nucleótidos 110 a 235). Cada reacción se realizó con 200 ng de ADN en 50 µl de solución con amortiguador 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 0.1% Tritón X-100) 2 mM MgCl, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.5 unidades de Taq polimerasa y 50 pmol de cada iniciador. La PCR se realizó en un termociclador, *Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480*, con las siguientes especificaciones: 94°C por 5 min. para desnaturalización, 40 ciclos de 94°C por 30s para abrir cadenas, 55°C por 1.5 min. para alineamiento de iniciadores y 72°C por 1.5 min para elongación. Se finalizó con 7 min a 72°C para terminar la elongación.

### ***Secuenciación de ADN***

El producto de la PCR obtenido por amplificación con iniciadores GP6+/GP5+, se purificó con el kit, *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Co.) el cual se lleva no solo las impurezas como nucleótidos, iniciadores y proteínas, sino también cualquier fragmento de ADN de menos de 100 pb. Para marcar la secuencia amplificada se utilizó el kit, *BigDye Terminator* de Perkin Elmer Applied Biosystems y un iniciador (GP6+). Se siguieron las condiciones de reacción indicadas en el kit, 8 µl de terminador ready reaction mix, 1-3 ng de la secuencia amplificada por PCR, 3.2 pmol de iniciador y agua para alcanzar los 20µl. La reacción de marcaje se realizó por PCR, con las siguientes condiciones: 94°C por 3 min para desnaturalización, 25 ciclos de 94°C por 30s para abrir cadenas, 55°C por 30s para alinear iniciadores y 72°C por 45s para la elongación. Se finalizó a 72°C por 7 min para terminar la elongación. Posteriormente, las muestras marcadas fueron purificadas utilizando las columnas del kit, *DyeEx 2.0 Spin* de Qiagen y secuenciadas, en un secuenciador *ABI PRISM 100*.

### ***Tipificación***

Las secuencias fueron comparadas con las reportadas en GeneBank, mediante el programa *BLAST*, en la dirección electrónica: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

## Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos

### ***Amplificación y marcaje***

Los análisis de HGCa se llevaron a cabo utilizando el sistema *GenoSensor Array 300* de ABBOTT-Vysis, siguiendo las instrucciones del proveedor. Cada microarreglo consiste de 861 clonas, las cuales representan 287 regiones citogenéticas arregladas por triplicado. Este arreglo no cubre la totalidad del genoma humano a intervalos regulares, sino que representan regiones comúnmente alteradas en cánceres humanos, tales como telómeros, oncogenes y genes supresores de tumor, que se encuentran dispersos a lo largo del genoma. Se preparó la mezcla de reacción de amplificación y marcaje en tubos eppendorf 1.5 ml con 100 ng de ADN genómico (25 ng/ $\mu$ l), 41.6 $\mu$ l de amortiguador TE y 40 $\mu$ l de la mezcla de oligonucleótidos al azar 2.5X. Esta mezcla se desnaturalizó a 100°C durante 10 min, seguido de una incubación en hielo durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 10 $\mu$ l de la mezcla de nucleótidos del kit *GenoSensor array 300*, 2.4 $\mu$ l de Cy3 (1 mM) para el ADN muestra o 2.4  $\mu$ l de Cy5 (1 mM) para el ADN normal de referencia y 2  $\mu$ l de enzima klenow. Esta reacción se incubó en la oscuridad durante 2 hrs a 37°C. Después del marcaje, 100 $\mu$ l del producto amplificado, fueron digeridas mediante la adición de 17 $\mu$ l de amortiguador de reacción de ADNasa y 3 $\mu$ l de una dilución 1:20 de ADNasa grado AMP durante 1 hr a 15 °C. Posterior a la digestión, las sondas obtenidas fueron purificadas mediante precipitación con etanol. Cada sonda fue resuspendida en buffer TE y repurificadas con precipitación por etanol después de una incubación a -20° C toda la noche. Finalmente, cada sonda fue resuspendida en 4  $\mu$ l de Tris pH 8.0 y su tamaño fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa.

## **Hibridación**

La hibridación del microarreglo, su lavado y contrateñido, se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del sistema de hibridación de microarreglos *GenoSensor Array 300*. Para la hibridación de la sonda con el ADN Cot-1 se utilizó 25  $\mu$ l del amortiguador de hibridación (el cual contiene el ADN cot-1) y 2.5  $\mu$ l de los ADNs tumoral y normal, marcados con Cy3 y Cy5, respectivamente, se mezclaron y desnaturalizaron durante 10 min. a 80° C, seguido de una incubación a 37° C durante 1 hr. Posteriormente esta mezcla de hibridación fue depositada sobre el área del microarreglo y cubiertos con una lamínula. Los microarreglos se depositaron en una cámara húmeda saturada con 50% formamida, formamida/2XSSC, e incubados a 37° C durante 72 hrs. Después de la hibridación, los arreglos fueron lavados tres veces con formamida 50% a 40° C por 10 min. cada lavado, seguido de tres lavados de 5 min. en 1XSSC a temperatura ambiente y finalmente enjuagados rápidamente con agua bidestilada. Los microarreglos fueron finalmente contrateñidos usando 20  $\mu$ l de solución de montaje DAPI.

## **Visualización y Análisis.**

La captura de imagen y análisis se llevó a cabo usando el sistema de lectura *GenoSensor*, que captura de manera automatizada las imágenes del arreglo para los tres fluorocromos (Cy5, Cy3, DAPI), crea la imagen compuesta, normaliza, obtiene los valores de intensidad de fluorescencia para cada fluorocromo, calcula las relaciones de fluorescencia entre el ADN tumoral y el normal y crea un reporte de las regiones de ADN que presentan cambios en el número de copias. El sistema reconoce como ganancias aquellas regiones donde la relación de fluorescencia tumoral/normal (T/N) sea mayor a 1.25 ( $\log_2 = 0.32$ ) y como pérdidas a las regiones con una relación menor a 0.75 ( $\log_2 = -0.41$ ). Se consideró amplificación a las regiones con una relación superior a 2 ( $\log_2=1$ ), en

base a parámetros previamente establecidos para experimentos de HGC sobre microarreglos.<sup>45</sup>

Para la visualización gráfica de los datos generados por HGC sobre microarreglos se utilizó el programa CGH-Explorer, del Departamento de Bioinformática de la Universidad de Oslo, Noruega, disponible en la dirección: <http://www.ifi.uio.no/bioinf/Papers/CGH/>.

El CGH-Explorer, es un programa para visualización y análisis estadístico de datos de HGC basados en microarreglos, las principales características que contiene este programa son, importación de datos a partir de archivos en EXCEL o de texto, pre-procesamiento de datos (transformaciones logarítmicas, promedios) y exploración gráfica de los datos de microarreglos individuales o de grupos. Los tipos básicos de gráficas que genera el programa son las gráficas de puntos, gráficas de frecuencias y agrupamiento de número de copias como una función de la posición genómica. Este programa explora datos en escala genómica, dentro del rango del genoma completo hasta partes de algún cromosoma, el programa permite seleccionar la región de interés y aumentar o disminuir la escala. La información de los genes individuales representados en las gráficas pueden ser obtenidos de diferentes maneras, una de las maneras es buscar los genes con sus nombres y el programa los localizará en la gráfica y los mostrará con diferentes colores, de manera alternativa apuntando con el selector sobre un punto de la gráfica, el programa de manera automática mostrará el nombre del gen, finalmente también se puede seleccionar una colección de medidas y obtener una tabla con información textual acerca de los correspondientes genes y ligas para cada gen a una base de datos como Entrez.<sup>46</sup>

## RESULTADOS

### **Detección de secuencias de Virus de Papiloma Humano**

Al total de las muestras estudiadas, se les realizó el análisis de detección de secuencias de Virus de Papiloma Humano mediante amplificación por PCR. Posteriormente, se realizó la tipificación comparando las secuencias detectadas con las secuencias reportadas en GeneBank, mediante el programa *BLAST*, en la dirección electrónica: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

De las pruebas realizadas por PCR, en 10/21 muestras se detectaron secuencias de VPH (47.6%), de las cuales 8 fueron de tipo 16 y 2 de tipo 11. En el resto de las muestras no se detectaron secuencias de VPH.

### **Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos (HGCa)**

Para determinar las alteraciones génicas específicas que se presentan asociadas al cáncer de laringe, se realizaron experimentos de HGCa. Una vez determinado el patrón de alteraciones, se identificó a los genes particulares que pueden estar involucrados en el proceso de carcinogénesis en laringe. En el anexo 1 se encuentra el total de alteraciones que se presentaron en todos los casos estudiados.

Todas las muestras analizadas presentaron alteraciones génicas, desde 3/287 (alteraciones/blancos totales en el arreglo) hasta 50/287 alteraciones. El número de amplificaciones fue de 2.2 veces más que las deleciones (252 vs. 119) y el número promedio de alteraciones (PA= número total de alteraciones en todas las muestras / número total de casos) fue de 17.6 alteraciones por caso. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Número total de alteraciones por caso.

CASO	TIPO TUMOR	VPH	TABAQUISMO	AMPLIFICACIONES	DELECCIONES	TOTAL
1.-L1	PREMALIGNA	11	No	23	1	24
2.-L2	PREMALIGNA	11	No	5	1	6
3.-L3	INVASIVO	16	Si	5	3	8
4.-L4	INVASIVO	16	Si	16	0	16
5.-L5	INVASIVO	16	Si	15	3	18
6.-L6	INVASIVO	16	Si	9	4	13
7.-L7	INVASIVO	16	Si	15	3	18
8.-L8	INVASIVO	16	No	3	1	4
9.-L9	INVASIVO	16	Si	5	9	14
10.-L10	INVASIVO	16	Si	26	6	32
11.-L11	INVASIVO	N/D	Si	7	4	11
12.-L12	INVASIVO	N/D	Si	9	1	10
13.-L13	INVASIVO	N/D	Si	14	7	21
14.-L14	INVASIVO	N/D	No	9	3	12
15.-L15	INVASIVO	N/D	Si	3	2	5
16.-L16	INVASIVO	N/D	Si	2	1	3
17.-L17	INVASIVO	N/D	Si	7	23	30
18.-L18	INVASIVO	N/D	Si	20	30	50
19.-L19	INVASIVO	N/D	Si	16	6	22
20.-L20	INVASIVO	N/D	Si	19	1	20
21.-L21	INVASIVO	N/D	Si	24	10	34

En esta tabla se muestran los números de alteraciones de tipo amplificación y delección de cada uno de los casos analizados. Las iniciales que encabezan las columnas significan: CASO=Pacientes estudiados de L1-L21; TIPO TUMOR=Invasor o Premaligno;VPH=Virus de papiloma humano detectado en cada caso (11,16 y N/D, no detectado); TABAQUISMO=hábito de fumar, SI o NO; AMPLIFICACIONES=Numero de alteraciones de tipo amplificación; DELECCIONES=Número de alteraciones de tipo delección; TOTAL=Número total de alteraciones por caso.

### ***Alteraciones en lesiones premalignas***

En las 2 muestras de lesiones premalignas analizadas por HGCa (L1 y L2) se presentaron alteraciones génicas, en un caso 6/287 alteraciones y en el otro caso 24/287 alteraciones. Todas las alteraciones fueron principalmente de tipo ganancia y ambas presentaron la misma pérdida en el gen 129F16/SP6.

### ***Alteraciones en tumores malignos***

La ganancia mas común de las 19 muestras de tumores invasores de laringe (L3-L21) se presentó en *RBP1-RBP2* (Proteína que une retinol 1 y 2, 3q21-q22, figura 2) en 10/19 muestras (52.6%) seguido de la amplificación de *EGFR* (Receptor del factor de crecimiento epidermoide, 7p12.3-p12.1, figura 3) en 9/19 muestras (47.3%).

La pérdida más común se encontró en *RAF1* (Cinasa Raf-1, 3p25) en 3/19 casos (15.7%).

### ***Alteraciones en tumores malignos positivos para VPH16***

La amplificación mas frecuente en las 8 muestras de tumores invasores positivas para VPH16 (L3-L10) se presentó en *EGFR* (Receptor de factor de crecimiento epidermoide, 7p12.3-p12.1) en 4/8 muestras (50%) seguido de la ganancia en *RBP1-RBP2* (Proteína que une retinol 1 y 2, 3q21-q22) en 4/8 casos (50%).

### ***Alteraciones en tumores malignos negativos para VPH***

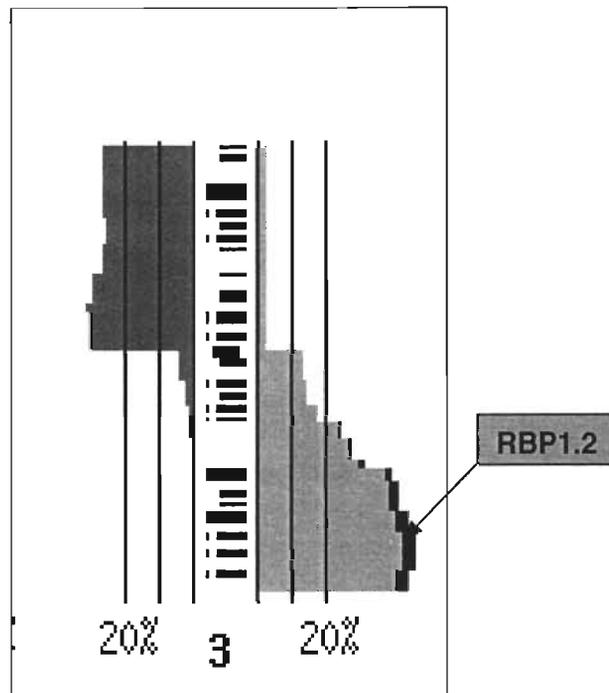
La ganancia más común en los 11 casos de tumores invasivos negativos para VPH (L11-L21) se presentó en *RBP1-RBP2* (Proteína que une retinol 1 y 2, 3q21-q22) en 6/11 casos (54.5%) seguido de la amplificación en *EGFR* (Receptor del factor de crecimiento epidermoide, 7p12.3-p12.1) en 4/11 casos (36.3%). La pérdida mas común se encontró en *RAF1* (Cinasa Raf-1, 3p25) en 3/11 casos (27.2%).

## **Visualización**

Para la exploración gráfica de los resultados de los casos premalignos (L1 y L2) se utilizó la gráfica de puntos que ofrece el programa CGH-Explorer (figura 4) de la misma manera, la exploración gráfica de los resultados de los casos invasores (L3-L21) se utilizó la gráfica de puntos. (figura 5) Adicionalmente se realizó la gráfica de puntos para los cromosomas 3 y 7 que contienen a *RBP1* y *2* y *EGFR*, respectivamente (figuras 6 y 7)

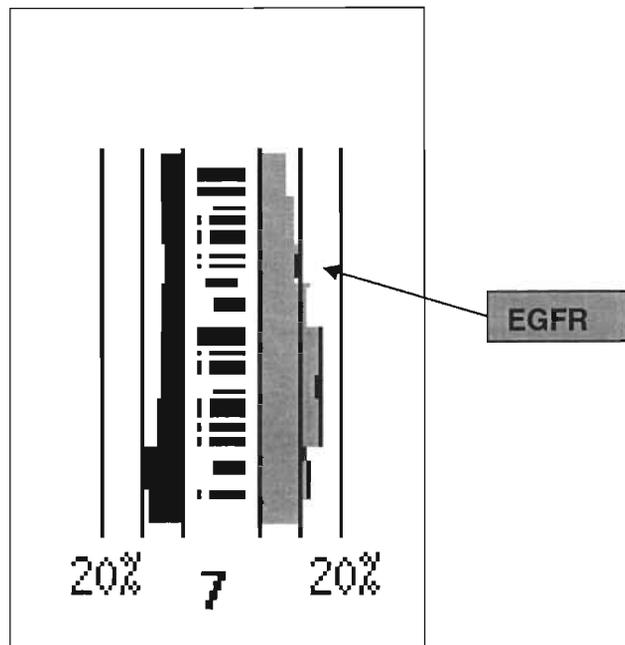
El procedimiento completo para realizar la exploración gráfica de los resultados, se realizó de la siguiente manera; primero se importaron los datos contenidos en un archivo de EXCEL, al programa CGH-Explorer, se seleccionan las columnas que se van a graficar y que contienen los valores de la relación T/N (figura 8). Una vez seleccionados las columnas de datos se selecciona el tipo de gráfica. Para los resultados obtenidos por HGC en microarreglos se seleccionaron las gráficas de puntos. (figuras 4-7)

**Figura 2.** Definición de la alteración génica presente en el cromosoma 3.



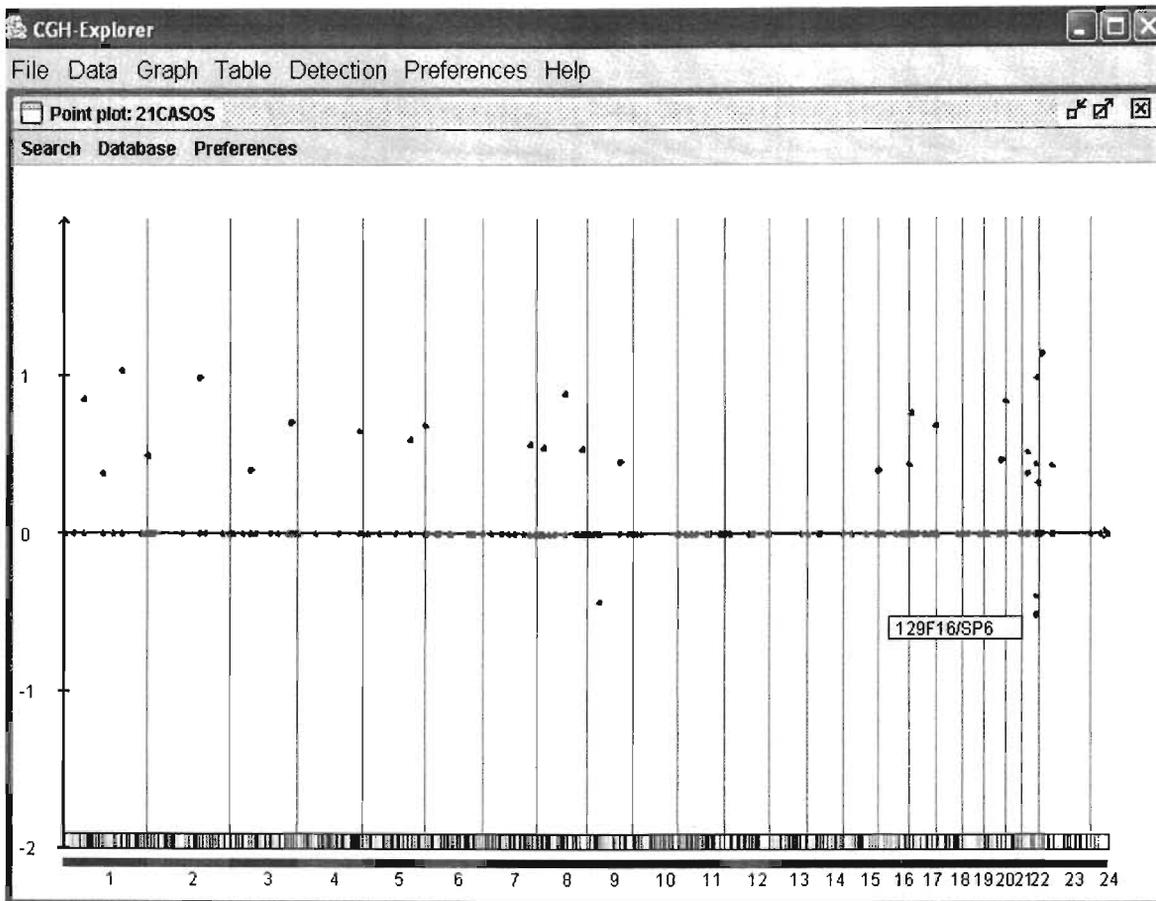
En esta figura se muestra la suma de alteraciones cromosómicas presentes en el cromosoma 3 obtenidas por hibridación genómica comparativa sobre metafases en muestras tumorales de laringe y el sitio de localización del gen RBP1,2 (Proteína que une retinol 1 Y 2, 3q21-q22) que fue obtenido por hibridación genómica comparativa sobre microarreglos. Este gen presentó ganancia en 10/19 muestras (52.6%).

**Figura 3.** Definición de la alteración génica presente en el cromosoma 7.



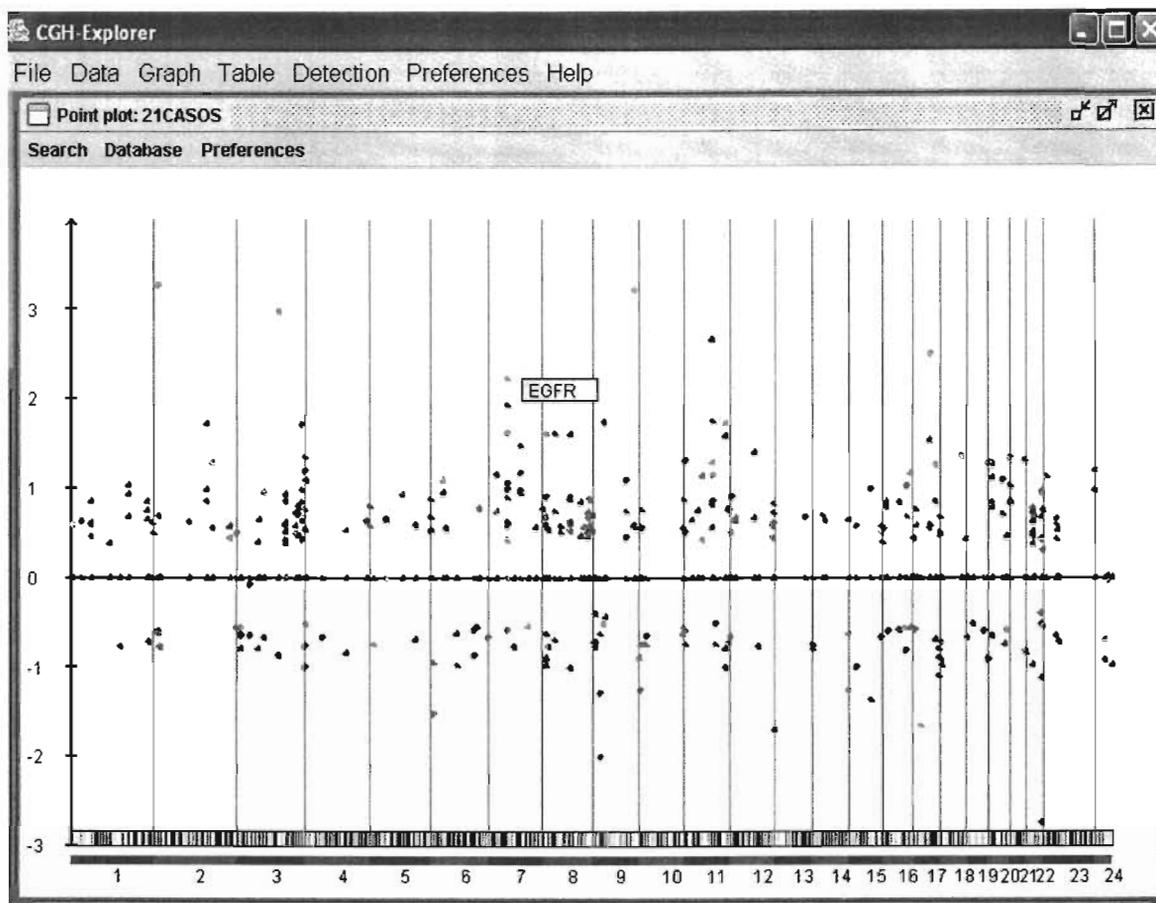
En esta figura se muestra la suma de alteraciones cromosómicas presentes en el cromosoma 7 obtenidas por hibridación genómica comparativa sobre metafases en muestras tumorales de laringe y el sitio de localización del gen EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidermoide, 7p12.3-p12.1) que fue obtenido por hibridación genómica comparativa sobre microarreglos. Este gen se presentó amplificado en 9/19 muestras (47.3%).

**Figura 4.** Visualización gráfica de las lesiones premalignas L1 y L2.



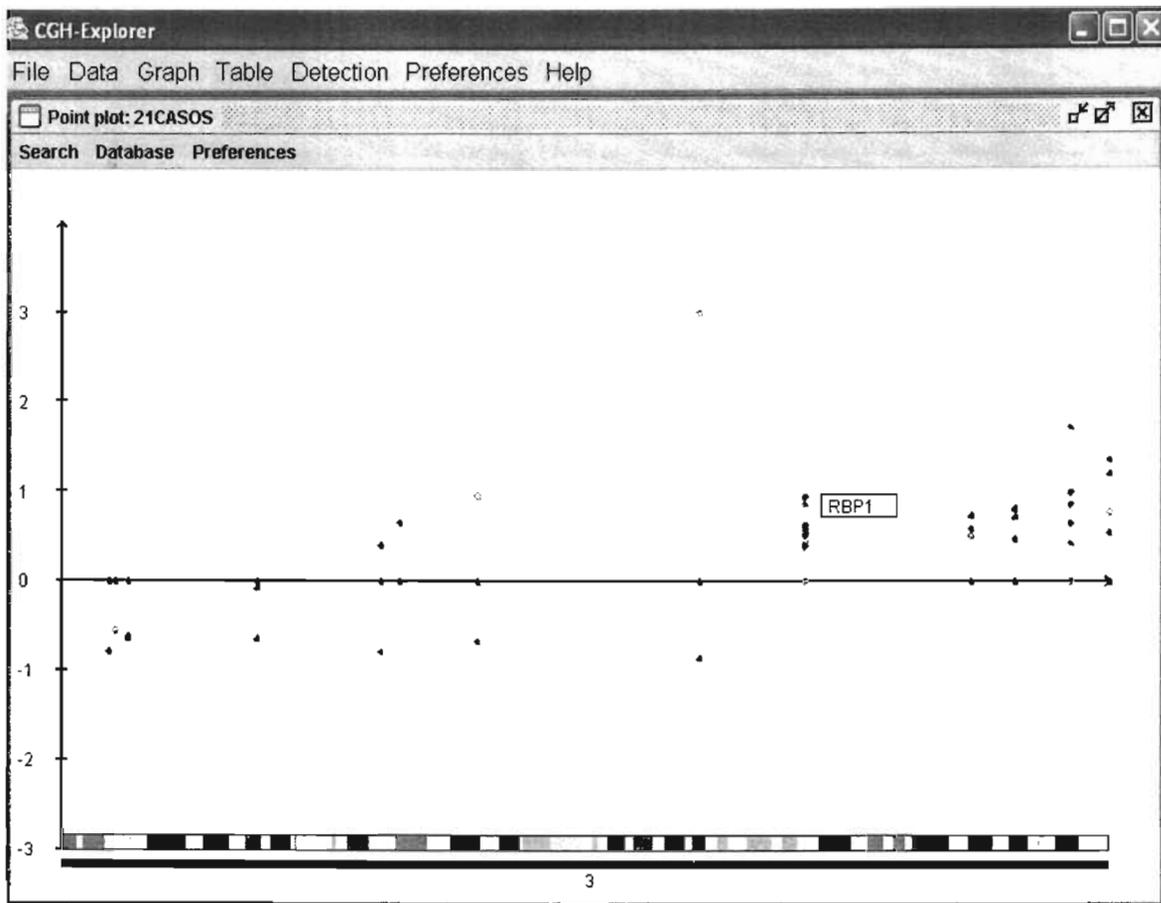
En esta gráfica se muestra los dos casos premalignos (L1 y L2) que se incluyeron en este estudio. En el eje horizontal se representan a los cromosomas y en el eje vertical a los valores de la relación T/N. Las alteraciones que se observan son de tipo ganancia y amplificación y se presenta la misma pérdida en los dos casos en el gen 129F16/SP6.

Figura 5. Visualización gráfica de los tumores invasores.



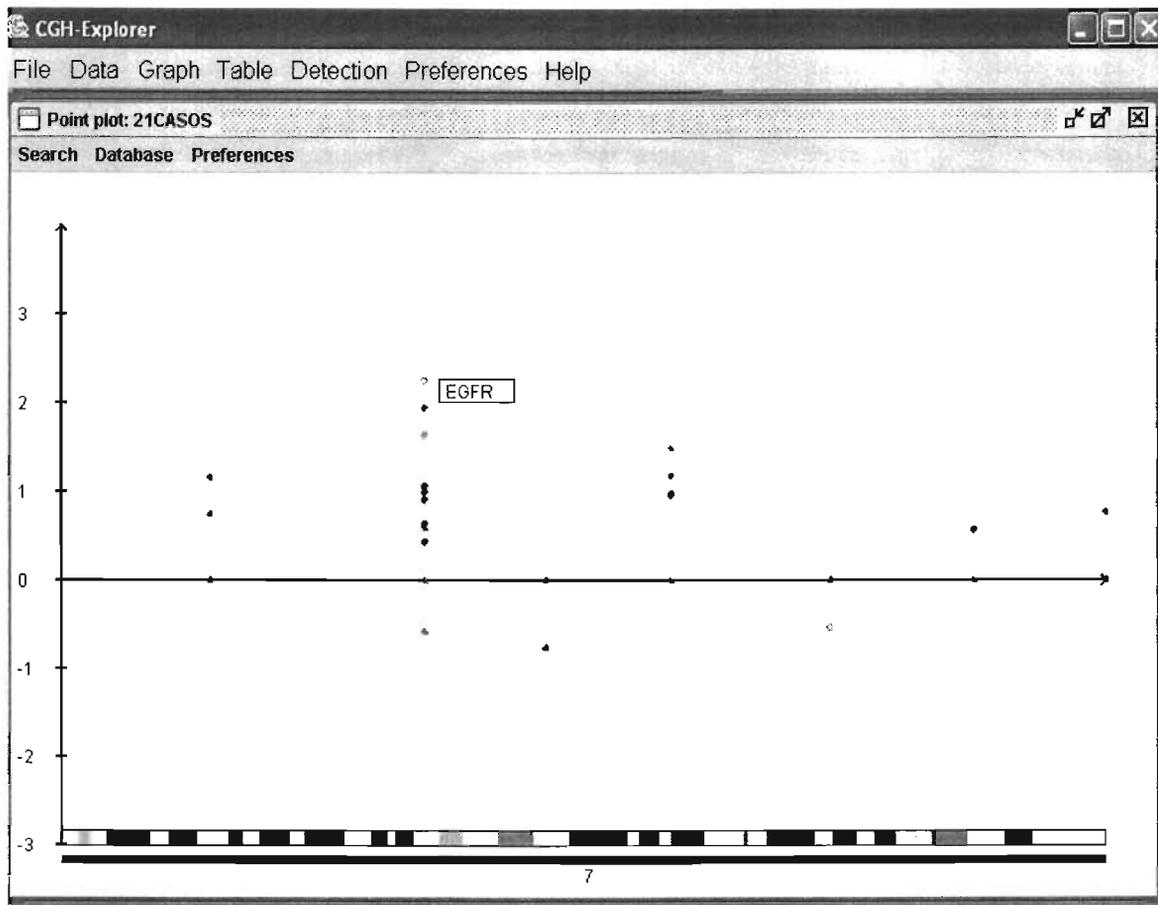
En esta gráfica se muestran los 19 casos de tumores invasores (L3-L21) estudiados por microarreglos. En el eje horizontal se representan a los cromosomas y en el eje vertical los valores de la relación T/N. El programa convierte los valores T/N a  $\log_2$ , para obtener valores positivos y negativos, de esta manera los valores superiores a 1 en  $\log_2$  son positivos y los valores inferiores a 1 en  $\log_2$  son negativos. En la gráfica los puntos que se encuentran por arriba de 0 se interpretan como ganancias y amplificaciones y los puntos que se encuentran por debajo de 0 se interpretan como pérdidas. En esta gráfica se muestra en el rectángulo a EGFR con nueve puntos que corresponden a nueve casos que presentaron esta amplificación.

Figura 6. Visualización gráfica del cromosoma 3.



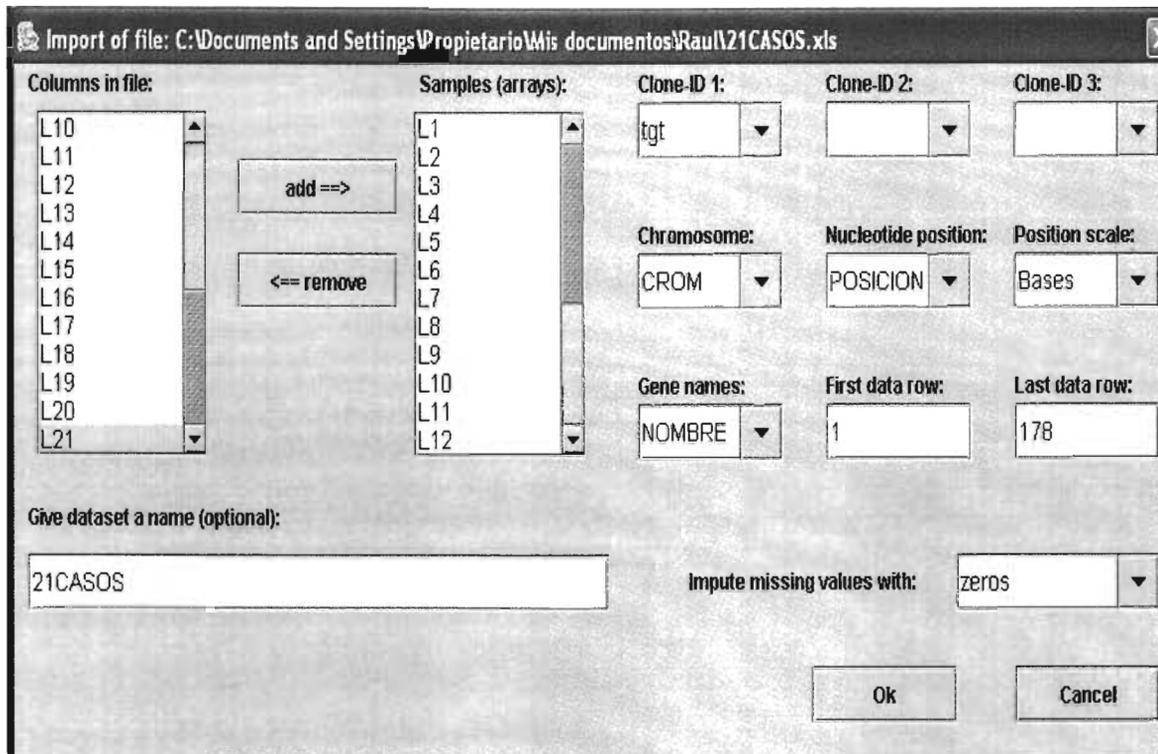
Gráfica de puntos del cromosoma 3. En el eje horizontal se muestra al cromosoma 3 dividido en bandas citogenéticas que nos proporciona la posición de los genes y en el eje vertical al valor de la relación T/N en log2 de cada uno de los genes representados como puntos. En el rectángulo se señala a RBP1, uno de los dos genes que con más frecuencia sufrió de ganancia (10 veces). También se puede ver que en la región 3p las alteraciones son predominantemente de tipo pérdida mientras que en la región 3q las alteraciones son predominantemente de tipo ganancia.

Figura 7. Visualización gráfica del cromosoma 7.



Gráfica de puntos del cromosoma 7. En el eje horizontal se muestra al cromosoma 7 dividido en bandas citogenéticas que nos proporciona la posición de los genes y en el eje vertical al valor de la relación T/N en log2 de cada uno de los genes representados como puntos. En el rectángulo se señala a EGFR, uno de los dos genes que con mas frecuencia sufrió de amplificación y ganancia (9 veces). En este cromosoma se observaron predominantemente amplificaciones.

Figura 8. Ventana de diálogo.



En esta figura se muestra, la ventana de diálogo que aparece una vez que el programa realiza la lectura del archivo que contiene los valores de la relación T/N. A este procedimiento se le llama importación de datos. En esta ventana, se seleccionan las columnas que contienen los datos que pide el programa. Una vez seleccionadas las columnas, el programa realiza la lectura del archivo, aparece la ventana de selección y se selecciona el tipo de gráfica. (figuras 4-7)

## DISCUSIÓN

En el proceso de carcinogénesis están involucrados la interacción de diferentes factores que modulan el crecimiento celular y diferenciación en particular, los oncogenes y genes supresores de tumor. Los protooncogenes y genes supresores de tumor son blancos de factores de riesgo como las moléculas carcinogénicas del humo del cigarro, la radiación ionizante y las oncoproteínas del virus de papiloma humano. Todos estos factores están relacionados al carcinoma epidermoide de laringe. Algunos de los eventos moleculares que inducen la carcinogénesis laringea todavía no son bien definidos, pero uno de los eventos que se presentan en todos los carcinomas, son las alteraciones cromosómicas. Estas alteraciones han sido asociadas con el sitio de localización de oncogenes y genes supresores de tumor. El estudio de las alteraciones en oncogenes y sus productos proteicos nos ofrece nueva información que puede ser utilizada en aplicaciones terapéuticas y en diagnóstico.<sup>47</sup>

En general, los estudios de cariotipos de los tumores, así como de las células transformadas por VPH, han demostrado que tienen alteraciones moleculares complejas, tales como alteraciones estructurales, ganancia y pérdida de regiones cromosómicas o de cromosomas completos. La metodología de hibridación genómica comparativa (HGC) es particularmente útil para detectar alteraciones numéricas desbalanceadas como las que se han mencionado anteriormente.<sup>48</sup>

Estudios previos realizados por HGC sobre cromosomas en metafases han delimitado un patrón específico de desbalances cromosómicos que se presentan en el cáncer de laringe. Así, se han encontrado alteraciones en prácticamente todos los cromosomas somáticos y se ha detectado que las ganancias mas frecuentes se localizan en 3q, 5p, 7 y 8q mientras que las pérdidas mas frecuentes se localizan en 3p, 5q, 9p y 13.<sup>49</sup> Sin embargo, se conoce poco acerca de la identidad de genes particulares que podrían ser blancos de cambios en el número de copias, por tal razón se uso la HGC sobre

microarreglos (HGCa) la cual se convierte en un método atractivo para definir estos genes particulares.

En el presente estudio, se detectó por HGCa que las alteraciones mas frecuentes de tipo amplificación se localizaron en los genes EGFR (3q21-q22) y en RBP1-RBP2 (7p12.3-p12.1) mientras que la alteración más común de tipo deleción se encontró en RAF-1 (3p25), observándose así que existe una concordancia entre las alteraciones detectadas por HGCa y el patrón de desbalances cromosomicas descritos previamente por HGCM.<sup>49</sup>

Sin embargo, el microarreglo que se utilizó no cubre todo el genoma, por lo que se identificaron alteraciones génicas únicamente en genes particulares y marcadores genéticos que están relacionados en el proceso de transformación celular en diferentes tipos de neoplasias. Es claro que otras alteraciones cromosómicas están presentes en tejidos con este tipo de neoplasia.

En las alteraciones que se presentaron en las lesiones premalignas, es importante notar que debido al limitado número de muestras analizadas, no fue posible detectar alguna región particular que pudiera estar relacionado con este estado de la enfermedad. Sin embargo, se observó que de las alteraciones presentes en las lesiones premalignas ambas presentaron la misma pérdida en el gen 129F16/SP6 y las alteraciones de tipo ganancia no coincidieron con las alteraciones presentes en los tumores invasores. Adicionalmente, en estas lesiones premalignas se detectó la presencia de VPH11.

En los tumores invasores, con el análisis por microarreglos se detectaron a las regiones cromosómicas amplificadas con mayor frecuencia en RBP1-RBP2 (Proteína que une retinol 1 y 2, 52.6%) y en EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidermoide, 47.3%) localizados en 3q21-q22 y 7p12.3-p12.1, respectivamente.

La proteína que une retinol 1 y 2 (RBP1,2) está involucrada en el transporte del retinol (vitamina A) desde sus sitios de almacenamiento en el hígado hasta los tejidos periféricos.

El retinol interviene en procesos importantes tales como el crecimiento y la diferenciación de los tejidos.<sup>50</sup>

El mecanismo por el cual la vitamina A regula el crecimiento y diferenciación del epitelio de las vías respiratorias, no está del todo comprendido. La vitamina A tiene un importante papel en la regulación de EGF (Factor de crecimiento epidermoide) en el epitelio respiratorio, participa en el aumento de la afinidad de EGF a su receptor. La amplificación de RBP1,2 en el epitelio laríngeo podría alterar el metabolismo de vitamina A y afectar el proceso de diferenciación epitelial.<sup>51-54</sup>

Por otro lado, la amplificación del receptor del factor de crecimiento epidermoide (*EGFR*, 7p12.3-p12.1) que se encontró amplificado en el 47.3% de los tumores invasivos analizados por microarreglos, nos indica que juega un importante papel en estos tumores. *EGFR* es un receptor de proteína transmembranal con actividad de cinasa de tirosina, entre las funciones que realiza esta proteína dentro del tejido respiratorio es la inducción de proliferación y crecimiento celular y diferenciación de células basales a células de secreción no granuladas y la posterior producción de mucina.<sup>55</sup>

En diferentes estudios se ha reportado la sobreexpresión de *EGFR* en carcinomas y papilomas laringeos, asociados a la infección por VPH y un incremento en su expresión se asocia con un pobre pronóstico en algunos casos.<sup>56-67</sup> En el presente trabajo se identificaron en el 42.1% de los tumores invasivos, secuencias virales de VPH16 y una amplificación de *EGFR* en 50% de estos casos positivos para VPH. En algunos casos negativos a VPH se presentó ganancia de *EGFR*. En los casos positivos a VPH16 que presentan amplificación de *EGFR*, el posible mecanismo del desarrollo del tumor se tiene mediante la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 y el incremento de la expresión y activación de *EGFR* y la proteína viral E5 que participa en el reciclamiento de *EGFR* a la superficie celular. La proteína viral E5, que se asocia con el Aparato de Golgi y membrana plasmática, tiene capacidad de interactuar con *EGFR* e incrementar el

reciclamiento del receptor a la superficie celular.<sup>68</sup> La amplificación del oncogen EGFR, nos indica que la vía de señalización de EGFR juega un importante papel en la progresión de un grupo de papilomas y carcinomas.

Por otro lado, la delección de Raf-1 en 27.2% de los casos de tumores invasores negativos para VPH, nos sugiere ser un mecanismo asociado a este tipo de tumor. Raf-1 es una proteína del citosol con actividad de cinasa que participa en el crecimiento, proliferación y transformación celular. Estudios previos sugieren que Raf-1, tiene una participación central en la respuesta al daño por mutaciones en el cáncer de laringe, de esta manera una inactivación de este gen, produce mayor sensibilidad a daños cromosomales producidos por los diferentes factores de riesgo.<sup>69-71</sup>

## **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

La aplicación del HGC sobre microarreglos para el estudio del cáncer de laringe, nos ha permitido definir a genes específicos en los que se altera su número de copias y que se encuentran involucrados en esta neoplasia, tales como RBP1, 2 (Proteína que une retinol 1 y 2) y EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidermoide). De las muestras positivas para VPH, no se encontró una relación entre la infección y la presencia de estas alteraciones.

La identificación de estos genes nos permitirá realizar estudios de validación aplicando metodologías, como análisis de expresión y de esta manera determinar el papel funcional de estas alteraciones génicas como marcadores moleculares.

## REFERENCIAS

- 1.- Ramírez-Camacho R, Algaba J, Cenjor C, Ciges M, Gavilan J, Quesada P. (1998) Anatomía, Fisiología y Embriología de la laringe. Manual de Otorrinolaringología, 1ª. ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana, España.
- 2.- Gartner L, Hiatt J. (1997) Sistema Respiratorio. Histología, Texto y Atlas, 1ª. ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México.
- 3.- Kumar V, Cotran R, Robbins S. (1999) Pulmones y Vías Respiratorias Altas. Patología Humana, 6ª. ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México.
- 4.- <http://www-depdb.iarc.fr/globocan>
- 5.- Morbilidad y Mortalidad. (2002) Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Secretaria de Salud.
- 6.- Meneses-García A, Mohar A. (1999) Neoplasias Malignas del Aparato Digestivo y Respiratorio Superiores. Principales Neoplasias Malignas en México, 1ra. ed. Editorial El Manual Moderno, México.
- 7.- Ramírez-Camacho R, Algaba J, Cenjor C, Ciges M, Gavilan J, Quesada P. (1998) Tumores de la laringe. Manual de Otorrinolaringología, 1ª. Editorial McGraw-Hill Interamericana, España.
- 8.- Braakhuis B, Snijders P, Keune W, Meijer C. (2004) Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J. Natl. Cancer Inst.* 96(13): 998-1006.
- 9.- Hoshikawa T, Nakayima T, Uhara H, Gotoh M, Shimosato Y, Tsutsumi K, Ono I, Ebihara S. (1990) Detection of human papillomavirus ADN in laryngeal squamous cell carcinomas by polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* 100:647-50.
- 10.- Perez-Ayala M, Ruiz-Cabello F, Esteban F, Concha A, Redondo M, Oliva MR, Cabrera T, Garrido F. (1990) Presence of HPV 16 sequences in laryngeal carcinomas. *Int. J Cancer.* 46:8-11

- 11.- Watts SL, Brewer EE, Fry TL. (1991) HPV ADN in head and neck carcinomas. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 71:701-707.
- 12.- Morgan DW, Abdullah V, Quiney R, Myint S. (1991) Human papilloma virus and carcinoma of the laryngopharynx. *J. Laringol. Otol.*105(4): 288-90.
- 13.- Anwar K, Nakakuki K, Naike H, Inuzuka M. (1993) Ras gene mutations and HPV infection are common in human laryngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 53:28.
- 14.- Kasperbauer JL, OHalloran GL, Espy MJ, Smith TF, Lewis JE. (1993) Polymerase chain reaction (PCR) identification of human papillomavirus (HPV) ADN in verrucous carcinoma of the larynx. *Laryngoscope.*103:416-20.
- 15.- Gorgoulis V, Rassidakis G, Karameris A, Giatromanolaki A, Barbatis C, Kittas C. (1994) Expression of p53 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia: possible correlation with human papillomavirus infection and clinicopathological findings. *Virchows Arch.* 425:481-489.
- 16.- Fliss DM, Noble-Topham SE, McLachlin M, Freeman JL, Noyek AM, van Nostrand AW, Hartwick RW. (1994) Laryngeal verrucous carcinoma: a clinicopathologic study and detection of human papillomavirus using polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* 104(2):146-52.
- 17.- Fouret P, Dabit D, Sibony M, Alili D, Commo F, Saint-Guily JL, Callard P. (1995) Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infection in precancer lesions of the larynx. *Am J Pathol.* 146:599-604.
- 18.- Pou AM, Rimell FL, Jordan JA, Shoemaker DL, Johnson JT, Barua P, Post JC, Ehrlich GD. (1995) Adult respiratory papillomatosis: human papillomavirus type and viral coinfections as predictors of prognosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 104:758-762.
- 19.- Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Posteraro P, Scarano E, Ottaviani F, Paludetti G, Maurizi M. (1996) Detection of human papillomavirus ADN in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Eur J Cancer.* 32A :783-788.

- 20.- Lie ES, Karlsen F, Holm R. (1996) Presence of human papillomavirus in squamous cell laryngeal carcinomas. A study of thirty-nine cases using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Acta Otolaryngol.* 116:900-905
- 21.- Alvarez-Alvarez I, Sanchez-Lazo P, Ramos-Gonzalez S, Rodrigo-Tapia JP, Nunez-Batalla F, Suarez-Nieto C. (1996) Simultaneous screening of HPV-6b and 16 in pharyngolaryngeal cancer. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 47(2):93-6.
- 22.- Garcia-Milian R, Hernandez H, Panade L, Rodríguez C, Gonzalez N, Valenzuela C, Arana MD, Perea SE. (1998) Detection and typing of human papillomavirus ADN in benign and malignant tumours of laryngeal epithelium. *Acta Otolaryngol.* 118(5):754-8.
- 23.- Mineta H, Ogino T, Amano HM, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, Miura K. (1998) Human papilloma virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 18(6B):4765-8.
- 24.- Atula S., Grenman R., Kujari H., Syrjanen S. (1999). Detection of Human Papillomavirus (HPV) in Laryngeal Carcinoma Cell Lines Provides Evidence for a Heterogeneous Cell Population. *Eur. J. Can.*, 35(5), 825-832.
- 25.- Wang L, Zhang T, Zhang F. (1999) Study on the association between squamous cell carcinoma of larynx and HPV subgene by PCR. *Zhonghua* .34(2):106-7.
- 26.- Azzimonti B, Hertel L, Aluffi P, Pia F, Monga G, Zocchi M, Landolfo S, Gariglio M. (1999) Demonstration of multiple HPV types in laryngeal premalignant lesions using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J. Med. Virol.* 59(1):110-6.
- 27.- Venuti A, Manni V, Morello R, De Marco F, Marzetti F, Marcante ML. (2000) Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J. Med. Virol.* 60(4):396-402.
- 28.- Mutiu A, Alexiu I, Chivu M, Petica M, Anton G, Bleotu C, Diaconu C, Popescu C, Jucu V, Cernescu C. (2001) Detection of human papillomavirus gene sequences in cell lines derived from laryngeal tumors. *J. Cell. Mol. Med.* 5:49-59.

- 29.- Jacob SE, Sreevidya S, Chacko E, Pillai MR. (2002) Cellular manifestations of human papillomavirus infection in laryngeal tissues. *J. Surg. Oncol.* 79(3):142-50.
- 30.- Ried T, Hesselmeier-Haddad K, Blegen H., Schrock E, Auer G. (1999). Genomics Changes Defining the Genesis, Progression, and Malignancy Potential in Solid Human Tumors: A Phenotype/Genotype Correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 25:195-204.
- 31.- Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Dictor M, Mertens F. (2000). Nonrandom pattern of cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the larynx. *Genes Chromosomes Cancer* 28:66-76.
- 32.- Kujawski M, Rydzanicz M, Sarlomo-Rikala M, Szyfter K. (2002) Rearrangement of 13q chromosome arm committed to the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 137(1):54-8.
- 33.-Bielas JH, Loeb LA. (2005) Mutator Phenotype in cancer: Timing and Perspectives. *Environ. Mol. Mutagen.* 45:206-213.
- 34.- Struski S, Doco-Fenzy M, Cornillet-Lefebvre P. (2002) Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genet. Cytogenet.* 135:63-90. Review.
- 35.- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 258:818-821.
- 36.- Hidalgo A, Cheng S, Pérez C, Martínez I, González B, Salcedo M. (2000) Hibridación Genómica Comparativa. Una nueva estrategia para el análisis genético del cáncer. *Ciencia y Desarrollo.* 152:26-33.
- 37.- Kujawski M, Rydzanicz M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, Szyfter K. (2002). Chromosome alterations reflect clonal evolution in squamous cell carcinoma of the larynx. *Med. Sci. Monit.* 8(7): BR279-282.
- 38.- <http://www.progenetix.net>

- 39.- Hidalgo A, Salcedo M. (2001) Estrategias de Análisis Global. Hacia el manejo Genético de las Neoplasias. *Rev. Inv. Clin.* 53(5):430-443.
- 40.- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 20:399-407.
- 41.- Albertson D, Pinkel D. (2003) Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 12(2): R145-R152
- 42.- Monni O, Barlund M, Mousses S, Kononen J, Sauter G, Heiskanen M, Paavola P, Avela K, Chen Y, Bittner ML, Kallioniemi A. (2001) Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98:5711–5716.
- 43.- Snijders AN, Nowee ME, Fridlyand J, Piek JM, Dorsman JC, Jain AN, Pinkel D, Van Diest PJ, Verheijen RH, Albertson DG. (2003) Genome-wide array based comparative genomic hybridization reveals genetic homogeneity and frequent copy number increases encompassing CCNE1 in Fallopian tube carcinoma. *Oncogene.* 22:4281– 4286.
- 44.- Wilhelm M, Veltman JA, Olshen AB, Jain AN, Moore DH, Presti JC, Kovacs G, Waldman FM. (2002) Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res.* 62:957–960.
- 45.-Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG. (2001) Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nature Genet.* 29: 263-264.
- 46.- Lingjaerde OC, Baumbusch LO, Liestol K, Glad IK, Borresen-Dale AL. (2005) CGH-Explorer: a program for analysis of array-CGH data. *Bioinformatics.* 21(6): 821-822.

- 47.- Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurung E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH. (1998) Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res.*18(6B):4793-800.
- 48.- Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Galli J, Bussu F, Ferrandina G, Scambia G, Fadda G, Maurizi M. (2001) Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 3988-3993.
- 49.- Kujawski M, Rydzanicz M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, Szyfter K. (2002). Chromosome alterations reflect clonal evolution in squamous cell carcinoma of the larynx. *Med. Sci. Monit.* 8(7): BR279-282.
- 50.- Graham S, Mettlin C, Marshall J, Priore R, Rzepka T, Shedd D. (1981) Dietary factors in the epidemiology of cancer of the larynx. *Am. J. Epidemiol.* 113(6):675-80.
- 51.- Jetten AM. (1980) Retinoids specifically enhance the number of epidermal growth factor receptors. *Nature.* 284(5757):626-9.
- 52.- Bichler E, Daxenbichler G, Marth C. (1983) Vitamin A status and retinoid-binding proteins in carcinomas of the head and neck region. *Oncol.* 40(5):336-9.
- 53.- Drozd M, Gierek T, Jendryczko A, Piekarska J, Pilch J, Polanska D. (1989) Zinc, vitamins A and E, and retinol-binding protein in sera of patients with cancer of the larynx. *Neoplasma.* 36(3):357-62.
- 54.- Miller LA, Cheng LZ, Wu R. (1993) Inhibition of epidermal growth factor-like growth factor secretion in tracheobronchial epithelial cells by vitamin A. *Cancer Res.* 53(11):2527-33.
- 55.- Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agusti C, Lausier JA, Ueki IF, Grattan KM, Nadel JA. (1999) Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3081-3086.

- 56.- Johnston D, Hall H, DiLorenzo TP, Steinberg BM. (1999) Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res.* 59, 968-974.
- 57.- Woodworth CD, Gaiotti D, Michael E, Hansen L, Nees M. (2000) Targeted disruption of the epidermal growth factor receptor inhibits development of papillomas and carcinomas from human papillomavirus-immortalized keratinocytes. *Cancer Res.* 60, 4397-4402.
- 58.- Pivot X, Magne N, Guardiola E, Poissonnet G, Dassonville O, Francoual M, Formento JL, Bensadoun RJ, Demard F, Schneider M, Milano G. (2005) Prognostic impact of the epidermal growth factor receptor levels for patients with larynx and hypopharynx cancer. *Oral Oncol.* 41(3):320-7.
- 59.- Di Marco E, Albanese E, Benso S, Beatrice F, Cancedda R, Toma S. (1992) Expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in human larynx carcinoma. *Cancer Lett.* 65(3):189-99
- 60.- Putti TC, To KF, Hsu HC. (2002) Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. *Histopathology.* 41(2):144-51.
- 61.- Rafferty MA, Fenton JE, Jones AS. (2001) An overview of the role and inter-relationship of epidermal growth factor receptor, cyclin D and retinoblastoma protein on the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the larynx. *Clin. Otolaryngol.* 26(4):317-20.
- 62.- Lee CS, Redshaw A, Boag G. (1997) Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol.* 29(3):251-4.
- 63.- Rucci L, Bocciolini C, Franchi A, Ferlito A, Casucci A. (2004) Epidermal growth factor receptor and p53 expression in T1-T2 glottic cancer involving the anterior or posterior commissure. *Acta Otolaryngol.* 124(1):102-6.

- 64.- Bier H, Hoffmann T, Hauser U, Wink M, Ochler M, Kovar A, Muser M, Knecht R. (2001) Clinical trial with escalating doses of the antiepidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody EMD 72 000 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Cancer Chemother Pharmacol.* 47(6):519-24.
- 65.- Hambek M, Solbach C, Schnuerch HG, Roller M. (2001) Tumor necrosis factor alpha sensitizes low epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing carcinomas for anti-EGFR therapy. *Cancer Res.* 61(3):1045-9.
- 66.- Gale N, Kambic V, Poljak M, Cor A, Velkavrh D, Mlacak B. (2000) Chromosomes 7,17 polysomies and overexpression of epidermal growth factor receptor and p53 protein in epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Oncol.* 58(2):117-25.
- 67.- Uhlman DL, Adams G, Knapp D, Aeppli DM, Niehans G. (1996) Immunohistochemical staining for markers of future neoplastic progression in the larynx. *Cancer Res.* 56(9):2199-205.
- 68.- Tsai TC, Chen SL. (2003) The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch. Virol.* 148, 1445-1453.
- 69.- Soldatenkov VA, Dritschilo A, Wang FH, Olah Z, Anderson WB, Kasid U. (1997) Inhibition of Raf-1 protein kinase by antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide is associated with sensitization of human laryngeal squamous carcinoma cells to gamma radiation. *Cancer J Sci Am.* 3(1):13-20.
- 70.- Kasid U, Pfeifer A, Weichselbaum RR, Dritschilo A, Mark GE (1987) The raf oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. *Science.* 237(4818):1039-41.
- 71.- Gokhale PC, McRae D, Monia BP, Bagg A, Rahman A, Dritschilo A, Kasid U. (1999) Antisense raf oligodeoxyribonucleotide is a radiosensitizer in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9(2):191-201.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

**ANEXO 1. Total de Alteraciones Génicas presentes en todos los casos estudiados.**

CR	NOMBRE	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
1	TP73	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	D1S2660	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.35	1	1
1	D1S214	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.54	1	1	1
1	D1S1635	1.8	1	1	1	7.97	1.51	1	1	1	1	1	1	1	1.37	1	1	1	1.53	1	1	1
1	D1S500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.4
1	D1S418	1.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	D1S2465,D1S346	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	WI-5663,WI-134	2.05	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.91	1	1	1	1	1.61	1	1	2.03	1
1	LAMC2	1	1	1	1.8	1	1	1	1	1	1.57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.68	1
1	PTGS2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.61	1	1	1	1
1	SHGC-18290	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.53	1	1	1	1	1	1	1	1	1.74
1	1QTEL10	1.41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	U32389	1	1	1	1	1	1	9.68	1	1	0.55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2PTEL27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.62	1	1	1	1	1	1	1	0.65	1.89	1	1
2	MYCN	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	GNLV	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.54	1	1	1
2	BIN1	1.98	1	1	1	3.3	1	1	1	1	1.81	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	LRP1B	1	1	1	1.47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.44	1
2	ITGA4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.37	1	1	1	1	1	1.5
2	D2S447	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.42	1	1	1	1	1	1	0.68	1	1	1
3	3PTEL25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.58	1	1	1	1
3	VHL	1	1	0.68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	RAF1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1		1	1	1	0.65

CR	NOMBRE	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
3	MLH1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.64	1	1	1
3	FHIT	1.32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.58	1	1	1
3	P44S10	1	1	1	1.57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	ROBO1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.63	1.93	1	1
3	RBP1	1	1	1.42	1.3	1	1	1	1	1.51	1.49	1.35	1.33	1.43	1	1	1	1	1.81	1	1.91	1.53
3	TERC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.55	1	7.92	1	1
3	EIF5A2	1	1	1.41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1	1	1.65
3	PTK3CA	1.63	1	1	1	1	1.73	1	1	1	1.75	1	1.38	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	TP63	1	1	1.58	1	1	1	1	1	1	1.55	1	1.34	1	1	1	1	1	1.8	1	3.28	1.98
3	MFI2	1	1	1	1	1	1	1.46	1	1	2.55	1	1	1	1	1.7	1	1	1.45	1	2.29	1
3	3QTEL05	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.06	1
4	GS10K2/T7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.59	1	1	1
4	WHSC1	1	1	1	1	2.13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	KIT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	PGRMC2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.45	1	1	1	1	1	1	1	0.56	1	1	1
4	PDZ-GEF1	1.57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	4QTEL11	1	1	1	1.76	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.52	1	1	1
5	C84C11/T3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.19	1	1
5	D5S23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.22	2.23
5	D5S2064	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.78	2.15
5	DAB2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.57	1.58
5	DHFR	1	1	1	1	1	1	1.91	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	APC	1.51	1	1	1	1	1	1	1	0.62	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	CSF1R	1.61	1	1	1.44	1	1	1	1.45	1	1	1	1	1	1	1	1.85	1	1	1	1	1
6	9PTEL48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.52	1	1	1
6	PIM1	1	1	1	1	1	1	2.15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.94

CR	NOMBRE	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
6	D6S414	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.47	1	1	1	1	1	1	1	1.85
6	HTR1B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.65	1	1	1	1
6	D6S434	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	MYB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.67
6	D6S311	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	ESR1	1	1	1	1	1	1.73	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	6QTEL54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.63	1	1	1
7	IL6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.24	1
7	EGFR	1	1	4.74	1	2.08	1	3.1	3.84	1	1.68	1.35	1	1.99	1	1	1	1	1.51	1	1.87	1.55
7	RFC2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	ABCB1(MDR1)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.62
7	CDK6	1	1	1	1	1	2.26	1	1	1	2.81	1	1	1.94	1	1	1	1	1	1	1	1.97
7	MET	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.69	1	1	1	1	1	1
7	TIF1	1.48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	STSG48460	1	1	1	1.71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	D8S504	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.54	1	1	1
8	D8S596	1	1	1	1	1	1	1.61	1	1.51	1	1	1	1	1	1	1	1	0.51	1	1	1
8	CTSB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.88	1	1	1	1	1	1	1	0.53	1	1	0.65
8	PDGRL	1	1	1	1	1	1	3.07	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.51	1	1	1
8	LPL	1.46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.59	1	1	1
8	FGFR1	1	1	1	1	1.68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.62	1	3.07	1
8	MOS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.43	1	1	1.5
8	E2F5	1.85	1	1	1	1	1.88	1	1	0.5	1	1	1	1	1.53	1	1	1.56	1.46	1	1	3.04
8	EXT1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.8	1	1	1.4
8	MYC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1	1	1
8	PTK2	1.45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.4	1.38	1	1.68	1	1	1	1.62	1	1	1
8	SHGC-31110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.86	1	1	1	1.52	1	1	1	1	1	1	1
8	U11829	1	1	1	1	1	1	1	1	1.64	1	1	1	1	1	1	1.46	1	1	1	1	1

CR	NOMBRE	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
9	AF170276	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.61	1	1	0.59
9	D9S913	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	█	1	1	1	1	0.61	0.59	1	1	0.64
9	MTAP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.41	1	1	1
9	CDKN2A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	█	1	1	1	0.25	1	1	1
9	AFM137XA11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3.36	█	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.56
9	D9S166	1	0.74	1	1	1	1	1	█	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	PTCH	1.37	1	1	1	2.13	1	1	1	1	1.68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	DBCCR1	1	1	1	1	1.51	1	9.31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.49	1	1	1
9	ABL1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.54	1	1
10	10QTELO06	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	█	1	1
10	SHGC-44253	1	1	1	1.48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	D10S249,D10S5:	1	1	1	1	2.19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.42	1	1	1
10	GATA3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.6	1	1	1
10	WI-2389,D10S12	1	1	1	1.47	1	1	1	1	1	1.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	BMI1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	█	1	1	1	1	0.6	1	1	1
10	FGFR2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.65	1	1	1	1	1	1	1
10	DMBT1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.47	1	1	1	1	1	1	1	1
10	STSG27915	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.85	1	1	1	1	1	1	1	0.68	1	1	1
11	11PTEL03	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.57	1	1	1	1	1	1	1
11	INS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.6	1	1	1	1
11	HRAS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.66	1	1	2.49
11	CDKN1P57	1	1	1	1	1	1	1	1.42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	WT1	1	1	1	1	1.68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	KAI1	1	1	1	1	1	1	1.36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.23	1	1	1
11	CCND1	1	1	1	1.48	1	1	2.47	1	1	1	1	6.31	1	1	1	1	1	1	1	1	1.77
11	FGF4	1	1	1	1	1	1.83	1	1	1	1	1	6.37	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	EMS1	1	1	1	1	1	1	2.24	1	1	1	1	3.37	1	1	1	1	1	1	1	1	1.81
11	PAK1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.6	1	1	1	0.7

CR	NOMBRE	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
11	RDX	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1		1	3.34	1	1
11	ATM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.69	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	WI-6509	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.71	1	1	1	1	1	1	1	1
11	AF240622	1	1	1	1	1	1	1.68	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	8M16/SP6	1	1	1	1	1	1	1.43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.64	1	1	1.47
12	CCND2	1	1	1	1	1	1	1	1	1.88	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	CDKN1B	1	1	1	1.57	1	1	1	1	1	1.61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	SAS	1	1	1	1	2.65	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.59	1	1	1	1
12	MDM2	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	DRIM	1	1	1	1.51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.37	1	1	1	1	1	1	1
12	STSG8935	1	1	1	1.66	1	1	1	1	1	1.78	1	1	1	1.54	1	1	1	1	1	1	1
12	U11838	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	D13S319	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.64	1
13	D13S327	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.58	1	1	0.63
14	TCL1A	1	1	1	1	1	2.06	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.61	1	1	1
14	AKT1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.63	1	1	1
14	IGH(D14S308)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.56	1	1	1
14	IGH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	0.42	1	1.57	1
15	SNRPN	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	1	1.49	1	1
15	MAP2K5	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.99	1
15	IGF1R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.63	1	1	1	1
15	PACE4C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.42	1	1.49	1	1	1	1	1	1	1	1
15	WI-5214	1.32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	16PTEL03	1	1	1	1.39	1	1	1	1	1	1.43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	STSG48414	1	1	1	1		1	1.4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	CREBBP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	EMP2	1	1	1	1.73	1	1	1	1	1	1.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	ABCC1	1	1	1	1	0.66	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

CR	NOMBRE	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
16	CYLD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.67	1	1	1.79	1
16	CDH1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	CDH13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.28	1	1
16	LZ16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	STSG30213	1.36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	282M15/SP6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.67	1	1	1
17	WI-14673	1.7	1	1	1	2.12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	TP53	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	LLGL1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.32	1	1
17	NF1 3	1	1	1	1	1.89	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	PPARBP	1	1	1	1	1	2.91	1	1	1	1	1	1.47	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	THRA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.52	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	TOP2A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.49	1	1	1	1	1	5.74	1	1
17	NME1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.81	1	1	1	1	1	1	1	1	2.42	1	1
17	RPS6KB1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	D17S1670	1.61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	SHGC-103396	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.61	1	1	1	3.6	1	1
18	TYMS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.53	1
18	FRA18A(D18S97)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.51	1	1	1	1
18	DCC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.57	1	1
18	BCL2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.35
18	18QTEL11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.63	1	1	1
19	129F16/SP6	0.7	0.76	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3.38	1
19	STSG42796	1	1.98	1.61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4.41	1
19	JUNB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.7
19	CCNE1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.66
19	AKT2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.43	1	1
19	D19S238E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.31	1	1

CR	NOMBRE	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
20	20PTTEL18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.42	1	1	1	1	1	1	1	1.85
20	SOX22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.34	1	1
20	JAG1	1	1	1	1	1.72	1	1	1	1	1	1	1	1.72	1	1	1	1	1	1	1.79	1
20	MKKS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.64	1	1	2.17	1
20	MYBL2	1	1	1	1.64	1	1	1	1	1	2.13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	CSE1L	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	ZNF217	1.38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	TPD52L2	1	1	1	1	1	1	2.54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.8	1	1	1
20	20QTEL14	1.79	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.05	1	1	1
21	D21S378	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.5	1	1	1
21	PCNT2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.57	1	1	1
21	21QTEL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.56	1	1	1
22	HIRA	1	1.43	1	1	1	1	1	1	1	1.73	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.39	1
22	TBX1	1	1.3	1	1	1	1	1	1	1.55	1	1	1	1	1	1	1	1	1.68	1	1	1
22	BCR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.62	1	1	1	1	1	1	1
22	ARHGAP8	1	1.36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.61	1	1	1
22	ARSA	1	1.25	1	1	1.69	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	22QTEL31	1	1	0.69	1	1	1	1	1	1	1	1.93	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
X	STS 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.7	1
X	KAL1	2.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
X	DMD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
X	DXS7132	1.35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.58	1.52	1	1	1	2.46	1	1
X	AR3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.45	1	1	1	1	1	1	1	1
X	XIST	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.61	1	1	1
X	OCRL1	1	1	1	1	1	2.3	1	1	1	1	1	1	1.97	1	1	1	1	1	1	1	1
Y	SRY	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Y	AZFa region	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

En esta tabla se muestran los valores de la relación T/N en las regiones que presentaron alguna alteración. Las ganancias y amplificaciones (valores > 1.2) se muestran en verde y las pérdidas (valores < 0.8) se muestran en rojo. Las iniciales que encabezan las columnas nos indican el cromosoma, la clona génica; L1-L21=Paciente 1-Paciente21.