

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta el Biólogo:

Alfredo Hidalgo Miranda

**PATRONES DE ALTERACIONES
CROMOSOMICAS DURANTE LA
PROGRESIÓN DEL CARCINOMA
CÉRVICO UTERINO**

Tutor: Dr. Mauricio Salcedo Vargas
Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.



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.

Esta Tesis se llevó a cabo en los Laboratorios de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS y el Laboratorio de Oncología Molecular del Instituto de Patología Von Virchow, Hospital Universitario Charité, Berlín, Alemania.

In Memoriam

FLOR MIRANDA DE HIDALGO

1936 - 2003

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, por todo el cariño y apoyo que me han dado durante toda mi vida.

A mi esposa Mónica porque sin ella no hubiera sido posible llegar a donde estoy.

A todos mis amigos y compañeros, que durante este tiempo siempre han estado apoyándome.

A los miembros de mi comité académico, en particular mi tutor, Dr. Mauricio Salcedo y el Dr. Héctor Mayani, por su apoyo en todo este proceso y por su amistad.

Al Dr. Iver Petersen, del Laboratorio de Oncología Molecular del Instituto de Patología Von Virchow, Hospital Universitario Charité, Berlín, Alemania, por su confianza y apoyo.

A todas las personas que estuvieron involucradas para que este trabajo se hiciera realidad, en particular a las pacientes que accedieron a participar en el protocolo de Investigación.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, la Universidad Nacional Autónoma de México y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por darme la oportunidad de continuar con mi superación académica y personal.

**PATRONES DE ALTERACIONES CROMOSOMICAS
DURANTE LA PROGRESION DEL CARCINOMA
CERVICO UTERINO**

INDICE

<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Introducción</i>	3
<i>El cáncer cérvico uterino como un problema de salud mundial</i>	3
<i>Cáncer cérvico uterino (CaCu) y virus de papiloma humano (VPH)</i>	6
<i>Clasificación de los virus de papiloma humano</i>	7
<i>Historia natural de la infección por VPH</i>	9
<i>VPH e inestabilidad genómica</i>	13
<i>Estudios de citogenética en CaCu</i>	21
<i>Hibridación genómica comparativa (HGC)</i>	24
<i>Limitaciones de la HGC sobre cromosomas</i>	35
<i>Microarreglos</i>	38
<i>HGC sobre microarreglos</i>	40
<i>HGC en CaCu</i>	43
<i>Bioinformática</i>	47
<i>Justificación</i>	50
<i>Planteamiento del problema</i>	51

Objetivos.....	52
Material y métodos.....	53
Resultados.....	74
Discusión.....	117
Conclusiones y perspectivas.....	138
Anexos.....	142

Publicaciones

1. **Hidalgo A**, Salcedo M. Estrategias de análisis global. Hacia el manejo genético de las neoplasias. *Revista de Investigación Clínica*, **53** (5):430-443, 2001.
2. **Hidalgo A**, Cheng S, Pérez C, Martínez I, González B, Salcedo M. Una nueva estrategia para el análisis genético del cáncer: Hibridación Genómica Comparativa. *Ciencia y Desarrollo*. Mayo/Junio 2000, Vol. XXVI, 152, 26-33. Una nueva estrategia para el análisis genético de los tumores: Hibridación genómica comparativa.
3. Salcedo M, Vázquez G, **Hidalgo A**, Pérez C, Piña P, Santillán K, Alatorre B, Arreola H, López R, Monotya C, Navarro B, Cerón T. Microarreglos en Oncología. *Vertientes, Revista especializada en ciencias de la salud. FES-Zaragoza* **6**(1):19-25, 2003.
4. **Hidalgo A**, Schewe C, Petersen S, Salcedo M, Gariglio P, Schlüns K, Dietel M, Petersen I. Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines. *European Journal of Cancer*, **36**:542-548, 2000.

5. **Hidalgo A, Monroy A, Arana R, Taja L, Vázquez G, Salcedo M.** *Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma cell lines.* *BMC Cancer*, **3**:8-12, 2003.
6. *En preparación.* **Hidalgo A, Baudis M, Piña P, González J, Cruz F, Hernández D, Vázquez G, López R, Pérez C, Alatorre B, Vázquez K, Salcedo M.** *Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma tumors and cell lines*

Otras publicaciones relacionadas con esta tesis:

7. **Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, Schlüns K, Schewe C, Pacyna-Gengelbach M, Goeze A, Krebber B, Knösel T, Kaufmann O, Szymas J, von Deimling A.** *Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors.* *Brain Pathology*, **10**:395-401, 2000.
8. **Salcedo M, Taja L, Utrera D, Chávez P, Hidalgo A, Pérez C, Benítez L, Castañeda C, Delgado R, Gariglio P.** *Changes in retinoblastoma gene expresión during cervical cancer progression.* *Internacional Journal of Experimental Pathology*, **83**:275-285, 2002.
9. **Hidalgo A, Piña P, Guerrero G, Lazos M, Salcedo M.** *A simple method for the construction of small format tissue arrays.* *Journal of Clinical Pathology*, **56**:144-146, 2003.

RESUMEN

El carcinoma cérvico uterino (CaCu), representa un importante problema de salud mundial, constituyendo la segunda causa de mortalidad femenina en el mundo. En nuestro país, este tumor ocupa el segundo lugar de incidencia en la población femenina. Diversas metodologías de análisis genómico han identificado la existencia de un patrón de alteraciones cromosómicas específico en esta neoplasia. Sin embargo, no ha sido posible determinar adecuadamente la secuencia de alteraciones cromosómicas durante la progresión de CaCu, asimismo, no ha sido posible determinar marcadores genéticos específicos que puedan tener un uso potencial en el pronóstico o diagnóstico de esta enfermedad. En este trabajo utilizamos metodologías de análisis genómico, tales como la hibridación genómica comparativa sobre cromosomas en metafases (HGCM) y sobre microarreglos (μ HGC), así como diversas herramientas de análisis bioinformático para determinar los patrones de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu y para determinar posibles genes específicos que son blancos de alteraciones en su número de copias en esta neoplasia, además de llevar a cabo una exploración *in silico* de los posibles procesos celulares afectados por estas alteraciones. A través de esta aproximación, fue posible determinar un patrón de desbalances cromosómicos que se presenta desde etapas muy tempranas de la carcinogénesis cervical, caracterizado por amplificaciones en los cromosomas 1, 3q y 5p, así como deleciones en la región telomérica del cromosoma 2q, 4, 6, 11q y X, presentes en las lesiones pre-malignas. En los tumores invasores este grupo de alteraciones se mantiene, presentándose la amplificación de 3q, particularmente 3q26.1 en el 67.3% de los casos, seguido de amplificaciones en 1q en el 40% de los tumores. En el caso de las deleciones, la más común en los tumores invasores se detectó en la región 2q36-q37, en 36% de los casos. La aplicación de μ HGC permitió detectar genes particulares involucrados en estas alteraciones, como los genes *RBP1* y *RBP2* (3q21), *tp63* (3q27) o *DAB2* (5p13), para el caso de las amplificaciones o el gen *FHIT* (3p14), para el caso de las deleciones. Por otro lado, el análisis bioinformático nos permitió identificar dos posibles vías de alteraciones citogenéticas durante la carcinogénesis cervical, una caracterizada por amplificaciones desde etapas tempranas de la progresión y otra caracterizada por eventos de deleción. Entre los procesos celulares posiblemente afectados por los cambios en el número de copias de DNA podemos mencionar el proceso de control de mitosis y segregación cromosómica, alteraciones en genes involucrados en la respuesta inmune y en diversas vías de señalización. En conclusión, este trabajo permitió definir el patrón de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu, así como la detección de alteraciones en genes particulares que potencialmente podrían ser utilizados como marcadores biológicos útiles para el diagnóstico o pronóstico de esta enfermedad.

ABSTRACT

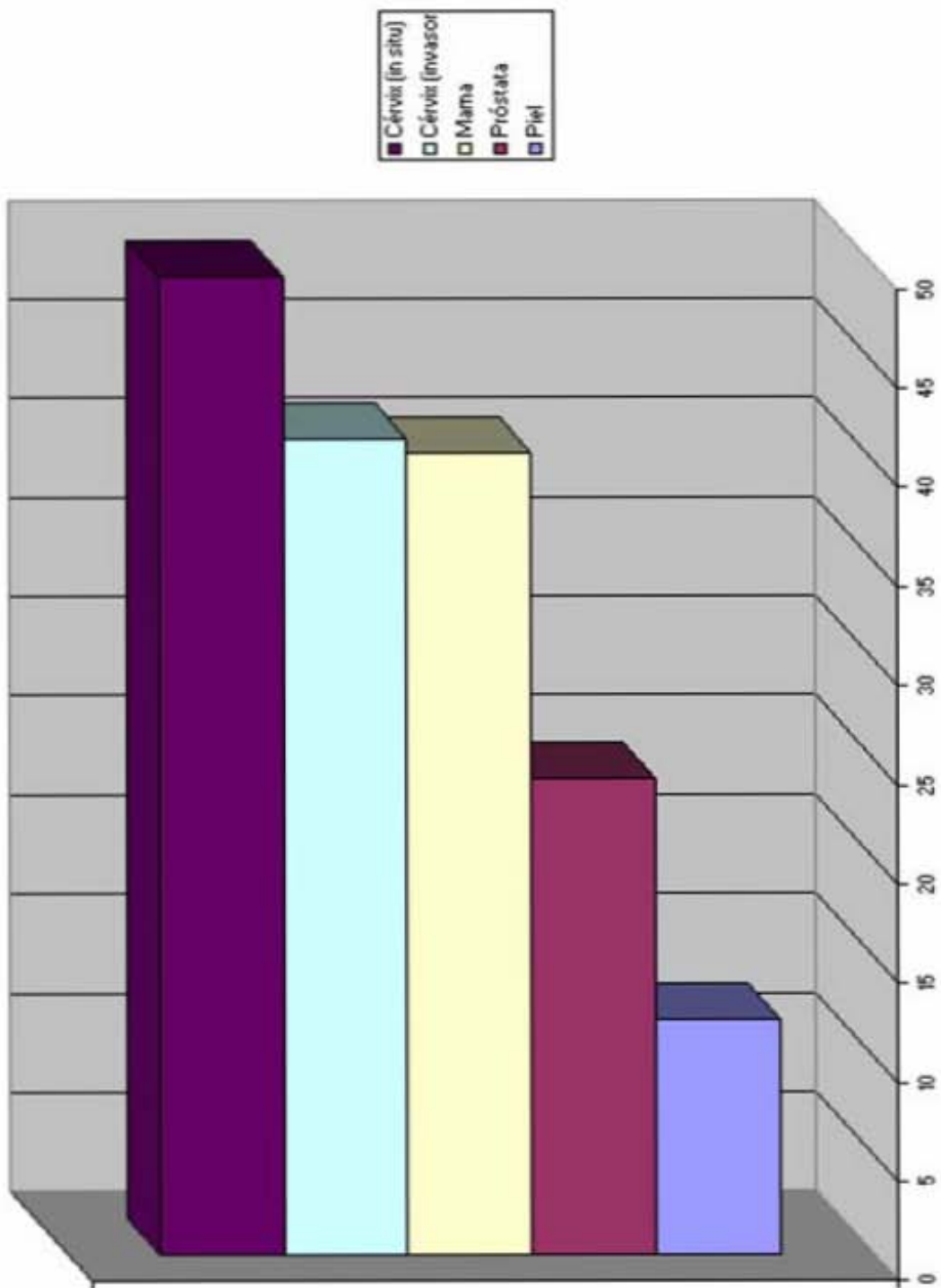
Uterine cervix carcinoma (UCC) represents an important health problem, representing the second cause of death among the female population worldwide. In our country, this disease occupies the second place in incidence among the female population. Several genomic analysis methods have detected a specific pattern of chromosomal imbalances in this type of tumor. However, it has not been possible to determine the specific sequence of chromosomal alterations leading to UCC progression, also, no specific genetic marker has been identified that might have a potential use in the prognosis or diagnosis of this disease. In the present work we used genomic analysis methods, such as comparative genomic hybridization on chromosome metaphases (mCGH) and on microarrays (μ CGH), as well as several bioinformatic analysis tools in order to determine the specific patterns of chromosomal imbalances during UCC progression and in order to detect specific genes that might be the target of alterations in their DNA copy number. Furthermore, we performed an *in silico* analysis of the cellular processes that might be affected by these alterations. Thanks to this approach, it was possible to determine a pattern of chromosomal imbalances that arises early during UCC carcinogenesis, characterized by amplifications in chromosomes 1, 3q and 5p, as well as deletions in the telomeric region of chromosome 2q and chromosomes 4, 6, 11q and X, present in pre-malignant lesions. In the invasive tumors, this set of alterations is maintained. The amplification of 3q, particularly 3q26.1 is present in 67.3% of the invasive cases, followed by amplifications in 1q in 40% of the tumors. In the case of the deletions, the most common detected in the invasive samples was in the 2q36-q37 region, present in 36% of the cases. Microarray CGH allowed us to detect particular genes involved in these alterations, such as *RBP1* and *RBP2* (3q21), *tp63* (3q27) or *DAB2* (5p13), for the amplifications or the *FHIT* gene (3p14) for the deletions. The bioinformatic analysis allowed us to identify two possible pathways of chromosomal imbalances during cervical cancer progression, one characterized by amplifications since very early stages of carcinogenesis and the other characterized by deletion events. Between the cellular processes that might be affected by these copy number changes, we can mention the process of mitotic control and chromosome segregation, alterations in genes involved in immune response and several signaling pathways. In conclusion, this work allowed us to define a specific pattern of chromosomal imbalances during UCC progression, as well as the detection of alterations in particular genes that might be used as potential biological markers for the diagnosis or prognosis of this type of tumor.

INTRODUCCION

El carcinoma cérvico uterino como un problema de salud mundial.

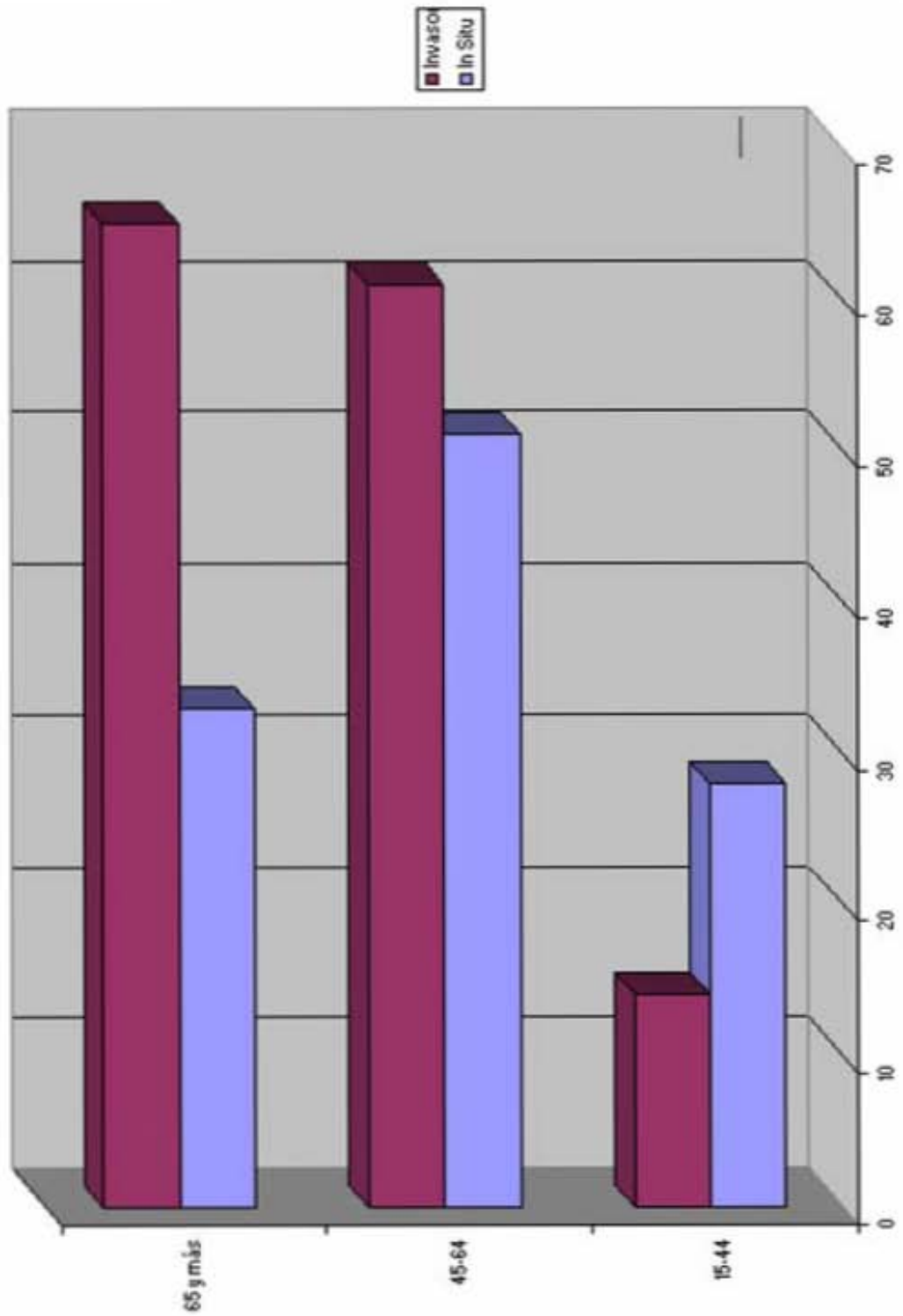
El carcinoma cérvico uterino (CaCu) representa la segunda causa de mortalidad femenina a nivel mundial con 288,000 muertes anualmente. Su frecuencia, estimada por la Organización Mundial de la Salud, está en el orden de los 510,000 casos reportados anuales, con cerca del 80% de los casos presentándose en los países en desarrollo: 68,000 casos en África, 77,000 en Latino América y 245,000 en Asia. En ausencia de programas de detección temprana, como el uso rutinario de la prueba de papanicolau, el CaCu se detecta de manera tardía y provoca la muerte en la mayoría de los casos. Aún cuando las pacientes con tumores invasores reciban tratamiento adecuado, el 50-55% de ellas morirán debido a la enfermedad (1). Las tasas mundiales más altas de incidencia anual se encuentran en algunos países de Centro y Sud-América (93.8 por cada 100,000 mujeres en Haití, con la incidencia nacional más alta del mundo), en África del Sur (61.4 por 100,000 mujeres en Tanzania), y Asia (30 por 100,000 en la India) (2)

Hasta el año 2000, el CaCu representaba la primera causa de muerte entre la población femenina de México y actualmente nuestro país ocupa uno de los primeros lugares en morbilidad de esta neoplasia a nivel mundial (Carcinoma invasor: 41.1, Carcinoma *in situ*: 49.3 por cada 100,000 mujeres de 25 años o mas) (Gráficas I, II). De acuerdo a datos de la Secretaria de Salud, este tumor representa más del 24% de todas las neoplasias malignas reportadas en México: cada día 12 mujeres mexicanas mueren de esta enfermedad. Un incremento en la incidencia de CaCu ha sido descrito entre 1996 y 1997, haciendo de esta neoplasia uno de los problemas sociales y de salud más graves en nuestro país (3).



GRAFICA I

Neoplasias más comúnmente reportadas en México según topología por cada 100,000 Habitantes. Las barras representan diferentes tipos de neoplasias, el eje de las X indica el porcentaje que cada neoplasia representa de la totalidad de los tumores reportados. Registro histopatológico nacional (2000)



GRAFICA II
Prevalencia de carcinoma in situ y cáncer cervical invasor en mujeres mexicanas de diferentes grupos de edad.

CaCu y virus de papiloma humano

Existen diversos factores de riesgo asociados al desarrollo del CaCu, incluyendo el número de distintas parejas sexuales, enfermedades sexualmente transmisibles, inicio de vida sexual activa a edad temprana, número de paras, el uso de anticonceptivos orales y el tabaquismo (revisado en 4-5). Sin embargo, el factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCu lo constituye la infección con virus de papiloma humano de alto riesgo (VPHar) (6-9).

Más de 85 VPHs han sido identificados y secuenciados, y más de 120 posibles nuevos tipos han sido parcialmente caracterizados (10). Sólo un número limitado de los aproximadamente 40 tipos de VPH que pueden infectar el tracto anogenital humano se han encontrado presentes en tumores anogenitales. Aproximadamente el 20% de los tumores de la orofaringe también contienen secuencias de estos mismos tipos virales.

La prevalencia de infección por VPH en el mundo es de alrededor de 630 millones de personas infectadas, de las cuales cerca de 190 millones presentan manifestaciones clínicas. Estudios epidemiológicos han reportado que en los Estado Unidos el 75% de la población entre 15-50 años está infectada, 60% presentando una infección transiente (presencia de anticuerpos), 10% con infección persistente (detección de DNA viral), 4% con evidencia citológica, pero sin evidencia clínica y 1% con lesiones clínicas. La prevalencia de infección por VPH entre las mujeres sexualmente activas va desde el 18 hasta el 25%, especialmente en ciertos grupos de adolescentes sexualmente activos. Las pacientes infectadas pueden transmitir el virus tanto a sus parejas como a sus descendientes. La detección de DNA viral o de anticuerpos anti VPH en neonatos, sugiere un posible papel del VPH en el desarrollo de papilomatosis en la cavidad oral y en el tracto respiratorio superior, sin embargo, estos datos no son concluyentes, ya que en la

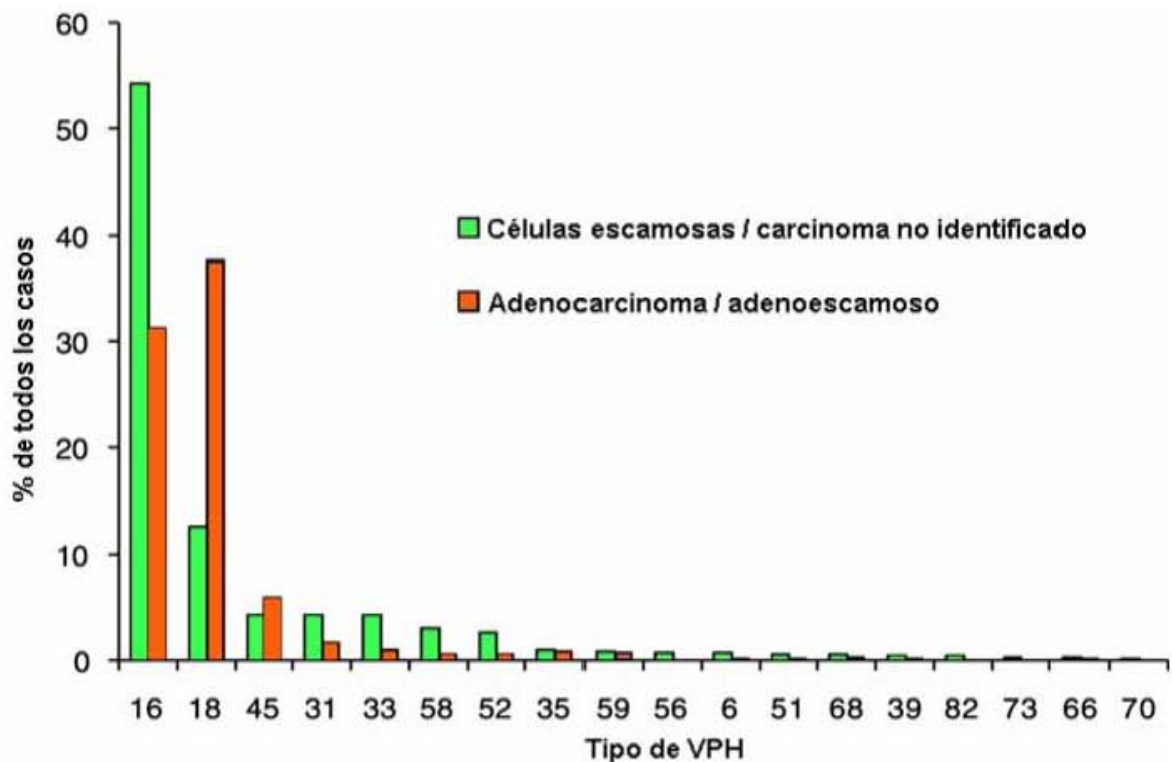
mayoría de los casos, la infección pudo haber sido debida a una exposición post natal (11, 12). Un factor importante para diseminación de la infección o para la presencia de re-infecciones después del tratamiento, lo constituye la falta de detección de infecciones y el correspondiente tratamiento de las parejas sexuales varones de las pacientes infectadas.

Clasificación de los virus de papiloma humanos

Debido a su incidencia en lesiones con diferentes grados de malignización, los VPHs anogenitales han sido divididos en los de alto riesgo, aquellos que se encuentran preferentemente en tumores invasores; los de mediano riesgo y los de bajo riesgo, que se encuentran presentes en lesiones benignas, como los condilomas (11). Estudios recientes a nivel mundial han determinado que los tipos de VPH que deben ser considerados de alto riesgo son los tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, mientras que los tipos 23, 53 y 66 deben ser considerados como potencialmente carcinogénicos (13).

Estudios mundiales indican que la prevalencia de infección con VPHar en CaCu es superior al 99.7% de los casos y que la probabilidad de desarrollar una lesión intraepitelial cervical de alto grado, se incrementa al menos 100 veces en mujeres infectadas con VPHar, comparadas con mujeres no infectadas. Esta situación hace de los VPHar el factor etiológico viral más importante asociado a un cáncer humano (8-10), por lo que la agencia internacional de investigación del cáncer (IARC), consideró en 1995 a los tipos 16 y 18 en el grupo 1 (carcinógeno) de agentes carcinogénicos para el ser humano, a los tipos 31 y 33 en el grupo 2A (probable carcinógeno), y a los otros tipos en el grupo 2B (posible carcinógeno) (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans) (14).

Un análisis reciente acerca de la prevalencia de los diferentes tipos de VPH a nivel mundial, el cual incluyó más de 10,000 casos, indicó que los tipos de HPV más comunes en los tumores invasores son, en orden decreciente: VPH16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 y 70. En los carcinomas epidermoides, el VPH 16 fue el más prevalente (46-63%), seguido de los tipos 18 (10-14%), 45 (2-8%), 31 (2-7%) y 33 (3-5%) en todas las regiones geográficas, excepto Asia, donde los tipos 58 (6%) y 52 (4%), fueron más frecuentemente identificados (15). En los adenocarcinomas, la prevalencia de VPH fue significativamente menor (76.4%) que en los tumores escamosos (87.3%), siendo el VPH18 el tipo predominante en todas las regiones geográficas (37.4-41%), seguido de los tipos 16 (26-36%) y 45 (5-7%) (14) (Gráfica III).



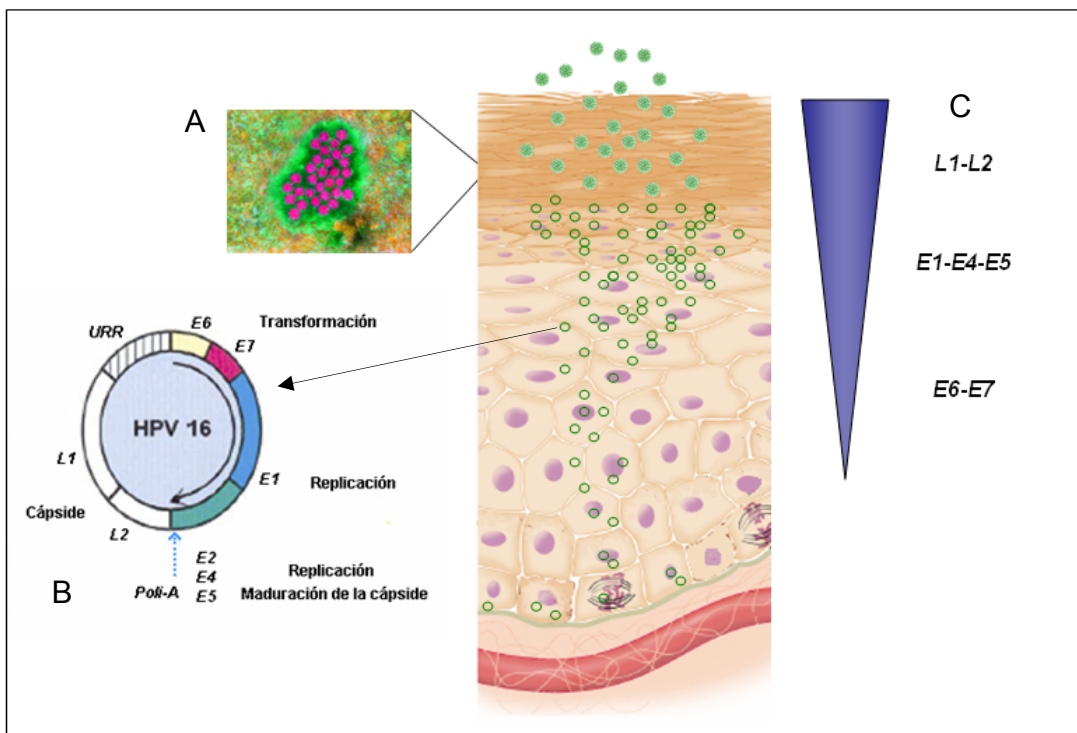
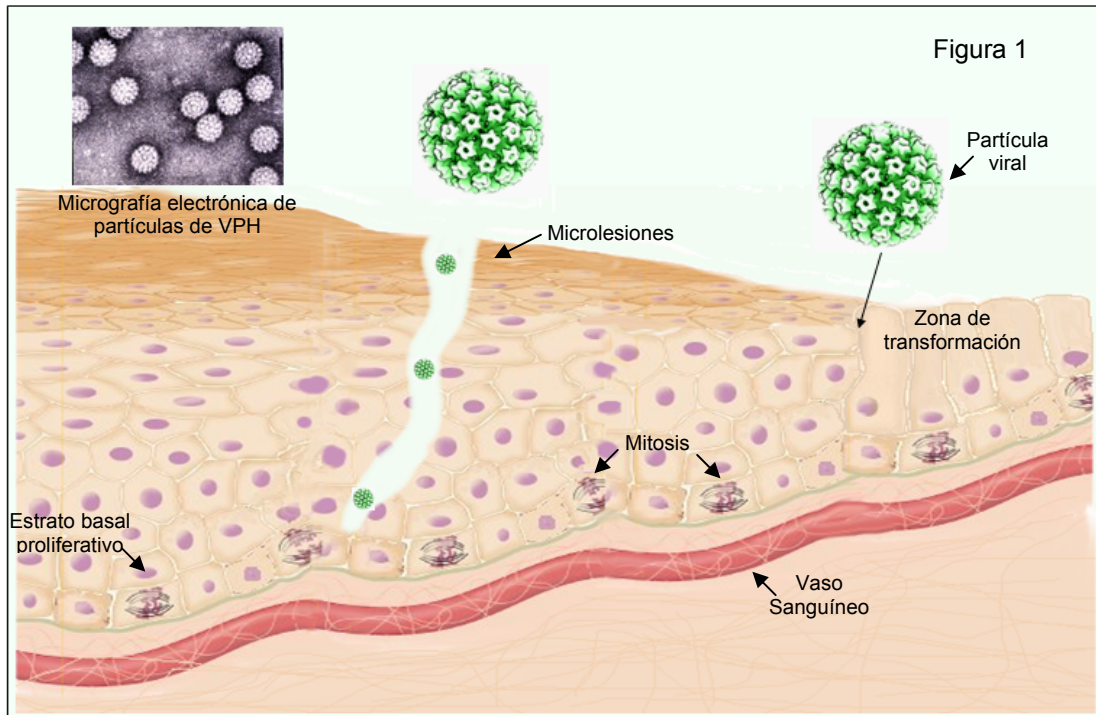
GRAFICA III

Prevalencia mundial de VPH de acuerdo a tipo viral y su asociación con la histopatología del tumor cervical. El eje de las Y indica los porcentajes de todos los casos positivos para VPH, el eje de las X el tipo viral.

Historia natural de la infección por VPH

Las lesiones relacionadas con VPH se desarrollan más comúnmente en el tracto anogenital de pacientes femeninas, sin embargo, el papel del virus en el desarrollo de carcinoma de ano y pene también ha sido caracterizado. El varón ha sido considerado como uno de los mayores portadores para la transmisión de VPH (16), sin embargo, las diferencias entre la incidencia de cáncer de pene contra la de CaCu, sugiere que el epitelio cervical debe ser mas susceptible que su contraparte peneana a la transformación mediada por VPH.

Para establecer una infección productiva aguda, el VPH debe tener acceso a células del estrato basal del epitelio cervical, las cuales tengan todavía capacidad replicativa. Esto se logra cruzando el epitelio a través de pequeñas lesiones o en regiones anatómicas donde este estrato es más accesible, como en la zona de transformación. Una vez que el VPH infecta células activas en replicación, el virus toma el control sobre su maquinaria biosintética, con la finalidad de replicar su propio material genético. En esta etapa, el genoma viral se encuentra como una forma circular libre o episoma. Estos episomas son mantenidos dentro del núcleo de la célula madre infectada y son distribuidos a cada célula hija durante la división celular en aproximadamente 50 copias episomales por célula. Algunas de estas células hijas, localizadas en el estrato suprabasal, empiezan a expresar las proteínas virales E1 y E2, así como las oncoproteínas virales E6 y E7, y son capaces de replicar y amplificar el genoma viral hasta cientos de copias del genoma viral por célula. Finalmente, las proteínas codificadas por los genes virales E4, E5 y las proteínas tardías L1 y L2 se expresan en el estrato espinoso, donde los nuevos viriones son ensamblados y liberados mediante la exfoliación de las células escamosas en la superficie del epitelio (Revisado en 17, 18)(Figuras 1-2).



Figuras 1-2

Historia natural de la infección por VPH. Figura 1. Infección por VPH a través de microlesiones o en la zona de transformación del cérvix. Figura 2 A) Partículas virales dentro de una célula infectada. B) Representación del genoma viral, mostrando los genes virales y sus funciones principales. C) Expresión de los genes virales durante la infección activa, los círculos verdes representan genomas virales.

Como podemos observar, la producción de nuevas partículas infectivas está íntimamente relacionada con el proceso de diferenciación del epitelio normal; sin embargo, esto representa un problema para el virus, ya que la diferenciación celular trae como consecuencia automática el bloqueo de la replicación del DNA (17, 18). Con la finalidad de contrarrestar esta situación, los VPHs poseen diversos mecanismos para eliminar este bloqueo replicativo en las células diferenciadas, creando y manteniendo un ambiente celular adecuado que permite la replicación y amplificación del genoma viral. En menos del 5% de los casos infectados por VPHar, el mantenimiento de este ambiente puede traer como consecuencia no deseada la ruptura e integración del genoma viral en el genoma de la célula hospedera. En la mayoría de las lesiones pre-malignas el DNA viral permanece en forma episomal, mientras que en lesiones de alto grado y en tumores invasores se encuentra un alto porcentaje de genomas de VPH integrados al genoma celular (19). Algunos grupos han encontrado integración viral en el 88% de los tumores invasores (20) lo cual resultará en una expresión incrementada de las oncoproteínas virales y la activación de procesos como la inestabilidad cromosómica, incrementando las posibilidades de transformar a la célula hospedera (Figura 3).

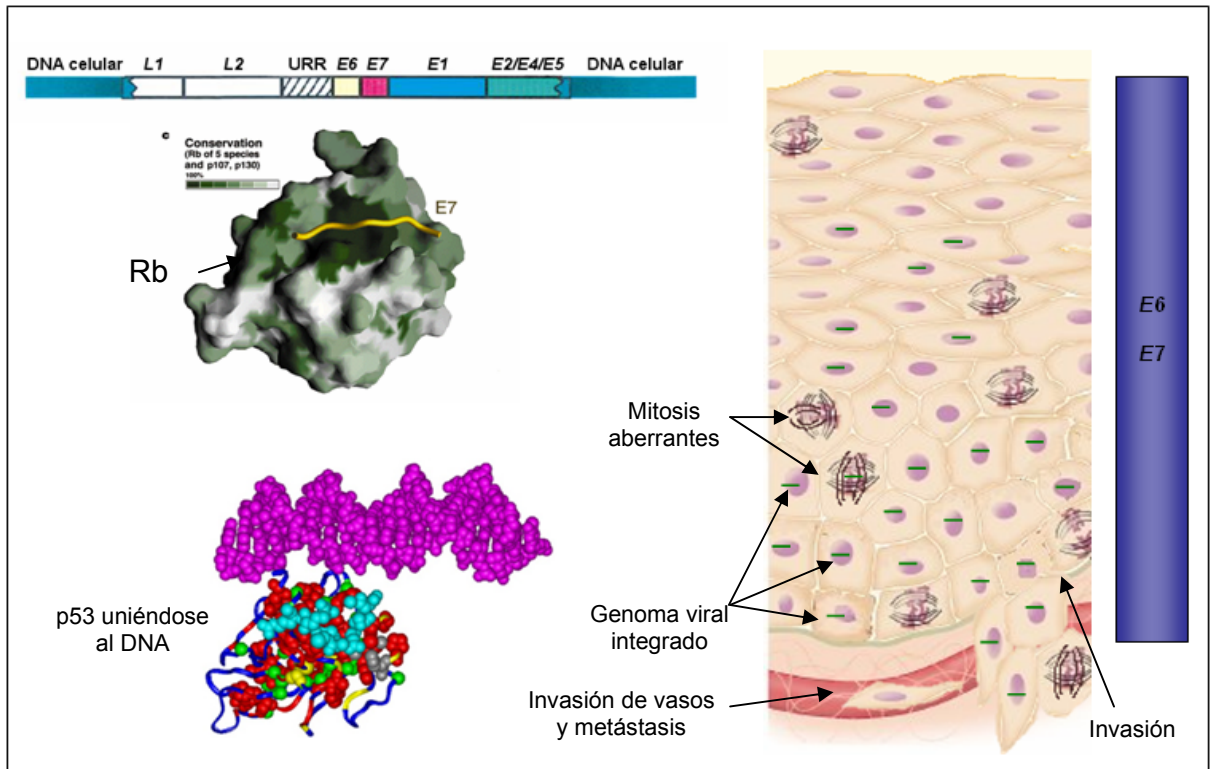


Figura 3

El rompimiento del genoma viral en el marco de lectura de E2 y la integración viral al genoma celular trae como consecuencia la expresión no regulada de las oncoproteínas virales E6 y E7, provocando la inactivación de las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb, así como alteraciones en diversos procesos celulares, con la consecuente transformación celular.

VPH e inestabilidad genómica

El hecho de que no todas las pacientes infectadas con VPHar desarrollan cáncer, así como el largo periodo de latencia entre una infección y la detección de un tumor, indican que la presencia de VPHar es un factor de riesgo necesario, pero no suficiente para el inicio y progresión de una neoplasia cervical, y que deben de existir otros mecanismos moleculares que, en conjunto con el virus, estén provocando el desarrollo de las neoplasias cervicales.

La infección por VPH y la expresión de sus oncoproteínas alterará una gran variedad de mecanismos moleculares en la célula infectada, principalmente a nivel de control de ciclo celular, diferenciación celular, control de la expresión génica, apoptosis y capacidad de respuesta inmune contra las células infectadas (revisado en 21). Existe una gran cantidad de información en la literatura acerca de las funciones de las proteínas virales, así como de las alteraciones celulares inducidas debido a la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 en las células infectadas (revisado en 22 - 25). Como podemos observar, el proceso de transformación neoplásica en el cérvix uterino representa un proceso complejo, en donde están involucradas la acción de los oncogenes virales, la inactivación de genes supresores y la activación de oncogenes celulares (22, 23). Cada una de estas alteraciones y sobre todo, la cooperación entre cada una de ellas, es importante para la aparición y desarrollo de tumores cervicales durante las diferentes etapas de la progresión, sobre todo aquellas que le permitan a ciertas clonas celulares adquirir características que representen ventajas de crecimiento frente a las células normales o frente a otras clonas del tumor incipiente (26, 27).

Uno de estos procesos lo constituye la inestabilidad cromosómica. En este trabajo, nos enfocaremos al análisis particular de las alteraciones citogenéticas que surgen durante la progresión del CaCu, las cuales pueden originarse debido al fenómeno de inestabilidad.

La inestabilidad genómica puede otorgarle a la célula transformada una mayor plasticidad y se ha propuesto como uno de los motores de la progresión neoplásica, ya que este fenómeno se ha detectado desde etapas muy tempranas de la carcinogénesis en una variedad de tumores (28).

La carcinogénesis cervical constituye un modelo particularmente útil para estudiar los mecanismos básicos de inestabilidad genómica en cáncer (29). La aneuploidía ha sido observada desde lesiones pre-malignas en el cérvix, junto con la presencia de mitosis anormales y multipolares, por lo que se ha sugerido que la alteración en procesos implicados en la división celular y en la segregación mitótica juegan un papel importante en el proceso de transformación neoplásica en el cérvix uterino humano.

Se ha demostrado que las oncoproteínas virales E6 y E7 de VPH de alto riesgo son capaces de inducir alteraciones en el número de centrosomas, los cuales son fundamentales para la formación de husos mitóticos normales. E7, que inactiva la vía supresora de tumor de Rb, provoca la duplicación anormal de los centrosomas en células fenotípicamente normales, lo que resultará en la aparición de mitosis multipolares aberrantes, con la consecuente pérdida o ganancia de material genético. E6, que degrada a p53, acumula números anormales de centrosomas, en forma paralela con la multinucleación y la presencia de anormalidades nucleares, lo que sugiere la presencia de eventos de duplicación de centrosomas, sin que exista un evento de división celular intermedio. Los diferentes mecanismos de alteración provocados por E6 y E7 colaboran de forma sinérgica para potenciar la inestabilidad genómica y la aparición de aneuploidía (30).

Por otro lado el evento de integración viral en el genoma de la célula infectada, además de inducir un incremento en la expresión de las oncoproteínas virales, se relaciona con la inestabilidad de las regiones de DNA celulares adyacentes al sitio de integración, así

como con la presencia de aneusomía y polisomía en lesiones de alto grado (Neoplasia Intraepitelial Cervical grado III, NIC III) y CaCu (31). Aun no se conoce el proceso exacto por el cual se da el evento de integración viral, sin embargo se ha encontrado una correlación entre los sitios de integración y sitios frágiles del genoma celular, los cuales también coinciden con sitios preferenciales de rompimiento en translocaciones cromosómicas (32). Por otro lado, se ha planteado que el evento de integración puede conferirle a la célula una ventaja de sobrevivencia o una ventaja replicativa, permitiendo su selección en etapas posteriores de la progresión tumoral. Algunos ejemplos de estos eventos potencialmente ventajosos los constituye la integración del genoma viral cerca de oncogenes (33), como sucede en el caso del oncogén c-Myc (34) y el componente de RNA de la telomerasa (hTERT) (35). Sin embargo, trabajos recientes en donde se lleva a cabo un análisis sistemático de las regiones de integración de VPH en más de 190 lesiones pre-malignas y tumores invasores, no ha detectado un patrón de integración específico y que la distribución de los sitios de integración están distribuidos a lo largo de todo el genoma, aunque existe una clara preferencia por los sitios frágiles en los cromosomas. Asimismo, este análisis no detectó evidencia de una alteración específica de genes celulares por las secuencias virales (36) En la figura 4 se muestran algunos de los sitios de integración de VPH que se han detectado en tumores cervicales, mientras que la figura 5 muestra algunas de las alteraciones que podrían estar provocando el fenómeno de inestabilidad genómica en células infectadas con VPH.

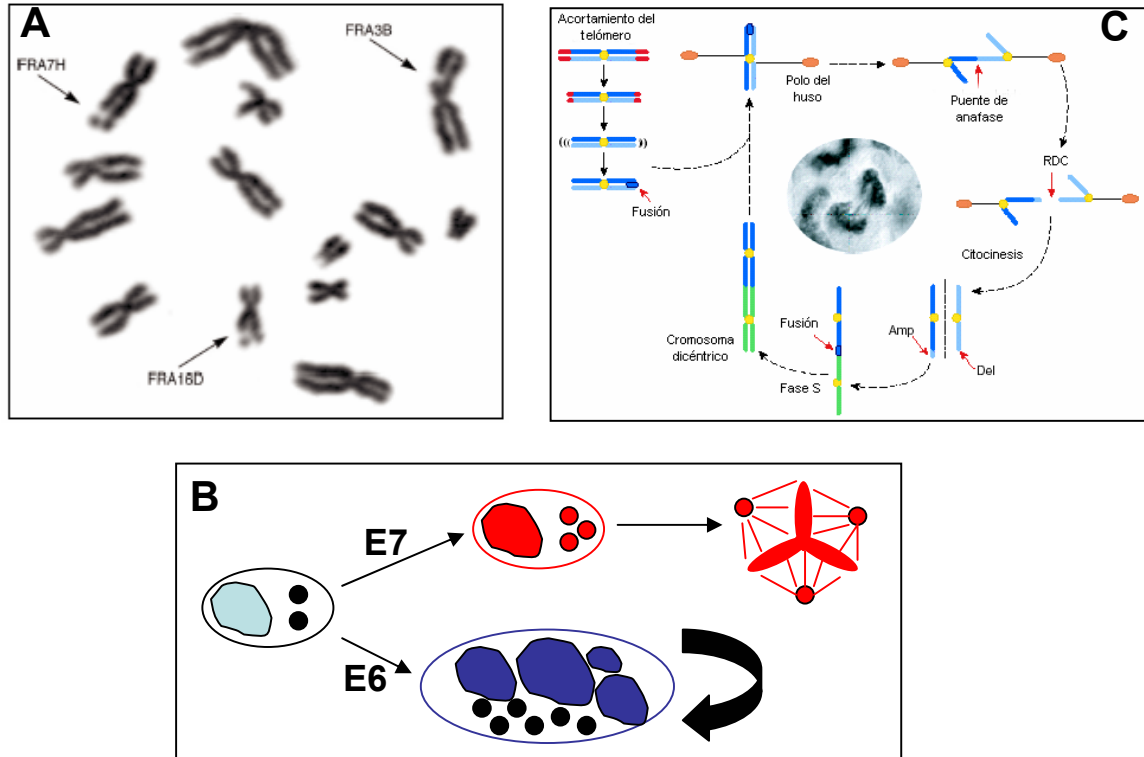


Figura 4.

Posibles mecanismos que provocan inestabilidad genómica en CaCu. A) Los sitios frágiles del genoma se han reportado como sitios preferenciales de integración de VPH, provocando inestabilidad en los cromosomas involucrados. B) E7 provoca la pérdida del control en la replicación de los centrosomas, generando mitosis multipolares. E6 provoca la acumulación de centrosomas debido a divisiones celulares abortivas y ciclos de endorreduplicación. Ambos procesos pueden traer como consecuencia alteraciones en el número de copias de los cromosomas. C) Como consecuencia de la expresión de sitios frágiles o de la tensión generada sobre los cromosomas en una mitosis multipolar, así como el acortamiento telomérico provocado por una mayor capacidad proliferativa, puede inducir ciclos de rompimiento-fusión-rompimiento, lo que traería como consecuencia el desarrollo de puentes en anafase, cromosomas en anillo o cromosomas dicéntricos, generando amplificaciones o deleciones de regiones cromosómicas o cromosomas completos.

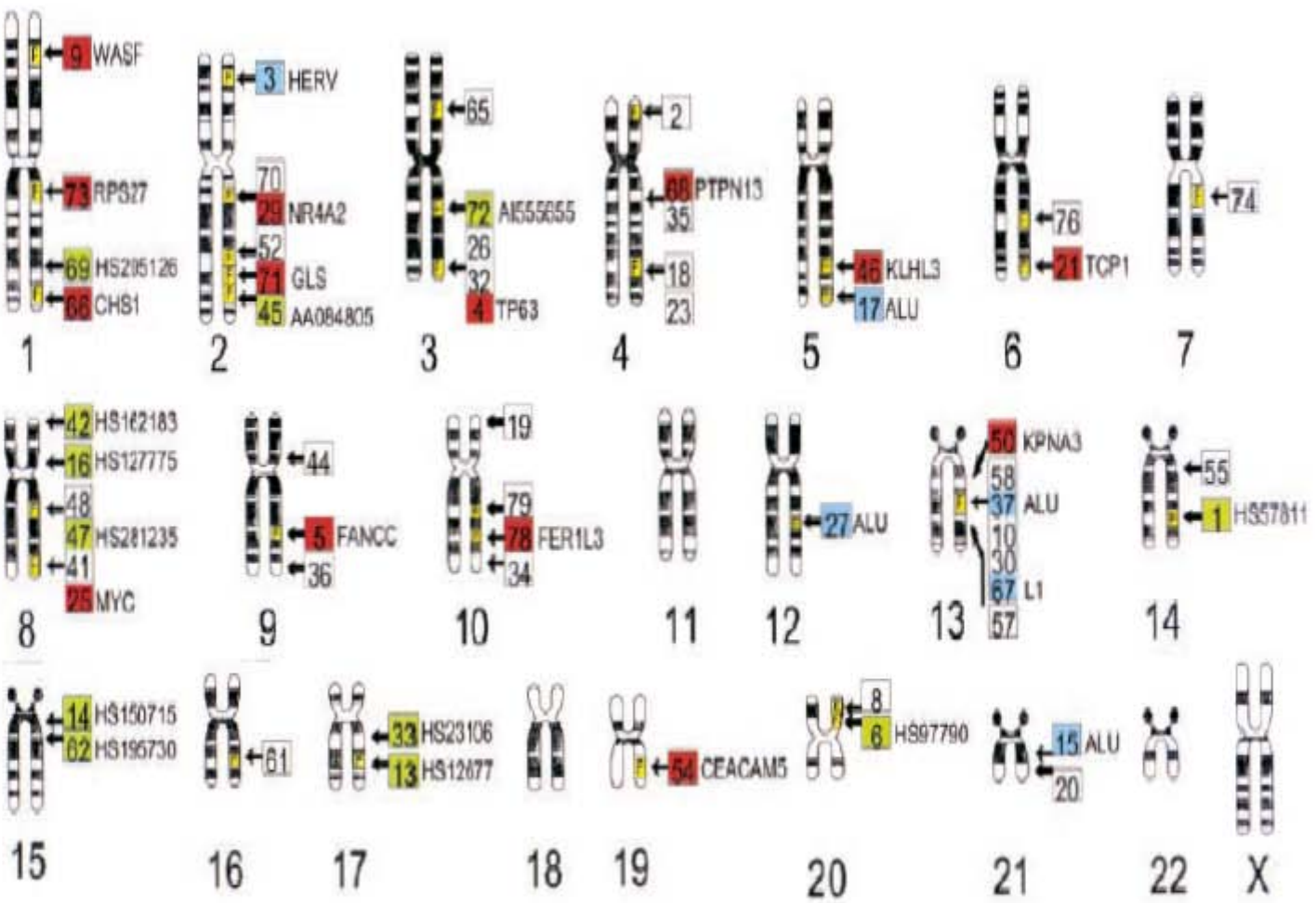


Figura 5

Distribución cromosómica de algunos sitios conocidos de integración de VP1, detectados mediante la identificación de transcritos quiméricos virales y celulares. Los números indican el número de transcritos con fusiones virales-celulares que han sido detectados. Los números con flecha indican la posición citogenética de los transcritos, los números sin flecha indican los transcritos que solamente pudieron ser mapeados a nivel de cromosoma. Cuando hay más de un número en un cuadrado, indica que hubo diversos sitios de integración en esa banda citogenética. La letra F en el recuadro amarillo indica presencia de sitios frágiles. El color rojo indica genes conocidos, el azul, secuencias repetitivas y el verde secuencia marcadoras expresadas (ESTs) (Tomado de la referencia 37).

Durante mucho tiempo se ha discutido si la característica de las células neoplásicas de presentar alteraciones cromosómicas debido a la inestabilidad de su genoma representa un efecto o una causa del proceso neoplásico (38). Sin embargo, existe evidencia de que la inducción de inestabilidad cromosómica constituye uno de los procesos iniciales en el proceso de carcinogénesis, pudiéndole otorgar a la célula un mecanismo de plasticidad que le permitirá adaptar su genoma a los cambios de exigencias que se presenten durante la progresión tumoral. De esta forma el proceso de inestabilidad se podría constituir como un proceso de selección darwiniana, en donde la masa tumoral estará constituida por diversas clonas con características diferentes, pero en donde solamente aquellas que presenten características genómicas que les permitan obtener una ventaja de crecimiento, o la capacidad de invadir el tejido adyacente, serán seleccionadas para dar lugar a la progresión tumoral (39). En la población celular normal, y tal vez en las lesiones pre-malignas que no progresan la inestabilidad genómica es baja, por lo que cuando estas células alcanzan la primera barrera de selección (por ejemplo, la capacidad de invadir el tejido adyacente), la diversidad celular es baja, siendo probable que ninguna célula posea el perfil genómico que le permita superar esta barrera. En las lesiones pre-malignas que progresan la inestabilidad se incrementa, por lo que existe una gran variedad de células con diversos perfiles genómicos, de los cuales alguno de ellos será el adecuado para sobrepasar la barrera de selección, estableciéndose como la clona dominante en la siguiente etapa de selección, donde el proceso se repite nuevamente. Sin embargo, aun dentro de este proceso de inestabilidad, debe existir un equilibrio, si el nivel de inestabilidad supera el parámetro mínimo requerido para que la célula sea viable, se puede activar el proceso de apoptosis o de senescencia celular, provocando la desaparición del tumor incipiente (Figura 6).

En el caso particular del CaCu, consideramos que el evento de integración por si mismo, tal vez no traiga como consecuencia inestabilidad genómica directa. Más bien, el evento de integración permitirá una expresión aumentada de las oncoproteínas virales, las cuales como ya hemos expuesto, si tienen un papel fundamental en la alteración del control de la segregación mitótica a través de la inducción de cambios en el número de centrosomas, lo cual puede resultar en aneuploidía y en la aparición de alteraciones citogenéticas.

El proceso de inestabilidad genómica implica un concepto de cambio dinámico, el cual se ve reflejado en alteraciones en el complemento genómico celular. Una de las formas para abordar el estudio de este proceso de alteraciones genómicas lo constituye el análisis citogenético.

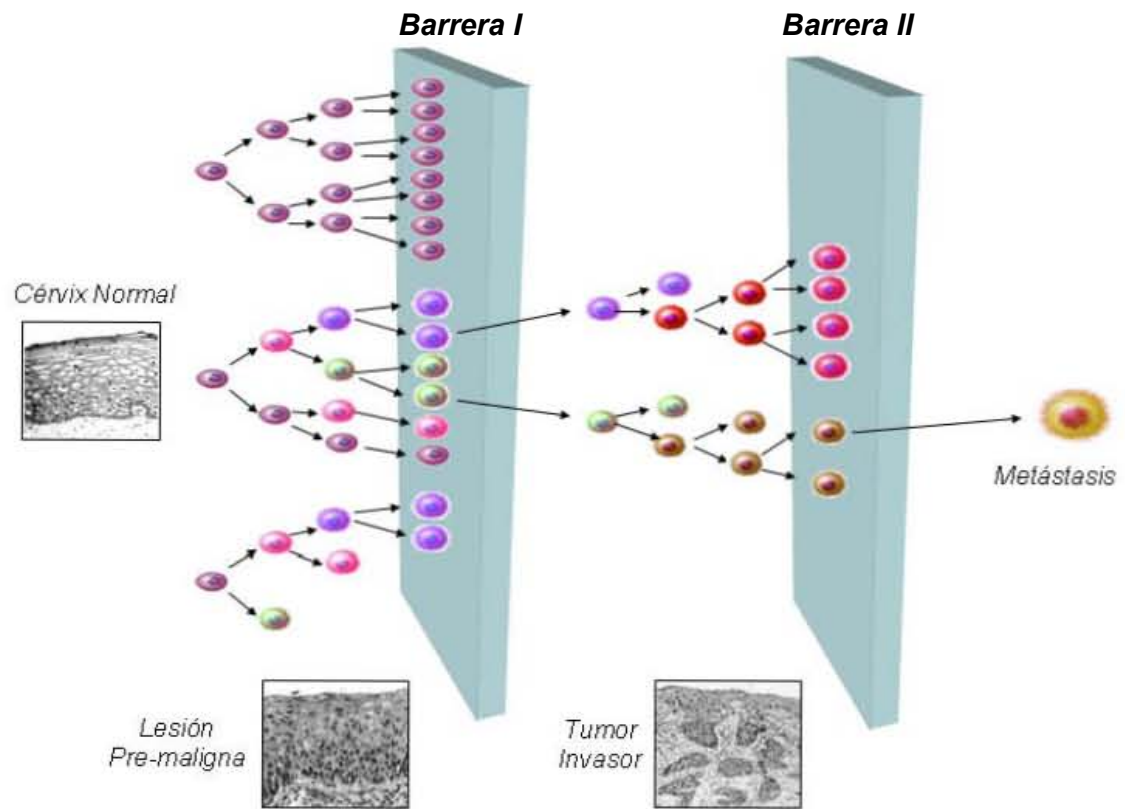


Figura 6

La evolución tumoral como un proceso de selección Darwiniana. La suma de alteraciones tales como la activación de oncogenes, la pérdida de genes supresores de tumor y la inducción de inestabilidad genómica permitirá obtener plasticidad para superar barreras de selección como la capacidad de invadir el tejido adyacente (barrera I) o la capacidad de metastatizar (barrera II).

Estudios de citogenética en CaCu

El carcinoma cérvico uterino fue uno de los primeros tumores sólidos en estudiarse desde el punto de vista citogenético (revisado en 40). Desde los años 50 estos estudios habían demostrado que el CaCu presenta un contenido de cromosomas cerca del rango de la tri o tetraploidía. Posteriormente se describieron alteraciones mitóticas y poliplodía tanto en los tumores invasores como en lesiones pre-malignas. En los 60's se describen cromosomas marcadores que sugieren la presencia de clonas aneuploides, las cuales son mantenidas durante la progresión neoplásica y en los 70's, con la introducción de las técnicas de bandeado, se describieron alteraciones cromosómicas particulares. Cabe mencionar que en los tumores sólidos y en particular en los tumores epiteliales escamosos, lo cuales son el histotipo más común en CaCu, presentan diversas características que hacen técnicamente más difícil obtener cultivos celulares de los mismos, así como metafases de la calidad adecuada y en cantidad suficiente para llevar a cabo el análisis de sus cromosomas. Por otro lado, la complejidad de las alteraciones y rearrreglos cromosómicos comúnmente encontrados en estos tumores, hacen todavía más difícil su estudio citogenético. A pesar de lo anterior, se han logrado diversos estudios en donde se han detectado alteraciones en el cariotipo de carcinomas del cérvix, particularmente en los cromosomas 1, 3, 5, 11 y 17.

Alteraciones en el cromosoma 1 se presentaron en el 60% de los casos estudiados de CaCu, las cuales incluían la pérdida del brazo corto del cromosoma y/o la duplicación del brazo largo, la formación de un isocromosoma del brazo largo o translocaciones a otros cromosomas. Algunas de estas alteraciones fueron detectadas mediante técnicas de bandeado incluso a partir de lesiones pre-malignas. En el caso del cromosoma 3, alteraciones estructurales se presentaron en 26% de los tumores. Estas incluyeron deleciones de ambos brazos y el grado de trisomía para este cromosoma fue un poco

mayor al esperado. El cromosoma 5 fue el que se encontró alterado en el mayor porcentaje de los carcinomas es decir, en un 77%. La alteración más común en este cromosoma fue la formación de un isocromosoma del brazo corto. Esta alteración ha sido también detectada en líneas celulares derivadas de CaCu. 37% de los carcinomas presentaron alteraciones en el cromosoma 11, resultando en la pérdida de material del brazo corto, además de presentar un menor número de cromosomas 11 normales en células anuploides. La pérdida de material del brazo corto al parecer está relacionada con una mayor susceptibilidad de que la célula sea transformada por VPH, ya que fibroblastos diploides que no presentaban esta alteración no se transformaban con la misma eficiencia en presencia del virus (41). En el caso del cromosoma 17, este se ha encontrado translocado y formando isocromosomas del brazo largo. Otro de los cromosomas que presentaron alteraciones en los estudios de bandeado fue el X, el cual presentaba deleciones del cromosoma completo en 39% de los casos. La figura 7 muestra un ejemplo de la alteraciones detectadas en CaCu mediante bandeado citogenético (40).

A pesar de la innegable utilidad de los estudios de citogenética, el análisis de las alteraciones en los cariotipos de esta neoplasia resulta complicado, por lo que no se había podido identificar ningún marcador cromosómico particular para este tipo de neoplasia. Estos inconvenientes no son exclusivos del CaCu, sino que son compartidos por la gran mayoría de los tumores sólidos con histotipo epitelial, lo cual limitaba de forma importante el análisis citogenético de los mismos. Esta situación se vio en gran parte resuelta gracias al desarrollo de análisis genómicos de alto rendimiento, tales como la hibridación genómica comparativa (HGC).

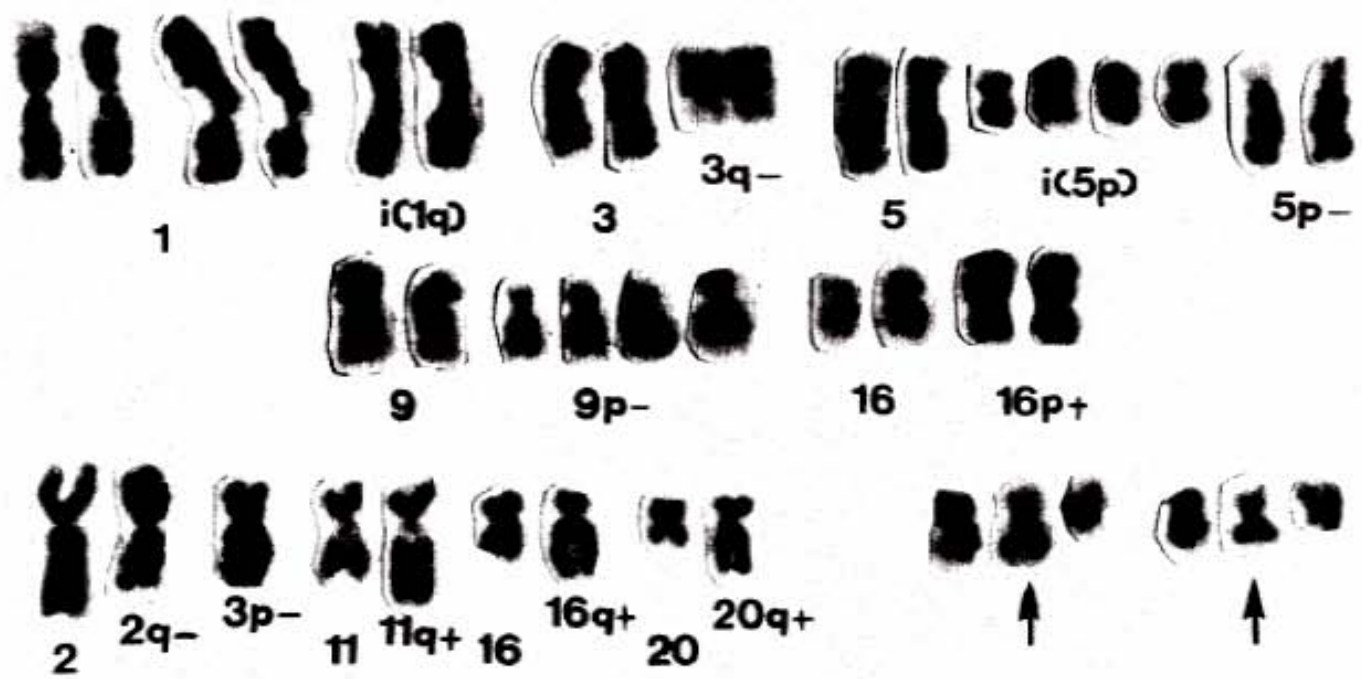


Figura 7

Figura 7
 Alteraciones más comunes en tumores cervicales invasores detectadas mediante citogenética. Este cariotipo fue obtenido a partir de un tumor invasor antes del desarrollo de las técnicas de bandeó citogenético. Se muestran tetraploidías del cromosoma 1, isocromosomas del brazo largo del cromosoma 1, pérdidas del brazo largo del cromosoma 3, isocromosomas de 5p, pérdidas de 5p, 9p, así como alteraciones en los cromosomas 2, 11, 16 y 20. Las flechas indican translocaciones entre los cromosomas 17 y 21 (Tomado de la ref. 40).

Hibridación genómica comparativa (HGC)

La hibridación genómica comparativa es una metodología de análisis genómico que no requiere el establecimiento de células tumorales en cultivo o la obtención de cromosomas en metafase para su análisis, sino que usa como fuente de análisis únicamente el DNA del tumor, obteniéndose un mapa genómico de las regiones de pérdida o ganancia de material genético en un solo experimento de hibridación (42). La HGC tiene su fundamento en la comparación de dos poblaciones de DNA genómico, una derivada de la muestra tumoral y la otra derivada de una muestra de referencia cariotípicamente normal. Cada una de estas poblaciones es marcada diferencialmente utilizando haptenos (marcaje indirecto) o fluorocromos (marcaje directo) diferentes. Por convención, el genoma tumoral se marca con isotiocianato de fluoresceína (FITC, verde) y el genoma de referencia con tetrametil rodamina (TRITC, rojo). Ambas poblaciones genómicas marcadas diferencialmente se mezclan en cantidades equimolares y se utilizan como sondas para una reacción de hibridación supresiva (en presencia de DNA Cot1 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 los cromosomas de manera competitiva, de esta forma, la cantidad relativa de DNA normal o tumoral que pueda unirse a su secuencia blanco en los cromosomas, irá en proporción a la abundancia relativa de esa secuencia en las poblaciones genómicas. El uso del DNA Cot1 no marcado permitirá bloquear las secuencias cromosómicas altamente repetitivas presentes en las regiones centroméricas de los cromosomas, eliminando hibridaciones no específicas en este tipo de regiones (Figura 8)

Después de la hibridación se lleva a cabo la captura digital de las imágenes, utilizando un microscopio de epifluorescencia equipado con los filtros adecuados y una cámara digital. Para el análisis de estos experimentos es necesario capturar tres imágenes de una misma

metafase utilizando los filtros ópticos adecuados: la imagen de la metafase normal, contrateñida con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, azul), la imagen de la señal del genoma tumoral (verde-fluoresceína) y la imagen de la señal del genoma de referencia (rojo-rodamina). Posteriormente, un programa específicamente diseñado para este tipo de análisis empalmará las tres imágenes para producir una imagen compuesta, la cual será sometida a un análisis digital de imagen. De esta forma, una vez hibridados los genomas normal y tumoral sobre los cromosomas, las diferencias en la intensidad de cada fluorocromo podrán ser interpretadas 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 particular marcadas con verde en el genoma tumoral que secuencias marcadas con rojo en el genoma 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 DNA de referencia en relación al DNA tumoral. Cabe mencionar que para llegar a este resultado no es suficiente el análisis de una sola metafase, sino que es necesario analizar al menos 15 metafases de cada experimento para evitar errores que puedan deberse a cambios regionales en la eficiencia de la hibridación en metafases aisladas. De esta forma, el programa de análisis generará un “cariograma de suma”, en donde están representadas las señales de las 15 metafases diferentes y sobre el cual se llevará a cabo el análisis final de un caso (Figura 9).

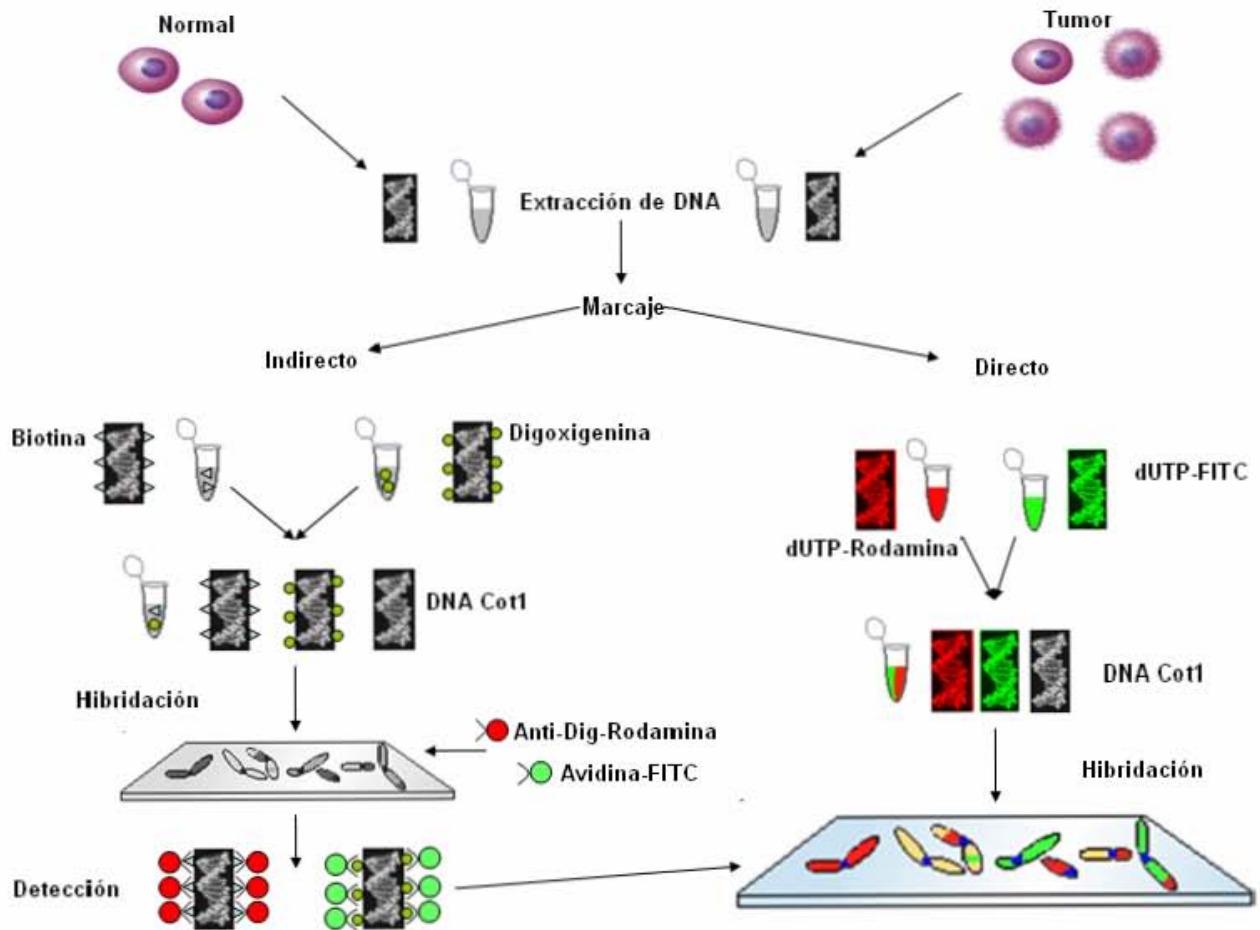


Figura 8

Metodología de Hibridación Genómica Comparativa. El DNA para el análisis debe obtenerse de al menos un 60% de células tumorales, para evitar que el DNA de células normales enmascare las alteraciones cromosómicas en el tumor. En el marcaje indirecto se incorpora un hapteno (biotina en el DNA tumoral y digoxigenina en el DNA normal) mediante "nick translation", una vez mezclados en cantidades equimolares, ambos DNAs se utilizan como sonda de hibridación sobre cromosomas en metafase de un sujeto cariotípicamente normal, para posteriormente detectar los haptenos con anticuerpos marcados con fluorocromos (anti-digoxigenina-rodamina y avidina-fluoresceína), para llevar a cabo el análisis de cambios en el número de copias a lo largo de todos los cromosomas. En el caso del marcaje directo, el fluorocromo se incorpora directamente en uno de los nucleótidos utilizados para llevar a cabo la reacción de "nick translation", eliminando el paso de detección inmunológica posterior.

Hibridación genómica comparativa en metafases

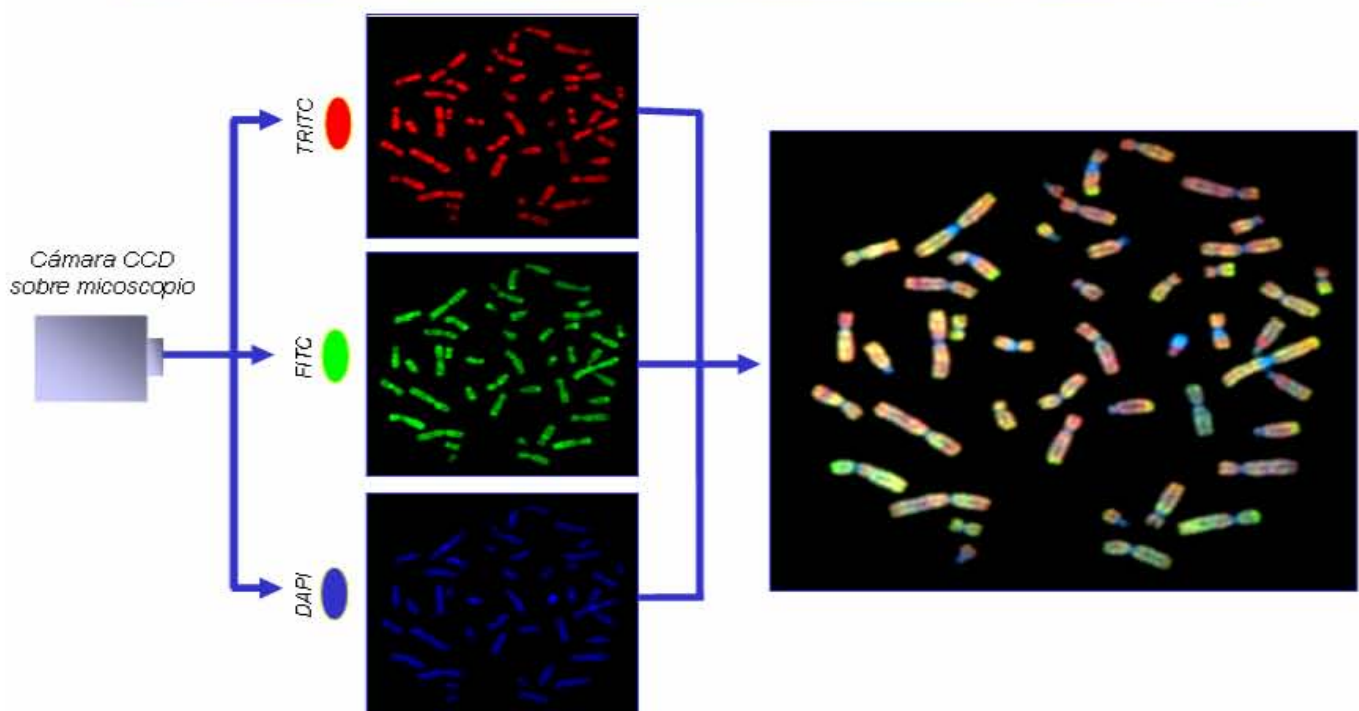


Figura 9

Captura Digital de Imágenes. Un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros para cada fluorocromo y con una cámara CCD de alta resolución permite obtener tres imágenes de una misma metafase, la imagen en rojo (TRITC, tetremetil rodamina), representa el genoma de referencia, la imagen en verde (FITC, isotiocianato de fluoresceína) representa el genoma tumoral, la imagen azul (DAPI, 4,6-diamino-2-fenilindol) representa los cromosomas en metafase sobre los cuales se llevó a cabo la hibridación. La combinación de estas tres imágenes y la relación entre la intensidad de cada fluorocromo, permitirá identificar las regiones citogenéticas que sufren amplificaciones (verde) o deleciones (rojo) a lo largo de todo el genoma.

A pesar de que algunas de estas variaciones en la intensidad de la fluorescencia pueden ser observadas directamente a través del microscopio, cuando constituyen alteraciones que involucran un alto número de copias o regiones amplias sobre los cromosomas, para llevar a cabo un análisis detallado de los resultados es necesario utilizar programas de análisis de imagen digital para evaluar los cambios en los niveles de fluorescencia. Después de obtener la imagen compuesta de las tres señales de una metafase, el sistema identificará de manera automatizada o con ayuda del usuario cada uno de los cromosomas, los cuales, al derivarse de una metafase normal, son reconocibles gracias al patrón específico de bandeo. Una vez ordenado el cariotipo, el sistema segmentará cada cromosoma y llevará a cabo una valoración de la intensidad de la fluorescencia de cada fluorocromo a lo largo de sus ejes, calculando la relación de intensidad entre la señal verde y la roja y generando una gráfica que indica las regiones de pérdida o ganancia de DNA (Figura 10).

Análisis de imagen

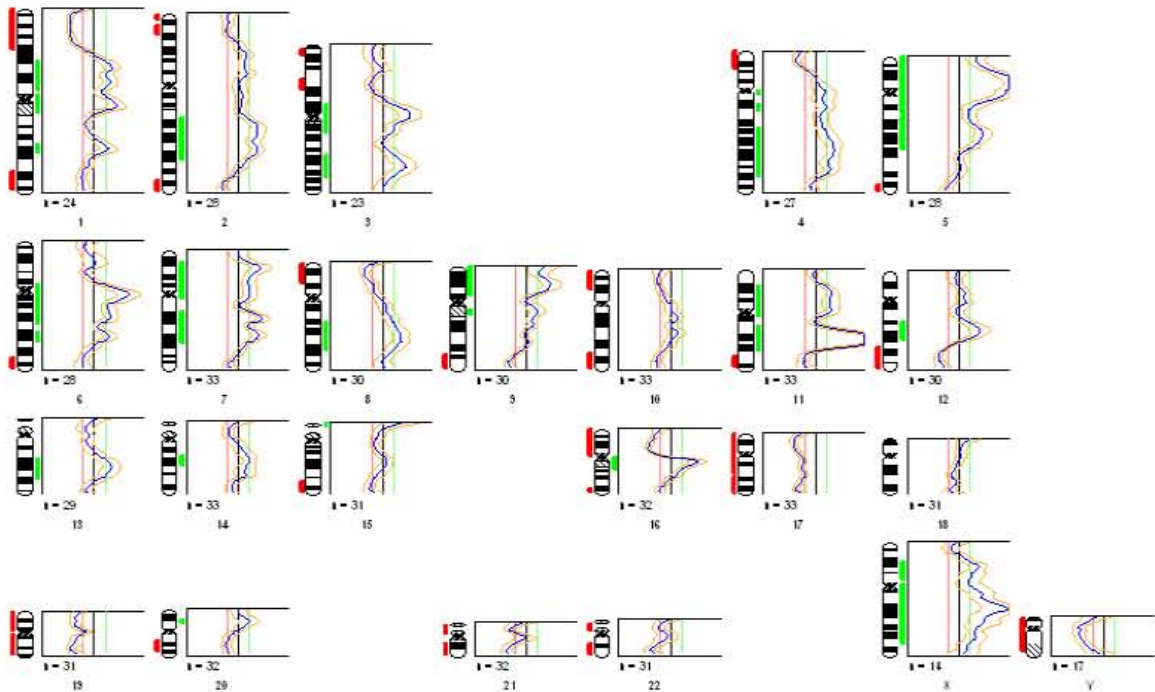
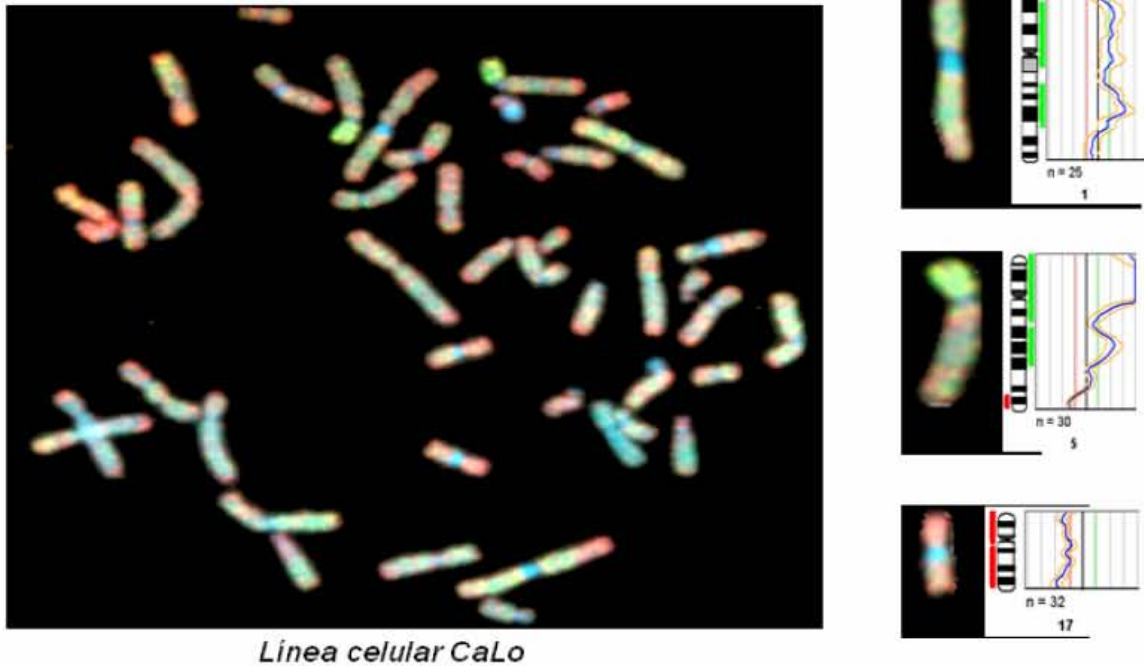


Figura 10

Análisis digital de imagen y resultado de un experimento de HGCM. Después de la cariotipificación, el software identifica el eje de simetría de cada cromosoma, lo segmenta y evalúa las relaciones de intensidad para cada fluorocromo (panel superior, resultado de la línea celular Calo), las cuales son finalmente graficadas junto a los ideogramas que indican el número de cromosomas utilizados para el análisis, así como las regiones de ganancia (barras verdes) y de pérdida (barras rojas) a lo largo de todo el genoma (panel inferior).

De esta forma, la HGC permite obtener un mapa de las regiones que sufren cambios en el número de copias de DNA en la totalidad del genoma en un solo experimento de hibridación, sin necesidad de conocer previamente las alteraciones presentes ni de llevar a cabo cultivos de las células de interés, ya que solamente necesitamos como fuente de análisis el DNA de la muestra tumoral. Esta característica de la HGC hace posible llevar a cabo estudios retrospectivos en donde se analizan las alteraciones cromosómicas en DNA de muestras de tejidos incluidos en parafina, abriendo también la posibilidad de analizar las correlaciones genotipo-fenotipo en una neoplasia.

Es necesario mencionar que el trabajar con muestras de parafina presenta retos particulares, sobre todo en lo que se refiere a la obtención de DNA con la calidad adecuada para lograr una hibridación de calidad, ya que debido a los procesos de fijación del tejido, el entrecruzamiento entre las proteínas provoca la degradación del ácido nucleico, muchas veces hasta hacerlo inutilizable para HGC. Por lo anterior, si las condiciones y tiempo de fijado del tejido no han sido controladas por el experimentador, como suele ser el caso en las muestras clínicas provenientes de los servicios de patología, resulta de vital importancia para el éxito del experimento evaluar la calidad del DNA obtenido a partir de tejido incluido en parafina mediante electroforesis en gel de agarosa. Este punto constituye una de las principales limitaciones de los estudios retrospectivos, haciendo inutilizable hasta el 20% del total de las muestras de tejido incluidas en parafina (Figura 11).

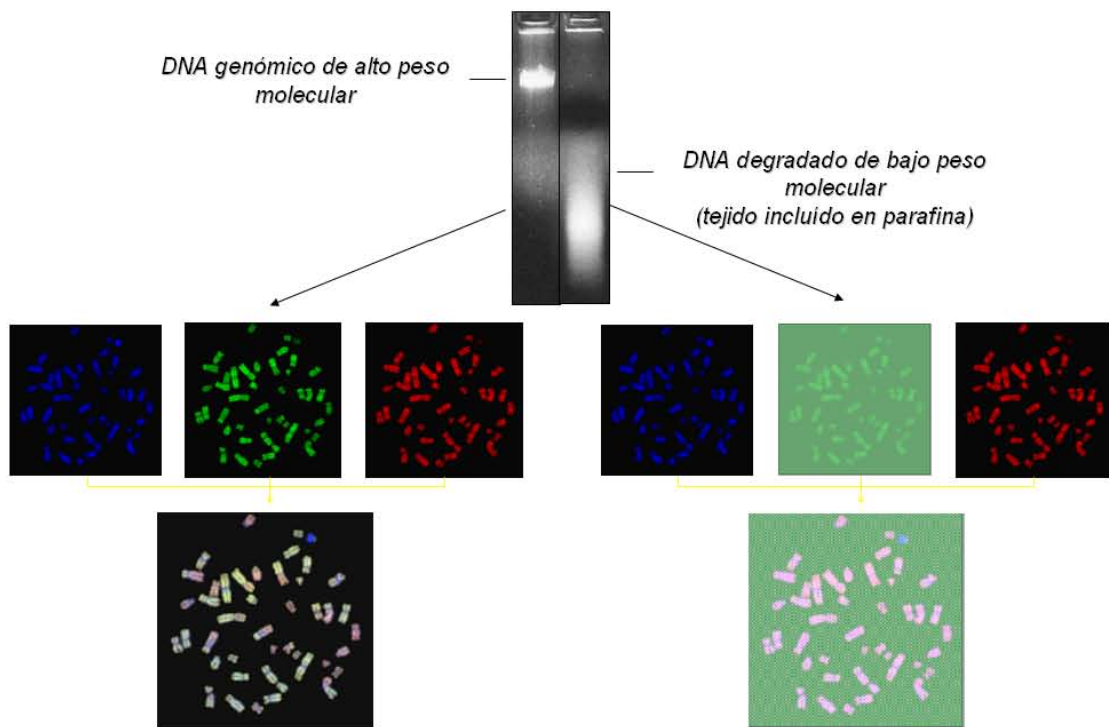


Figura 11. Efecto de la calidad del DNA sobre el resultado de HGCM.

A pesar de que para la HGCM se puede utilizar DNA proveniente de tejido incluido en parafina, los fijadores de tejido provocan la degradación del DNA. Un DNA de tamaño adecuado de la sonda marcada (200-2000 pb) permitirá obtener una señal hibridación clara con respecto al fondo. Si el DNA utilizado está muy degradado, los fragmentos de la sonda de hibridación serán tan pequeños que perderán la especificidad y no se hibridarán adecuadamente, provocando una señal muy pobre que es imposible distinguir del fondo. Si después de la reacción de marcaje los fragmentos de sonda son demasiado grandes, se observarán acúmulos inespecíficos de sonda que alterarían los resultados.

Desde su desarrollo en 1992, la HGC ha sido aplicada a prácticamente todos los tumores sólidos, (Figura 12) detectándose patrones de aberraciones específicos para cada neoplasia, así como patrones de alteraciones que son compartidas por un gran número de neoplasias (43). La figura 13 muestra un histograma de las aberraciones cromosómicas presentes en un total de 9903 casos, provenientes de 361 publicaciones, los cuales se encuentran depositados en la base de datos Progenetix (www.progenetix.com). Algunos de los datos generados en esta tesis se encuentran públicamente disponibles a través de esta base de datos, así como en de la base de datos de SKY-CGH del Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/>).

NEOPLASIAS ANALIZADAS POR HGC

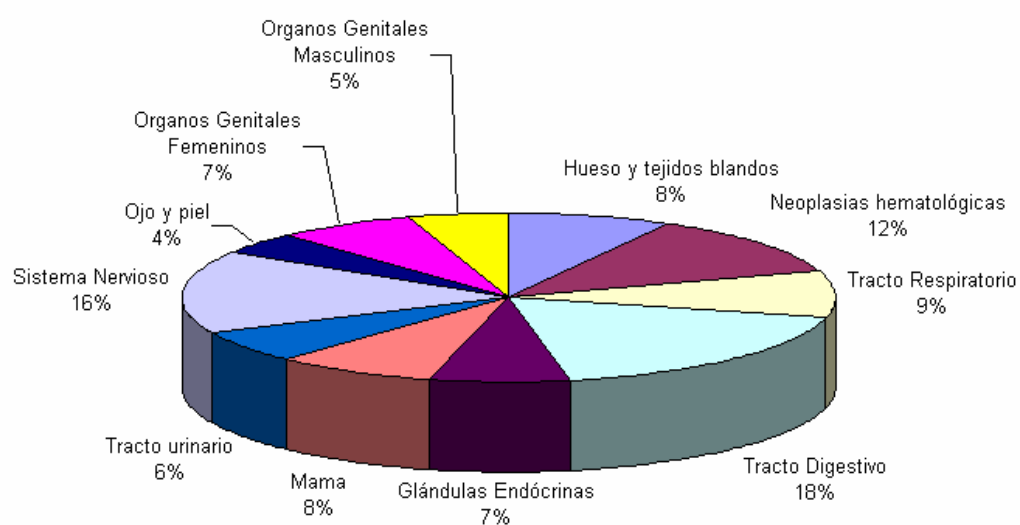


Figura 12
Tumores analizados por HGC hasta junio del 2002 (Tomada y modificada de <http://www.helsinki.fi/cmj/>)

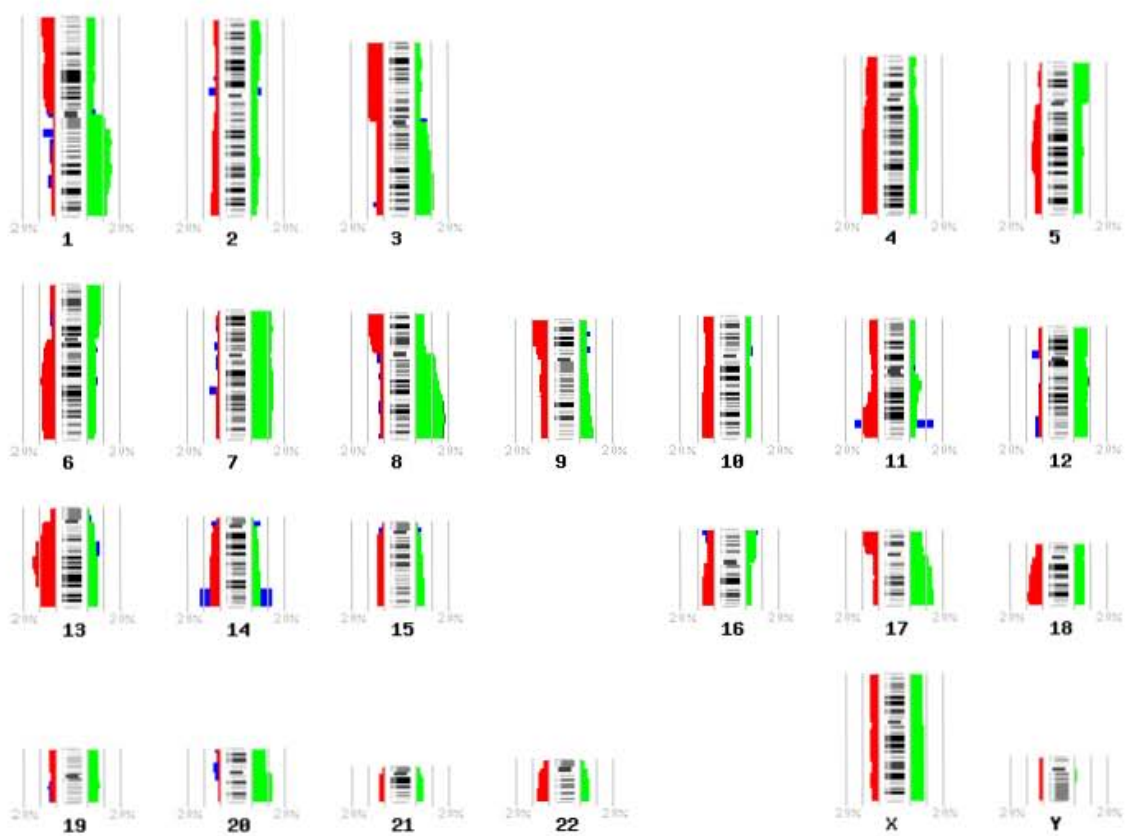


Figura 13

Histograma que presenta las alteraciones cromosómicas más comunes en un grupo de 9899 casos y 361 publicaciones, provenientes de sitios anatómicos diversos. La línea de frecuencia a la izquierda de los ideogramas representa pérdidas de DNA, la línea a la derecha, ganancias. Las barras azules representan sitios de translocaciones y rompimientos cromosómicos identificados mediante la conversión de datos de la base de datos de aberraciones cromosómicas de Mitelman en base a cariotipificación por bandeado. (Tomada de la base de datos de HGC Progenetix, www.progenetix.com).

Limitaciones de la HGC sobre cromosomas

A pesar de su gran capacidad de análisis y de la abundante información que ofrece, el método tiene limitaciones, entre las que podemos mencionar que el resultado del experimento refleja un promedio de las alteraciones presentes en la totalidad de las células analizadas, por lo que es muy importante asegurarse que al menos el 60% de las células analizadas provengan de tejido tumoral, mediante el análisis histopatológico del tejido del cual se obtiene el DNA, ya sea a través de cortes en criostato o en cortes de tejido incluido en parafina, donde se tiene que evaluar la presencia de células tumorales. Si en el tejido existe una mayor cantidad de células normales, será necesario llevar a cabo un enriquecimiento de las células tumorales a través de microdissección del tejido tumoral. Asimismo, la HGC solamente detectará alteraciones en el número de copias de DNA, pero no detectará translocaciones balanceadas, rearrreglos cromosómicos o cambios en la ploidía. Sin embargo, la mayor limitación de la HGC sobre cromosomas en metafases la constituye su limitada sensibilidad. Inicialmente, se reportó la detección de pérdidas de DNA 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 la misma, siendo posible detectar una amplificación de más de 50 copias de 300 kb. La sensibilidad del método depende también del tipo de análisis que se utiliza para detectar las alteraciones, los límites de detección previamente mencionados se asocian al uso de parámetros pre-establecidos para la detección de las alteraciones, es decir, 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. Estos parámetros se establecieron a partir de mediciones experimentales que determinaron la variación en la intensidad de la fluorescencia cuando se ganaba o se perdía una sola copia de DNA. Sin embargo, el éxito de los experimentos de HGC depende de una serie de factores en los que influyen la calidad del DNA utilizado, la

calidad de los cromosomas en metafases sobre las cuales se está hibridando, la calidad de la reacción de marcaje y una reacción de hibridación adecuada, por lo que el uso de parámetros pre-establecidos no siempre resulta lo más adecuado. Por lo anterior, se pueden utilizar para el análisis intervalos derivados de experimentos en donde se hibrida una muestra normal contra otra, tomándose como alteración todo lo que se salga de los intervalos definidos en este tipo de experimentos. Utilizando este método, ha sido posible detectar deleciones de hasta 3 Mb o amplificaciones de 5 copias de un amplicón de 3 Mb o de 10 copias de un amplicón de 1.5 Mb (42) (Figura 14).

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 HGC en metafases no ha sido tan amplio, sobre todo en el ámbito diagnóstico. Por otro lado, debido a estas limitaciones en la sensibilidad para detectar alteraciones pequeñas, los datos derivados de HGC sobre metafases nos ofrecen muy poca información acerca de 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.

Para solventar algunas de estas limitaciones, sobre todo la de sensibilidad, diversos grupos han desarrollado un nuevo método, la HGC sobre microarreglos o HGC en matriz (44, 45).

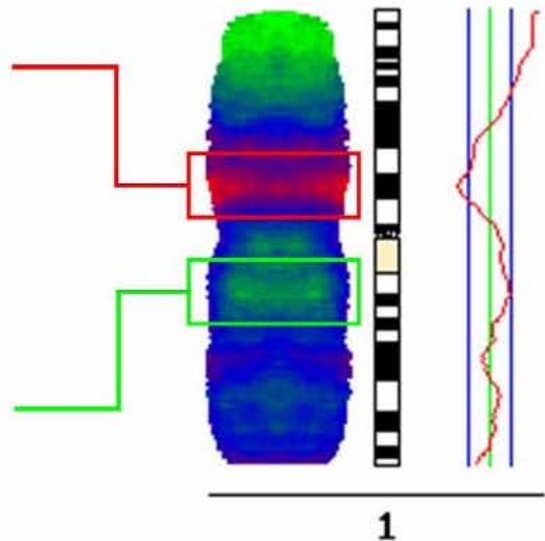
SENSIBILIDAD DE HGCM

DELECCIONES

- Parámetros pre-establecidos: 10-12 Mpb.
- Intervalos de referencia estándar: 3 Mpb.

AMPLIFICACIONES

- 10 copias: 1.5 Mpb.
- 50 copias: 600 Kpb.



Tamaño promedio de banda citogenética: 7.5 Mpb.

Tamaño promedio de un gen: 1.2 Kpb

Figura 14

Límites de sensibilidad de la HGC sobre cromosomas en metafases. Los parámetros pre-establecidos fueron definidos en base a experimentos donde se evaluó el cambio en la relación de intensidad de la fluorescencia cuando se perdía o se ganaba una sola copia de un cromosoma determinado. Los intervalos de referencia estándar se obtienen mediante experimentos donde se compara una muestra normal marcada con un fluorocromo contra otra muestra normal marcada con el otro fluorocromo, de esta forma se obtiene un patrón de referencia más adecuado para cada grupo de experimentos.

Microarreglos

Un microarreglo (o microhilera, micromatriz, microarray, biochip, chip), está constituido por secuencias de ácidos nucleicos que previamente han sido caracterizados, los cuales están ordenados e inmovilizados sobre una matriz sólida, que puede ser nylon, cristal o plástico, generalmente formando una matriz de puntos. Cada punto representa un gen y la posición de cada gen dentro de la matriz está perfectamente ubicada. Gracias a los avances en el proceso de miniaturización y el uso de soportes sólidos, tales como el cristal, en 1995 fue posible desarrollar un microarreglo de DNAC que es capaz de contener hasta 10,000 secuencias de DNA, cada una representando un gen diferente. Los microarreglos, dependiendo del tipo de plataforma que se utilice para su construcción, pueden ser utilizados para diferentes propósitos. En general, existen dos tipos de microarreglos, los que se construyen utilizando DNAs complementarios de los RNAs mensajeros de los genes, o los que se construyen a partir de oligonucléotidos de 50-70 pares de bases. Los arreglos de DNAC fueron los que se desarrollaron inicialmente, gracias a la disponibilidad de bibliotecas de DNAC completos obtenidas de diversos tejidos. Sin embargo, estos arreglos presentan algunos problemas, por ejemplo, dadas las diferencias en el tamaño de las diferentes sondas de DNAC impresas en el arreglo, las condiciones de hibridación para cada sonda son diferentes, asimismo, usando la secuencia completa del DNAC, se corre el riesgo de obtener hibridaciones cruzadas entre secuencias de diferentes genes, haciendo la interpretación de los datos bastante difícil. Por otro lado, los arreglos de oligonucléotidos de 50-70 pb (pares de bases), se obtienen a partir del análisis de las bases de datos de DNAC con diferentes herramientas bioinformáticas, las cuales permiten identificar secuencias de estas longitudes que identifican de manera inequívoca cada gen, eliminando las hibridaciones cruzadas y homogeneizando las condiciones de hibridación para todos los blancos impresos en el

arreglo. Estas características de los arreglos de oligonucleótidos sintéticos, han hecho que en la actualidad, este tipo de microarreglos sean los más utilizados. Los microarreglos de DNAC por lo general son utilizados para determinar los patrones de expresión génica en una muestra determinada, los microarreglos genómicos, que contienen DNA genómico, son utilizados para detectar alteraciones en el número de copias de DNA, mientras que los microarreglos de oligonucleótidos pueden ser utilizados para los dos procesos antes descritos y además, para secuenciación y detección de polimorfismos y de mutaciones puntuales. Existen diversas formas para construir microarreglos, una es la deposición de la solución que contiene las secuencias de ácidos nucleicos sobre el soporte sólido utilizando un brazo robótico, otra es mediante la síntesis *in situ* de los oligonucleótidos sobre la superficie del cristal utilizando métodos de fotolitografía y otro ejemplo lo constituye el uso de tecnologías similares a las de las impresoras de inyección de tinta sobre el soporte sólido para construir el arreglo. En general, el fundamento de los microarreglos es similar al de la HGC, dos poblaciones experimentales, ya sean de DNA genómico o de DNAC obtenido a partir de los genes expresados en diferentes condiciones experimentales (por ejemplo, tejido normal contra tumor), son marcados diferencialmente utilizando fluorocromos, cada sonda competirá por hibridar sobre su complementario en el microarreglo, y de igual forma que en la HGC, la evaluación en la intensidad de la fluorescencia entre las sondas hibridadas, será una representación de la abundancia relativa de cada una en la población inicial. Una vez hibridados, se capturan las imágenes de cada fluorocromo utilizando un "scanner" y se obtienen las relaciones de intensidad de fluorescencia para cada fluorocromo. Finalmente, los datos deberán ser analizados para determinar la tasa de expresión o el número de copias para cada uno de los genes representados en el arreglo. Una revisión más detallada de la tecnología de microarreglos se expone en las publicaciones anexas 2 y 3. Información detallada de la metodología de

construcción, uso y aplicaciones de los microarreglos, así como de sus aplicaciones en estudios biológicos puede consultarse en la página: www.microarrays.org

HGC sobre microarreglos

Uno de los beneficios alternos generados por el Proyecto del Genoma Humano, fue la construcción de diversos vectores que contienen clonados fragmentos discretos de los cromosomas humanos, los cuales fueron utilizados para llevar a cabo la secuenciación del genoma de una manera ordenada. Para cumplir este objetivo fue necesario conocer primero la localización citogenética exacta de cada una de estas clonas, así como el orden en que se encontraba cada una de ellas sobre los cromosomas. Este esfuerzo de mapeo puso a disposición de la comunidad científica un grupo de clonas que representan secuencias particulares del genoma humano, perfectamente mapeadas y con una correlación directa con la secuencia del genoma.

En la HGC sobre microarreglos se sustituyen las preparaciones de cromosomas en metafase por este tipo de clonas, por lo general representadas en cromosomas artificiales de bacterias (BACs). Estas clonas son ordenadas sobre soportes sólidos utilizando un robot micro-arreglador y sirven como blancos para la hibridación (Figura 15), siguiendo una metodología muy similar a la descrita para la HGC en cromosomas. 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 de bajo número de copias) (44-45). Otras ventajas que representa el uso de microarreglos para HGC, además de la mayor capacidad de resolución es el mejor rango dinámico que se obtiene en estos experimentos en comparación con los de cromosomas en metafase, la correlación directa entre los blancos impresos en el arreglo y la secuencia del genoma humano y la facilidad de analizar un alto número de muestras de

forma automatizada, abriendo las posibilidades de la aplicación del método al ámbito diagnóstico (46).

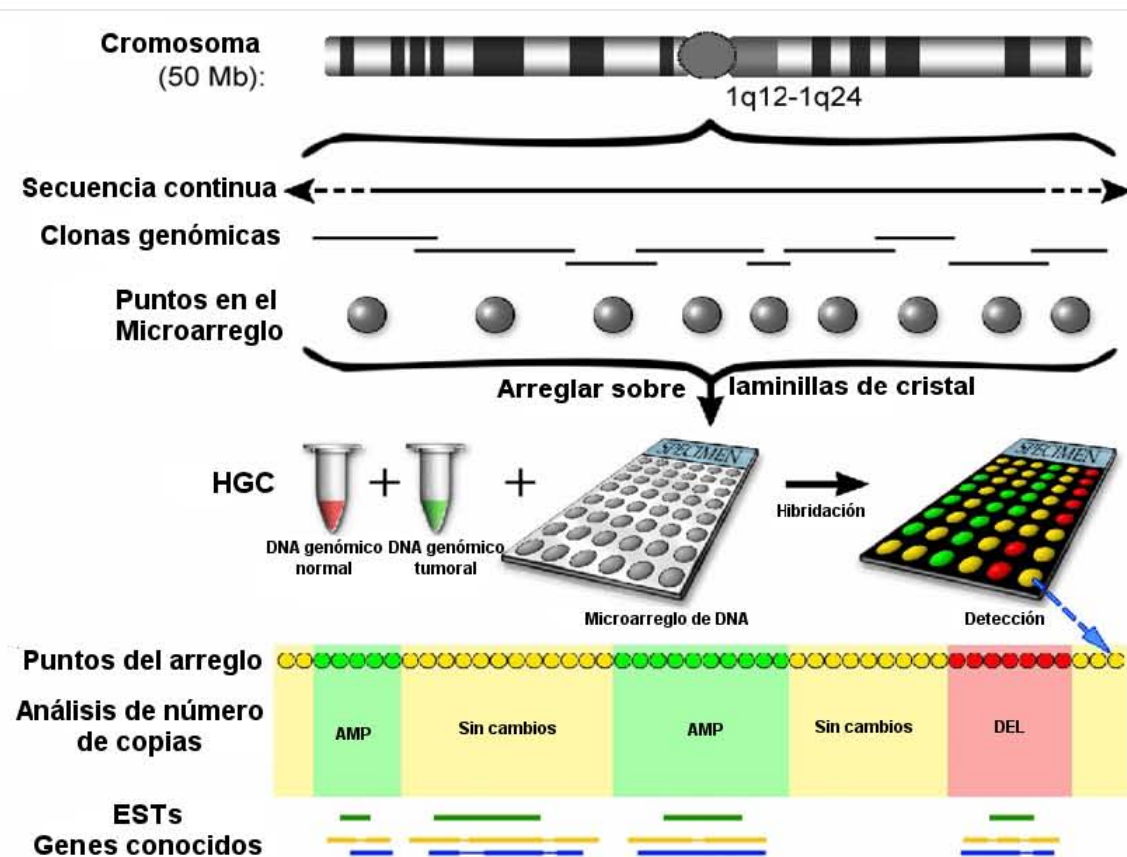


Figura 15

Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos o HGC en matriz. Los segmentos de los cromosomas están clonados en cromosomas artificiales de bacterias (BACs), los cuales se organizan en la matriz del arreglo y se utilizan como blancos de la hibridación. Dada la correlación directa entre los fragmentos cromosómicos insertos en cada BAC y las secuencia del genoma humano, es posible identificar alteraciones en genes particulares. ESTs: marcas de secuencias expresadas (expressed sequence tags). AMP: amplificado (verde), DEL: deletado (rojo).

La HGC sobre microarreglos ha sido aplicada también al estudio de la biología del cáncer, utilizándose arreglos dirigidos a ciertas regiones particulares del genoma (47-48), regiones particulares que comúnmente sufren alteraciones en su número de copias en diferentes tumores (49) o utilizando microarreglos que cubren la totalidad del genoma (50). En todos los casos, la HGC sobre microarreglos ha detectado alteraciones que fueron pasadas por alto por la HGC sobre cromosomas en metafase, lo que demuestra la mayor sensibilidad de los microarreglos sobre los cromosomas en metafase. Al igual que la HGC sobre cromosomas, pero de una manera más específica, el uso de los arreglos está abriendo la posibilidad de llevar a cabo una clasificación de los tumores en base a sus patrones de alteraciones cromosómicas. Asimismo, el método ha permitido analizar de una manera más profunda la estructura de los amplicones previamente detectados mediante HGC sobre cromosomas (51).

Como podemos observar, gracias a la relación directa entre las clonas organizadas en el arreglo y la secuencia del genoma humano, la aplicación de este método al estudio de las alteraciones cromosómicas presentes en las neoplasias permite obtener, además de un mapa que nos indica las alteraciones presentes en un tumor, la identidad de los genes o de las secuencias blanco específicas que pueden estar jugando papeles importantes en la progresión o comportamiento biológico de la enfermedad, además, es posible llevar a cabo análisis que nos permitan tratar de determinar directamente sobre la secuencia posibles mecanismos moleculares implicados en la formación de aberraciones cromosómicas. La tabla I muestra algunas diferencias entre la HGC sobre cromosomas en metafase y sobre microarreglos.

Una revisión de algunas de las metodologías genómicas de alto rendimiento, como los microarreglos y la hibridación genómica comparativa, así como su aplicación al estudio del cáncer, se presenta en el anexo número 1.

HIBRIDACION GENOMICA COMPARATIVA					
	Blanco de hibridación	Parafina	Marcaje	Sensibilidad	Automatización
Metafases	Cromosomas en metafase	Si	Nick translation	Amplificaciones 10 copias-1.5 Mpb 50 copias-600 kpb Deleciones 3-12 Mpb	No
Microarreglos	Fragmentos cromosómicos en BACs	Si	Random primer	Amplificaciones 75 kpb-10 copias 40 kpb-50 copias Deleciones 130 kpb	Si
LIMITACIONES					
Poliploidía	Aneuploidía	Translocaciones balanceadas	Translocaciones no balanceadas	Amplificaciones y deleciones	
No	Si	No	Si	Si	

Tabla I

La diferencia más relevante entre la HGC sobre microarreglos y sobre cromosomas en metafase, la constituye su sensibilidad. Asimismo, el alto número de cromosomas que se deben analizar por caso y la falta de programas completamente automatizados de cariotipificación, hacen más difícil la automatización de la HGC sobre cromosomas.

HGC en CaCu

En el caso particular del CaCu la HGC sobre cromosomas en metafases ha sido aplicada al estudio de todos los estadios de la enfermedad, detectándose alteraciones cromosómicas en este tipo de tumor, además de identificar alteraciones que pueden relacionarse con comportamientos clínicos relevantes. En lo que respecta a la HGC sobre microarreglos, hasta la fecha no existen estudios que analicen este tumor utilizando esta metodología. Como lo hemos discutido, la HGC sobre cromosomas en metafase ofrece una resolución limitada, por lo que el análisis con microarreglos resulta de particular relevancia para determinar de una manera más específica genes particulares que son blanco de alteraciones en su número de copias en el CaCu.

El primer estudio de HGC en CaCu analizó los patrones de desbalances cromosómicos presentes en muestras con diferentes grados de progresión, correlacionando estos datos

con la actividad proliferativa de las lesiones, así como con su ploidía y la presencia de VPH. Entre los resultados obtenidos, se indica que antes de que se pueda detectar la presencia de alteraciones cromosómicas específicas, se produce la tetraploidización de la célula, lo cual coincide con trabajos previos en donde se detecta la tetraploidización desde etapas muy tempranas de la progresión (52). La aportación más importante de este trabajo fue la detección de la amplificación del brazo largo del cromosoma 3 la cual, aunque solamente se identificó en una de las lesiones pre-malignas, estuvo presente en más del 90% de los tumores invasores, por lo que se propuso que esta alteración citogenética representa el evento que define la transición entre la displasia severa / Ca. *in situ* y el carcinoma invasor (52).

Posteriormente, este mismo grupo reporta la existencia de un patrón recurrente de alteraciones cromosómicas en carcinomas cervicales en estadio avanzado (etapas IIB-IV), describiendo que esta neoplasia presenta un alto grado de inestabilidad genómica, así como un alto grado de aneuploidía y una alta capacidad proliferativa. La tetraploidización previamente observada en las displasias moderadas y severas, se convierte en los tumores invasores en una profunda aneuploidía, la amplificación del brazo largo del cromosoma 3 (3q) se mantiene en estos tumores avanzados, pero se presentan también alteraciones como la ganancia del brazo largo del 1 (1q), el brazo corto del 5 (5p) y pérdidas en las bandas 2q37-q37 (53).

Una vez establecida la existencia de un patrón específico de alteraciones cromosómicas durante el desarrollo del CaCu, se analizó el posible papel pronóstico de estas alteraciones genómicas en tumores en estadio IB, con relación a la presencia de metástasis linfáticas regionales (54). Este estudio resulta significativo desde el punto de vista clínico en diversos aspectos, ya que describe una asociación entre el número total de alteraciones cromosómicas y la supervivencia de los pacientes, en particular, el número

total de deleciones es el parámetro que define esta relación. Esta observación sugiere que uno de los mecanismos de progresión del CaCu lo constituye mayormente la pérdida o inactivación de genes supresores de tumor localizados en 9p, 11p y 18q. Entre otros genes localizados en estas regiones, los autores plantean a *DCC*, *DPC4* y *MADR2* como algunos de los posibles genes involucrados en estas regiones citogenéticas. Las pérdidas de material genético en el brazo largo del cromosoma 18 y en el brazo corto del cromosoma 11 se asociaron también con un mal pronóstico y un menor tiempo de sobrevivida. Por otra parte, se encontró una asociación entre deleciones en 9p y la presencia de metástasis ganglionares (54).

Kirchhoff *et. al.* (55) confirma la existencia de un patrón de alteraciones cromosómicas en estadios avanzados del CaCu. Sin embargo, descubren también la existencia de patrones particulares en las lesiones pre-malignas. En adición a la ganancia de 3q, encuentran que alteraciones como ganancias en 1q y 8q, así como deleciones en 11q, 13q y 6q también están presentes desde etapas tempranas de la progresión, sugiriendo que la transición hacia la invasión no puede deberse a una sola alteración cromosómica. A pesar de estos resultados, Ried *et. al.* (56) proponen un modelo de progresión del CaCu en el cual las lesiones pre-malignas tetraploides aun no presentan alteraciones específicas, siendo el primer desbalance cromosómico la ganancia de 3q en la etapa I de los carcinomas invasores, seguido de ganancias en 1q, 5p, 8q y 20p, además de pérdidas en 2q (Figura 17). Estas son las alteraciones más frecuentemente identificadas en diferentes estadios del CaCu, sin embargo, como ya lo hemos expuesto, la ganancia de secuencias del brazo largo del cromosoma 3 ha sido detectado en lesiones pre-malignas por lo que, contrario al modelo propuesto en la figura 17, la transición de una displasia severa, a un carcinoma invasor, involucra la presencia de otras alteraciones citogenéticas. En ninguno de los

estudios descritos, se ha detectado un patrón de alteraciones cromosómicas que se relacione con la presencia de tipos de VPH determinados.

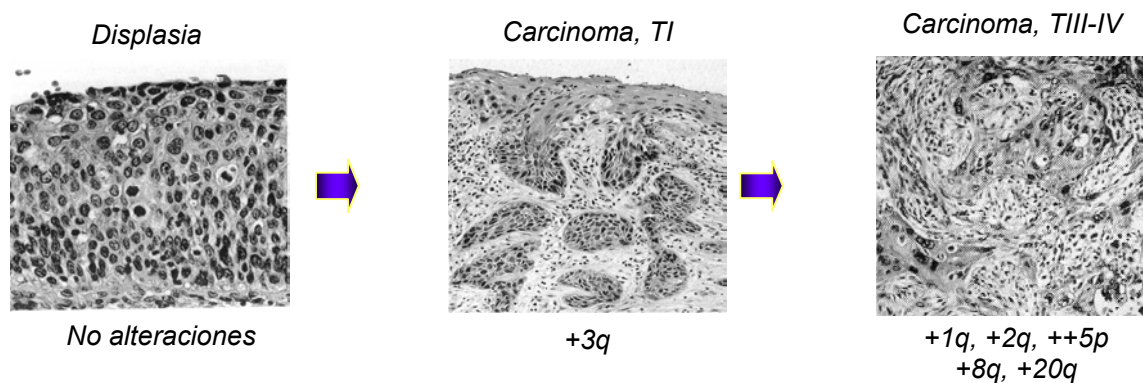


Figura 17.

Modelo de progresión neoplásica propuesto por Ried. En este modelo se sugiere que la primera alteración detectable, después de la tetraploidización, es la ganancia del brazo largo del cromosoma 3. Referencia 46.

También se ha relacionado la presencia de alteraciones citogenéticas con la progresión tumoral, encontrándose que aquellos tumores con metástasis en ganglios, presentan un mayor número de alteraciones cromosómicas (57).

Posteriormente se describe la presencia de alteraciones específicas en estadios muy tempranos de la progresión, detectándose deleciones en los cromosomas 4, 5p y Xq, así como ganancias en 1q, 15q y 3q en displasias moderadas. Varias de estas alteraciones están también presentes en tumores invasores, lo que indica que juegan un papel en la progresión. Estos resultados contradicen la hipótesis de que la aparición de la amplificación de 3q sea el evento específico que marca la transición al CaCu invasor e indican que otras alteraciones, por si mismas o en conjunto con 3q, son las que pueden determinar que una lesión pre-maligna evolucione (58-59). Esto se ve confirmado en otro estudio en donde se combina la HGC con la técnica de DOP-PCR (amplificación de DNA utilizando oligonucleótidos degenerados) para detectar alteraciones durante la progresión

del CaCu, encontrándose que además de la ganancia de 3q, la pérdida de 11q y 2q representan también un evento temprano en la carcinogénesis cervical (59). La combinación de HGC y otro método de citogenética molecular, la cariotipificación espectral (SKY por sus siglas en inglés), permitió llevar a cabo una caracterización profunda de líneas cervicales derivadas de CaCu, indicando que el origen de algunas de los cambios en el número de copias observados mediante HGC tienen su origen en translocaciones no balanceadas presentes en el cariotipo de estas células (60).

Asimismo, con la finalidad de caracterizar posibles genes blancos de alteraciones en la región 2q35-q36.1, la cual se deleta en etapas tempranas del tumor, se llevaron a cabo experimentos de HGC, análisis de pérdida de heterocigocidad y análisis de expresión de genes localizados en esta región, identificando posibles blancos génicos que disminuyen su expresión en tumores cervicales y delimitando la región de pérdida y posible localización de genes supresores de tumor entre 2q35-q36.1 y 2q36.3-q37.1 (61-62)

A pesar de la relevante información generada en estos trabajos, aun no se define de forma exacta cual es la secuencia de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu. Sin embargo, la disponibilidad de gran cantidad de datos de CaCu generada mediante HGC sobre cromosomas, incorporados en las bases de datos públicamente disponibles, hace posible llevar a cabo un análisis detallado de los eventos citogenéticos necesarios para la génesis y progresión del tumor aplicando metodologías de análisis bioinformático.

Bioinformática

La aplicación de los métodos de análisis genómico de alto rendimiento, como los microarreglos y la HGC, generará una gran cantidad de datos, de los cuales es necesario extraer la información biológicamente relevante, haciendo uso de diversas herramientas de análisis y de minado de datos. El manejo de grandes cantidades de datos, así como la

relación de estos datos con los reportados en bases de datos biológicos disponibles, así como el análisis matemático de estas relaciones, ha dado lugar al surgimiento de una nueva rama de las Ciencias Biológicas: la bioinformática.

La bioinformática es el campo de la ciencia en donde la biología, las ciencias computacionales y las tecnologías de manejo de la información se unen para formar una sola disciplina (63). El objetivo de esta disciplina es permitir obtener mediante esta combinación, nuevas perspectivas biológicas, así como poder crear una perspectiva global a partir de la cual principios biológicos básicos puedan ser inferidos. En un inicio, la bioinformática se dedicó a coleccionar y organizar en bases de datos biológicos resultados como secuencias de nucleótidos o proteínas. Además de esta labor de colección y almacenaje, también se diseñaron nuevas tecnologías que permitieran acceder a estas bases de datos a cualquier investigador, tanto para analizar los datos almacenados, como para contribuir datos nuevos al acervo.

Sin embargo, poco después la bioinformática evolucionó para combinar toda esta información biológica y poder ofrecer una visión acerca del funcionamiento celular, tanto en condiciones normales como patológicas. Asimismo, además de ser una herramienta integradora de datos contenidos en bases de datos biológicas, esta disciplina permitió también el desarrollo de herramientas que permiten el análisis derivados de diferentes plataformas experimentales (microarreglos de expresión, microarreglos de HGC), así como el desarrollo y aplicación de nuevos algoritmos matemáticos y estadísticos útiles para determinar relaciones que no resultan evidentes cuando se analizan grandes cantidades de datos, tales como los generados por experimentos de análisis genómico.

De esta forma, las herramientas de análisis bioinformático nos permiten, por un lado, acceder a bases de datos disponibles públicamente vía internet para hacer complementar

nuestros datos experimentales y hacer un análisis más exhaustivo de los mismos, y por otro lado, nos permite utilizar programas específicamente diseñados para explotar estas bases de datos, con la finalidad de facilitar el diseño experimental desde una perspectiva más global. En este trabajo se aplicarán herramientas de análisis y minado de datos, así como diversos programas informáticos para determinar los patrones de alteraciones cromosómicas en CaCu. Una gran cantidad de información acerca de diversos aspectos de la bioinformática, así como diversos tutoriales para aprender el manejo de variadas bases de datos, puede ser consultada a través de la página de educación del portal del *National center for Biotechnology information*, de los Institutos nacionales de salud de los Estados Unidos (www.ncbi.nlm.nih.gov/education/index.html). Por otro lado, una extensa compilación de bases de datos y herramientas de análisis bioinformático, la cual se actualiza anualmente, es publicada por la revista *Nucleic Acids Research*, y puede ser consultada a través de la página: www3.oup.co.uk/nar/database/c/

JUSTIFICACION

El CaCu se desarrolla pasando por etapas con creciente grado de malignidad, desde un epitelio normal, pasando por lesiones pre-malignas, tumores invasores y metástasis en otros órganos del cuerpo, existiendo lesiones morfológicamente distinguibles para cada estadio de la progresión neoplásica. Si este tipo de tumor es detectado en etapas tempranas, en la mayoría de los casos es curable. Hasta este momento, la única forma de determinar inicialmente la presencia de una lesión es mediante el análisis citológico mediante la prueba de papanicolau, dependiendo el diagnóstico de la presencia de figuras morfológicas sugerentes de alteraciones neoplásicas en las células obtenidas durante el análisis. Por otro lado, aún en presencia de infección por VPH, un alto porcentaje de las lesiones pre-malignas que se detectan mediante citología presentan regresión espontánea, siendo limitado el número de lesiones que evolucionan hacia un tumor invasor (64). Hasta este momento no contamos con ningún marcador molecular que indique la probabilidad de que una lesión precursora evolucione para dar lugar a una lesión invasora. Entre las alteraciones que se presentan durante la progresión neoplásica está la pérdida y ganancia de material genético (aneuploidía), por lo que la detección de alteraciones cromosómicas específicas durante la progresión de este tipo de tumor, podría identificar marcadores moleculares con el potencial de ser utilizados con fines pronósticos o diagnósticos de la capacidad de progresión de esta neoplasia. Desafortunadamente, aplicando los métodos de cariotipificación no ha sido posible determinar marcadores cromosómicos asociados a CaCu. La aplicación de metodologías de análisis genómico, debido a su mejor resolución, ofrece una mayor posibilidad de determinar blancos génicos específicos que sufran cambios en su número de copias durante la progresión neoplásica, los cuales podrían potencialmente ser utilizados como marcadores biológicos para el diagnóstico y/o pronóstico de este tipo de tumor.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCu representa la primera causa de muerte en la población femenina de nuestro país, constituyendo uno de los problemas sociales y de salud más importantes.

La evidencia clínica indica que además de los factores de riesgo más importantes asociados a esta enfermedad (principalmente infección por VPH de alto riesgo), deben existir otros factores genéticos que determinen si una lesión premaligna evolucionará hacia la malignidad. A pesar de los esfuerzos por identificar alteraciones que permitan evaluar este riesgo, hasta la fecha no se cuenta con marcadores moleculares adecuados que permitan llevar a cabo esta evaluación.

Para poder determinar la existencia de dichos marcadores, es necesario determinar la secuencia de eventos genéticos que traen como consecuencia la aparición y posterior desarrollo de esta neoplasia. La posibilidad de detectar estos posibles marcadores se incrementará si en su búsqueda se aplican metodologías de análisis genómico que nos permitan evaluar el mayor número de blancos génicos con el menor tiempo. En algunos casos, no se cuenta con estas metodologías en el ámbito nacional, por lo que resulta de vital importancia el entrenamiento y la transferencia de tecnología para poderlas aplicar a problemas de salud relevantes en nuestro entorno. Con la finalidad de resolver los problemas planteados se determinaron los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los patrones de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu, así como delimitar posibles marcadores moleculares asociados a la progresión de esta neoplasia.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Transferir las tecnologías de hibridación genómica comparativa sobre cromosomas en metafase, (HGCm) y en microarreglos (HGCμ), para llevar a cabo análisis genómico de muestras del cérvix uterino en diferentes etapas de la progresión neoplásica.
- Una vez implementada la tecnología, determinar los patrones de alteraciones cromosómicas en tejidos del cérvix uterino humano mediante la aplicación de HGC sobre cromosomas en metafase.
- Crear una base de datos de alteraciones cromosómicas en CaCu a partir de los datos generados por los puntos anteriores y a datos disponibles en la literatura, con la finalidad de determinar las alteraciones más prevalentes en los diferentes estadios de la progresión.
- Mediante el análisis bioinformático de esta base de datos, identificar la secuencia de eventos citogenéticos durante la progresión del CaCu.
- Aplicar la metodología de HGC sobre microarreglos para delimitar de una manera más clara posibles marcadores involucrados en el CaCu.

MATERIAL Y METODOS

En total se analizaron 60 muestras mediante HGC, (40 mediante HGCm y 20 mediante μ HGC). Estas muestras incluyeron 20 tumores invasores incluidos en parafina y 20 líneas celulares, las cuales fueron analizadas mediante HGC sobre cromosomas en metafase, mientras que 13 lesiones cervicales incluidas en parafina y 7 líneas celulares se analizaron mediante μ HGC. La tabla I presenta las características de este conjunto de muestras.

Los resultados de los 40 casos de muestras derivadas de cérvix uterino obtenidos mediante HGCm, junto con datos previamente publicados (286 casos), dieron lugar a la formación de una base de datos de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu, que contenía un total de 326 casos. Esta base de datos fue evaluada utilizando diferentes herramientas de análisis bioinformático para determinar el patrón de alteraciones cromosómicas en CaCu, así como la secuencia de eventos citogenéticos durante la progresión de este tumor. Por otro lado, los experimentos de μ HGC nos permitieron identificar genes particulares involucrados en cambios en el número de copias de DNA cuya alteración podría estar jugando un papel relevante en el proceso de transformación neoplásica. La figura 18 presenta el diagrama de flujo seguido en esta metodología.

Tejidos y líneas celulares

Los tejidos cervicales analizados fueron obtenidos en el Departamento de Ginecología Oncológica del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, los Departamentos de Patología del Hospital General de México y del Hospital de la Mujer, SSA, así como del servicio de Patología del Hospital Universitario Charité en Berlín, Alemania y en todos los casos constituyeron tumores con histotipo epidermoide. En

cuanto a las líneas celulares, se analizaron las líneas Casky, Hela y Siha, establecidas a partir de una metástasis al intestino de un tumor epidermoide del cérvix, un adenocarcinoma del cérvix y un tumor epidermoide primario. Las 17 líneas restantes (T1-T12, VIPA, CALO, VIVO, ROVA, INBL), fueron establecidas por los Dres. Alberto Monroy y Julia Urdiales a partir de tumores epidermoides de pacientes mexicanas en el laboratorio de Diferenciación celular y cáncer de la Escuela Superior de Estudios Zaragoza, UNAM y han sido utilizadas para estudios donde se analiza el papel de tirosinas cinasas en el crecimiento celular y en estudios donde se analizan péptidos antigénicos derivados de la proteína viral L1 (65, 66). La tabla II muestra información acerca de las muestras que fueron analizadas mediante HGC sobre cromosomas en metafase y la tabla III muestra información acerca de las muestras analizadas mediante HGC sobre microarreglos.

Detección y tipificación de VPH

La detección de VPH se llevó a cabo mediante PCR usando los iniciadores consenso MY09 y MY11 para la región L1 del genoma viral, seguido de captura de híbridos o iniciadores para el gen E6 viral, seguido de secuenciación automatizada.

CASO	FIGO	MUESTRA	HPV	REFERENCIA
G1	IVa	T	NEG	Hidalgo, <i>Eur J Cancer</i> , 2000. Anexo 4
G2	IVa	T	16	
G3	Ib	T	18	
G4	Ib	T	16,18	
G5	IIb	T	16	
G6	Ib	T	16	
G7	Ib	T	18	
G8	IIb	T	16,18	
G9	Ib	T	16,18	
G10	IVa	T	18	
G11	IIb	T	33	
G12	Ib	T	16	
T1	IIa	CL	18	
T2	IIb	CL	18	
T3	IIb	CL	18	
T4	IIb	CL	18	
T5	IIa	CL	18	
T6	IIb	CL	18	
T7	IIa	CL	18	
T8	IIa	CL	16,18	
T9	IIb	CL	18	
T10	IIb	CL	18	
T11	IIb	CL	18	
T12	IIb	CL	18	
CALO	IIb	CL	18	Hidalgo, <i>BMC Cancer</i> , 2003, Anexo 5
VIPA	IIa	CL	18	
INBL	IVa	CL	18	
ROVA	IVa	CL	18	
CASKi	IVa	CL	16	Hidalgo, sometido, <i>BMC cancer</i> , Anexo 6
HELA	INV-ADENO	CL	18	
SIHA	INV	CL	16	
VIVO	INV	CL	NEG	
M-01	INV	T	16	
M-02	INV	T	16	
M-03	IIIb	T	58	
M-04	IIIb	T	16	
M-05	IIb	T	N/D	
M-06	IIb	T	N/D	
M-07	INV	T	N/D	
M-08	IIb	T	16	

TABLA II. Características de las 40 muestras derivadas de CaCu analizadas mediante HGCm. INV= tumor invasor, T= tejido proveniente del tumor, CL= línea celular, NEG= negativo, N/D= no determinado

CASO	FIGO	MUESTRA	HPV	REFERENCIA
G67	NIC III	PRE	16	Hidalgo, sometido, BMC cancer, Anexo 6
G42	NIC III	PRE	31	
G60	NIC I	PRE	58	
T56	Ib	T	16	
T24	IIb	T	NEG	
T49	IVa	T	16	
SXA	IIb	T	16	
LRL	IIb	T	16	
A69	IIIb	T	N/D	
T55	Ib	T	16	
T46	Ib	T	16	
ASJ	IIb	T	16	
INBL	IVa	CL	18	
CALO	IIb	CL	18	
VIBO	INV	CL	NEG	
VGR	IIb	CL	N/D	
HELA	INV	CL	18	
SIHA	INV	CL	16	
CASKY	IVa	CL	16	
ROVA	IVa	CL	18	

Tabla III. Características de las muestras analizadas mediante HGC en microarreglos. NIC I-III= Neoplasia intraepitelial cervical grado I-III; INV= tumor invasor; PRE= lesión pre-maligna, T= tejido proveniente del tumor invasor; CL= línea celular; N/D= no determinado; NEG= negativo.

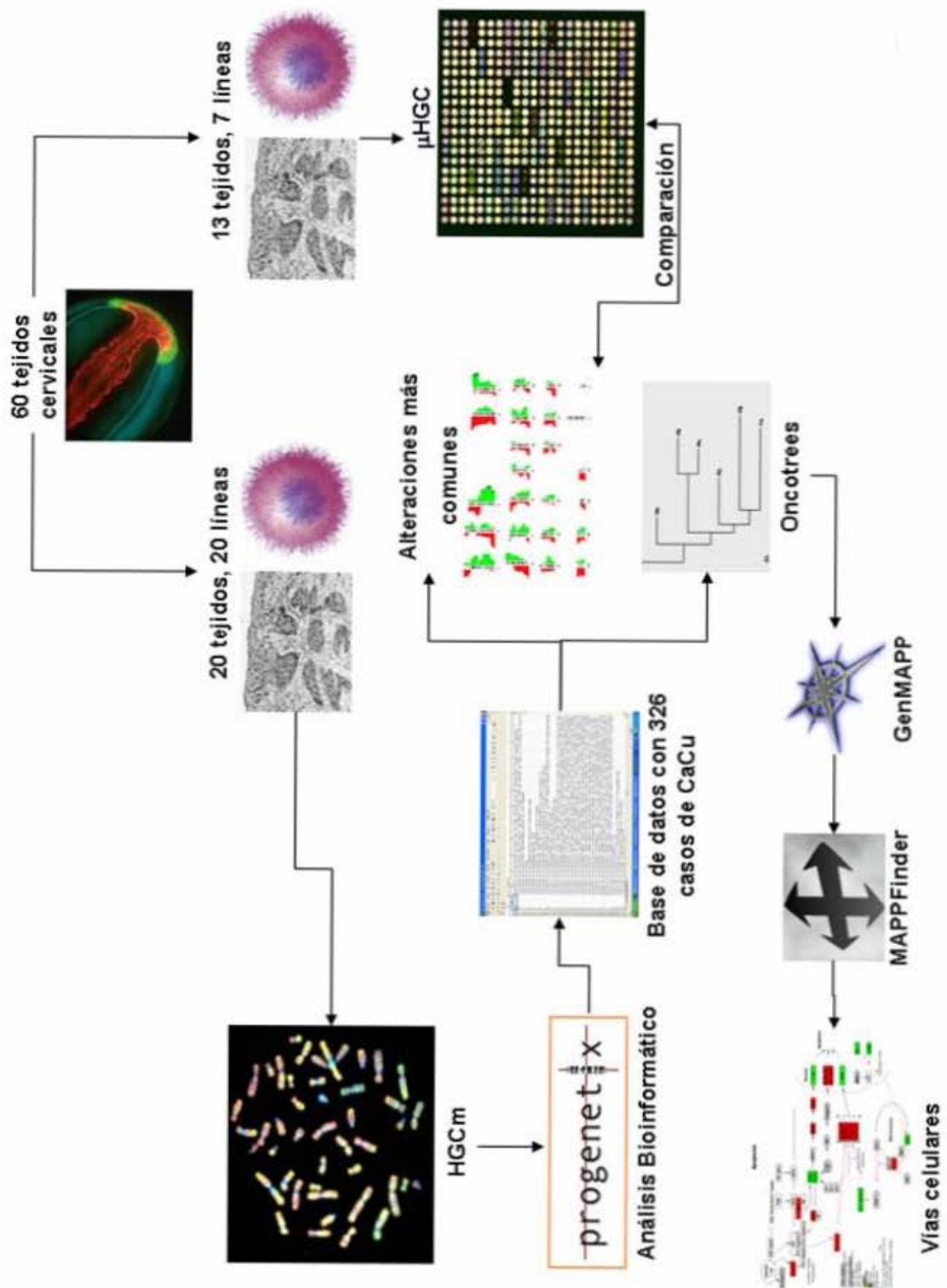


Figura 18

Metodología. Diagrama de flujo que muestra la metodología diseñada para cumplir los objetivos de esta tesis. Se trabajaron 40 muestras de tejidos cervicales mediante HGcm, las cuales se complementaron con datos publicados de otros 268 casos para constituir la base de datos de aberraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu. 20 muestras fueron analizadas mediante μHGC. Los programas Oncotrees, GenMAPP, MAPPfinder y progenetix fueron utilizados para el análisis bioinformático de los datos.

Hibridación Genómica Comparativa sobre metafases (HGCm)

Extracción de DNA.

El DNA de los tejidos y de las líneas celulares se purificó utilizando el kit Wizard (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las áreas donde se encontraba el tejido tumoral fueron identificadas y señalada por un patólogo en una corte histológico teñido con hematoxilina-eosina. Este corte se utilizó como guía para identificar la misma región en cortes histológicos no teñidos, de los cuales se microdisecaron 25 cortes de 10 micras para la obtención del DNA. El tejido fue depositado en tubos eppendorf de 1.5 ml y desparafinado en xilol dos veces durante 10 minutos, seguido de rehidratación en una serie de alcoholes con concentración descendente, hasta PBS (amortiguador de fosfato salino, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 10 Mm Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) 1X. El tejido fue entonces centrifugado, se eliminó el PBS y se resuspendió en 600 µl de amortiguador de lisis (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.5% P/V SDS), incubándose durante 72 horas a 50°C. Después de esta incubación se adicionaron 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó por otras 24 hrs a 50°C. Una vez completamente digerido el tejido, se adicionaron 200 µl de la solución de precipitación de proteínas (3 M NaAc) y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se centrifugó por tres minutos a 16,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo que contenía 600 µl de isopropanol helado para precipitar el DNA. El DNA se centrifugó durante 1 min a 16,000 rpm y la pastilla se lavó dos veces en etanol al 70%, para ser finalmente en un volumen adecuado de agua bidestilada esteril. La calidad del DNA fue determinada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y la concentración fue determinada mediante espectrofotometría.

Marcaje de las sondas para HGCm

Las muestras fueron marcadas utilizando el método de marcaje directo, siguiendo el protocolo del kit de marcaje para HGC (Vysis). En estos experimentos se utilizó el DNA de referencia marcado con Spectrum Red de Vysis. Brevemente, 1µg de DNA genómico tumoral se marcó en una reacción de nick translation que contenía 2.5 µl de 0.2 M dUTP-spectrum green, 5 µl de 0.1M dTTP, 10 µl de la mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, 0.5 mM cada uno, dTTP 0.1 mM), 5 µl del amortiguador de nick translation 10X (0.5 M Tris pH 8, 50 mM MgCl₂, 0.5mg/ml BSA) y 10 µl de la mezcla de enzimas (DNAsa/DNApol) en un volumen final de 50 µl. Esta reacción se incubó 1 hr a 15°C y el tamaño de las sondas se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Si el tamaño de la sonda no era el adecuado (200-2000 pb), la reacción se incubó por un periodo mas prolongado hasta alcanzar el tamaño deseado. Posteriormente, la reacción se detuvo mediante calentamiento a 70°C por 10 min. Las sondas marcadas se almacenaron a -20°C en la oscuridad hasta su uso. La eficiencia del marcado se comprobó en una reacción idéntica a la descrita, en donde se sustituyó el nucleótido marcado con el fluorocromo por un nucleótido marcado con biotina. Una vez marcada esta sonda fue sometida a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, después de correr a 60 V por 2 hrs, el gel se lavó dos veces durante 15 minutos en 0.25 M HCl, seguido de dos lavados por 15 min en 0.5 M NaOH / 1.5 M NaCl y un lavado de 15 min en 20X SSC (3.0 M NaCl, 0.3 M NaAc). Finalmente la sonda fue transferida del gel a una membrana de nylon mediante vacío durante 90 min en 10X SSC. Una vez transferida la sonda, la membrana se secó y se entrecruzó durante 3 min usando luz ultravioleta. La detección de la marca se llevó a cabo mediante la inmunodetección de la biotina con un complejo avidina-fosfatasa alcalina, el

revelado del sistema se llevó a cabo con azul de tetrazolio, el cual produce un precipitado de color azul en las áreas de reacción.

Hibridación de las sondas marcadas sobre cromosomas en metafases normales

El método de marcaje químico directo del DNA genómico de referencia de Vysis (marcado con el fluorocromo "spectrum red"), tiene una mayor eficiencia en el marcado que la reacción de nick translation con la que se marcó el DNA tumoral, por lo que en la mezcla de hibridación se usa una menor cantidad de DNA de referencia en relación con el DNA tumoral marcado con spectrum green.

La mezcla de hibridación se preparó combinando 10 μ l (200 μ g) de DNA tumoral marcado con spectrum green mediante nick translation, 1 μ l (100 μ g) de DNA normal de referencia marcado con spectrum red y 10 μ l (10 μ g) de DNA Cot1 humano no marcado. El DNA Cot1 representa la fracción del genoma que contiene secuencias altamente repetitivas, como las que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas, la finalidad de incluirlos en la reacción de hibridación es la de bloquear estas regiones cromosómicas con secuencias repetitivas para eliminar hibridación inespecífica de las sondas en estas regiones. A esta mezcla se adicionaron 2.1 μ l de acetato de sodio 3 M y 52.5 μ l de etanol absoluto helado, se incubó a -70°C durante 20 min y se centrifugó a 16,000 rpm durante 30 min a 4°C. La pastilla de DNA se secó al aire y se resuspendió en 3 μ l de agua bidestilada esteril y 7 μ l de la solución de hibridación. Las sondas fueron desnaturalizadas durante 5 min a 73°C y finalmente se incubaron a 37°C durante 1 hr. Durante esta pre-hibridación, se seleccionaron las áreas de hibridación en las laminillas con las metafases, estas áreas deben contener una buena cantidad de cromosomas en metafase que presenten dispersión adecuada de los cromosomas. Las laminillas con los cromosomas en metafases se desnaturalizaron en 50% formamida/2X SSC a 72°C durante 5 min.,

después de lo cual las laminillas fueron deshidratadas en una serie de baños de etanol en concentraciones ascendentes helados (70-100%) para finalmente ser secadas al aire. Posteriormente, 10 μ l de la sonda desnaturalizada se depositaron en las áreas de hibridación previamente localizadas y desnaturalizadas. La hibridación se llevó a cabo en una cámara húmeda a 37°C durante 72 hrs, después de las cuales las laminillas se lavaron en 0.4X SSC/0.3% NP-40 (Nonident P-40) durante 2 min, seguido de un lavado en 2X SSC/0.1% NP-40 durante 5 min. Finalmente las laminillas fueron contrateñidas con DAPI (4.6-diamidino-2fenilindol dihidroclorido) y montadas mediante la adición de 10 μ l de la solución de montaje. Las laminillas fueron almacenadas a 4°C en la oscuridad hasta la captura de imágenes.

Captura digital de imágenes y análisis

Para llevar a cabo el análisis de HGC se capturaron al menos 15 células cuyos cromosomas se encontraban en metafase por caso (23 cromosomas por 15 metafases = 600-690 cromosomas por caso, aproximadamente) utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus equipado con una rueda de filtros para DAPI, "SpectrumGreen" y "SpectrumRed" y una cámara digital, usando el programa de captura de imagen Smart Capture (Vysis). Se capturó una imagen para cada fluorocromo por metafase (DAPI; longitud de onda de excitación 359 nm, emisión 461 nm – Spectrum Green; 497-538 – Spectrum Red, 587-612), las cuales fueron almacenadas en formato TIFF de 8 bits. El análisis de HGC se llevó a cabo utilizando el programa de Vysis, cuyo funcionamiento comprende los siguientes pasos: 1) Segmentación de la imagen utilizando la imagen en DAPI, este paso identifica los componentes individuales de la imagen, en este caso cada uno de los cromosomas de la metafase;

2) corrección del corrimiento óptico, cuando se cambia el filtro para capturar los mismos cromosomas en metafase con diferentes fluorocromos, se produce un movimiento o corrimiento de los mismos, estando en posiciones ligeramente distintas en cada imagen. Debido a que el éxito de los experimentos de HGC se basa en la medición exacta de la relación de intensidad de fluorescencia entre dos fluorocromos, una alineación perfecta de las imágenes resulta absolutamente necesaria.

3) Valoración de la relación de intensidad de fluorescencia entre las imágenes de "SpectrumGreen" y "SpectrumRed". Para la detección de pérdidas o ganancias de DNA en base a las relaciones de intensidad entre los fluorocromos, es necesario normalizar y eliminar el fondo de las imágenes derivadas de estos fluorocromos. Una vez normalizadas las imágenes se calcula la relación de intensidad entre ambas imágenes y se produce una imagen pseudo-coloreada donde se muestran las ganancias de DNA en color verde, las pérdidas en color rojo y las áreas sin alteración en azul.

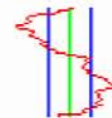
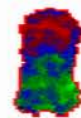
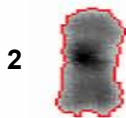
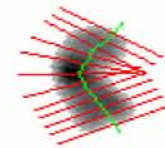
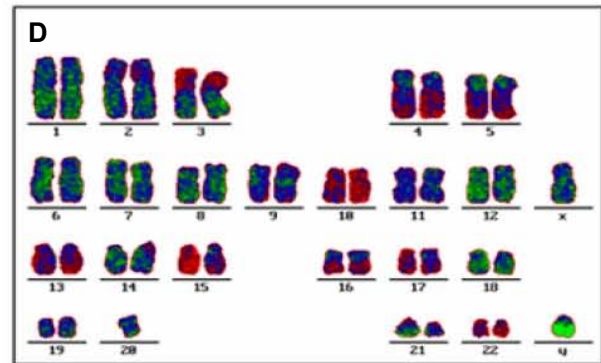
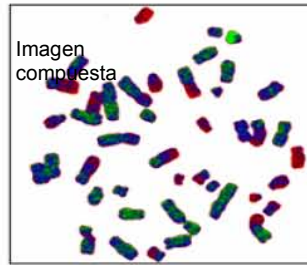
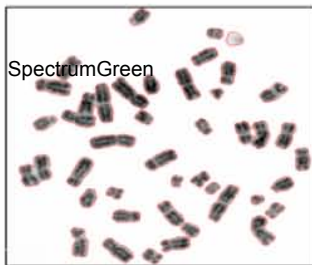
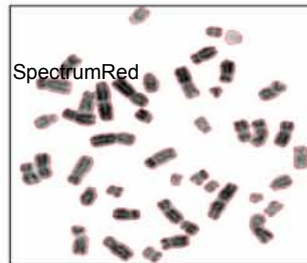
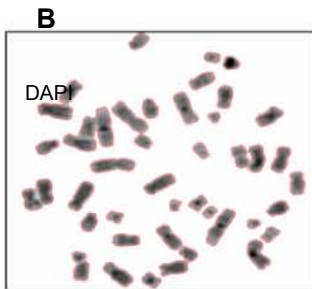
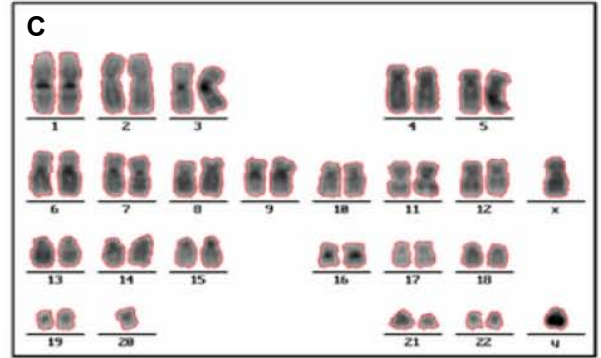
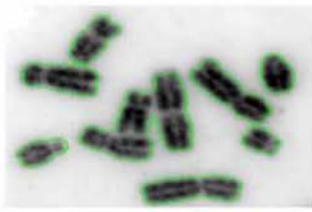
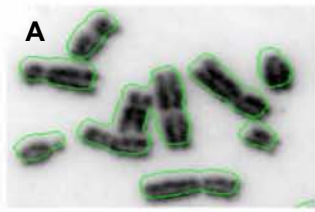
4) Cariotipificación. El programa está equipado para hacer la cariotipificación de forma automatizada, sin embargo el usuario puede hacerlo de forma manual en base al bandeado.

5) Definición de los ejes cromosómicos. La definición exacta del eje de cada cromosoma sienta las bases para el cálculo correcto de las intensidades de fluorescencia. El proceso identifica el eje de simetría de cada cromosoma para llevar a cabo su segmentación y análisis.

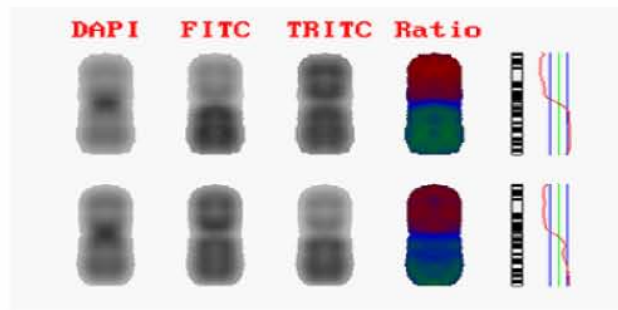
5) Cálculo de los patrones de alteraciones cromosómicas. Una vez identificado el eje de simetría del cromosoma, así como determinada la segmentación del mismo, se evalúan las intensidades de la fluorescencia en cada uno de los segmentos, calculándose la relación de intensidad "SpectrumRed-SpectrumGreen" para cada segmento. Estos datos

se utilizan para crear el perfil de las alteraciones cromosómicas presente en una metafase determinada. Posteriormente, una vez obtenido el patrón de cada metafase, el sistema calcula el promedio de la relación $\text{SpectrumRed-SpectrumGreen}$ del conjunto de imágenes que se capturó para cada caso, el cual por lo general fue de 15 extendidos de cromosomas en metafase por caso. De esta forma, el resultado de un experimento es un “cariograma promedio” que presenta las alteraciones presentes en aproximadamente 600 a 690 cromosomas de una muestra particular (67). Cada uno de los pasos de este proceso de muestra en la figura 19.

Figura 19. (Página siguiente) Pasos llevados a cabo por el programa de análisis de HGCm. A) Segmentación de la imagen y corrección del corrimiento óptico, B) Combinación de las imágenes derivadas de cada fluorocromo y construcción de la imagen compuesta, C) Cariotipificación, D) Imagen pseudo-coloreada que indica las regiones de ganancia (verde) y pérdida (rojo) de DNA. E) 1. Identificación del eje de simetría y segmentación de cada cromosoma; 2. Evaluación de las relaciones de intensidad de la fluorescencia para cada fluorocromo, superposición de imágenes y cálculo de la relación de intensidad entre los fluorocromos. F) Determinación de las alteraciones en los diferentes casos (67).



F



HGC sobre microarreglos

Los análisis de HGC sobre microarreglos 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 microarreglo representa regiones comúnmente alteradas en cánceres humanos, tales como telómeros, regiones donde ocurren microdeleciones, oncogenes y genes supresores que se encuentran dispersos a lo largo del genoma. El hecho de que el arreglo no cubra el genoma a intervalos regulares hace que la cobertura y la resolución del mismo sea limitada, sin embargo no deja de constituir una herramienta útil para detectar de una forma confiable alteraciones citogenéticas cuya asociación al cáncer humano han sido demostradas.

Brevemente, 100 ng de DNA genómico fueron marcados mediante una reacción de oligonucleótidos al azar durante dos horas, la cual contenía el DNA, 41.6 μ l del amortiguador de reacción 2.5X (125 mM Tris-Cl pH6.8, 12.5 mM MgCl₂, 25 mM β -mercaptoetanol) y 40 μ l de la mezcla de oligonucleótidos al azar (750 μ g/ml de los octámeros al azar). Esta mezcla se desnaturalizó a 100°C durante 10 min, seguido de una incubación en hielo durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 10 μ l de la mezcla de nucleótidos del kit GenoSensor array 300 (10X dATP, dGTP, dTTP cada uno 2 mM y dCTP 0.5 mM en TE (10 mM Tris-Cl, 1 Mm EDTA pH8.0), 2.4 μ l de Cy3 (1 mM) para el DNA tumoral o 2.4 μ l de Cy5 (1 mM) para el DNA normal de referencia, obtenido a partir de linfocitos de una mujer cariotípicamente normal, y 2 μ l de enzima klenow. Esta reacción se incubó en la oscuridad durante 2 hrs a 37°C. Después del marcaje, 100 μ l de las sondas fueron digeridas mediante la adición de 17 μ l de amortiguador de reacción de DNasa (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ y 3 μ l de una dilución 1:20 de

DNasa durante 1 hr a 15 °C. Posterior a la digestión, las sondas fueron purificadas mediante precipitación con etanol. Cada sonda fue resuspendida en amortiguador TE y repurificadas con precipitación por etanol después de una incubación a -20° C toda la noche. Finalmente, cada sonda fue resuspendida en 4 µl de Tris pH 8.0 y su tamaño fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa. La hibridación del microarreglo, su lavado y contrateñido, se llevo a cabo siguiendo las instrucciones del sistema de hibridación de microarreglos GenoSensor Array 300. Cada sonda fue diluida usando 25 µl del amortiguador de hibridación y finalmente 2.5 µl de los DNAs tumoral y normal, marcados con Cy5 y Cy3, respectivamente, fueron mezclados y desnaturalizados durante 10 min. a 80° C, seguido de una incubación a 37° C durante 1 hr. Cinco µl de esta mezcla de hibridación fueron depositados sobre el área del microarreglo y cubiertos con un portaobjetos. Los microarreglos se depositaron en una cámara húmeda saturada con 50% formamida (FA)/2XSSC e incubados a 37° C durante 72 hrs. Después de la hibridación, los arreglos fueron lavados tres veces en 50% FA / 2 X SSC a 40° C por 10 min. cada lavado, seguido de cuatro lavados de 5 min. en 1 X SSC a temperatura ambiente y finalmente enjuagados rápidamente en agua bidestilada. Los microarreglos fueron finalmente contrateñidos usando la solución de montaje con DAPI durante 45 min.

Captura de imágenes y análisis

La visualización y captura de imagen se llevó a cabo de inmediato 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 DNA tumoral y el normal y crea un reporte de las regiones que presentan cambios en cuanto a número de copias. El sistema reconoce como ganancias

aquellas regiones donde la relación de fluorescencia 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 amplificaciones con alto número de copias a las regiones con una relación superior a 2 ($\log_2 = 1$), en base a parámetros previamente establecidos para experimentos de HGC sobre microarreglos (45). Las relaciones de fluorescencia T/N de cada experimento se reunieron en una base de datos independiente. De esta base de datos se obtuvo el promedio de las relaciones T/N para cada blanco del arreglo, los cuales están impresos por triplicado, una vez obtenido de promedio de cada blanco, se obtuvo el logaritmo en base 2 de cada una de las relaciones y este valor se normalizó para el análisis de agrupamiento jerárquico. El análisis de agrupamiento jerárquico y de medias de K se llevó a cabo utilizando el programa Cluster, para visualizar el dendrograma se usó el programa TreeView (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>), los mapas auto-organizados se obtuvieron con el programa J-express.

Análisis bioinformático de los resultados de HGC

Una vez obtenidos los resultados de CGH se construyó una base de datos que incluyó las aberraciones cromosómicas de cada caso de acuerdo al sistema internacional de nomenclatura para citogenética humana (ISCN), indicando las regiones con amplificaciones y deleciones dentro de la descripción de cada caso. Con estos datos se alimentó el programa ISCN2 Matrix Converter (<http://www.progenetix.net/>), el cual convierte la información del formato ISCN a una matriz de datos que representa las bandas citogenéticas con una resolución de 862 bandas, la cual puede ser utilizada para otro tipo de experimentos bioinformáticos de minado de datos (68). Asimismo, utilizando otras herramientas de esta página, se construyeron diferentes histogramas que muestran las alteraciones cromosómicas más frecuentes en CaCu. Un ejemplo de los datos

contenidos en esta base, describiendo las alteraciones citogenéticas en cada caso se muestra en la figura 20.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1 CervCaAH-01	rev ish enh(1q21q25, 3q13.3qter, 7p36, 17q11.2qter, 19) dim(2q, 3p, 4p, 5p21, 6q14q16, 8q23, 11q13qter, 13q21q31)							
2 CervCaAH-02	rev ish enh(1pterp33, 5pterp14, 7pterp13, 7q36, 9pterp21, 11p14q13, 12q24.1qter, 14q22q25, 16p, 16q24, 17, 19, 20)							
3 CervCaAH-03	rev ish enh(11q13q22, 16p) dim(2q34qter, 3p23p12, 5q, 11q25, 18q22qter)							
4 CervCaAH-04	rev ish enh(5p)							
5 CervCaAH-05	rev ish enh(1pterp32, 3q, 5p, 8, 19q13.1q13, 3, 20) dim(4p16, 7q36)							
6 CervCaAH-06	rev ish enh(3q25qter) dim(7q36, 11q25)							
7 CervCaAH-07	rev ish enh(6p21.3p12, 15) dim(2q34qter, 4, 5q, 6q, 11q14qter)							
8 CervCaAH-08	rev ish enh(3q13.3qter, 14q32, 19p13.2, 17q24) dim(2q34qter, 3p, 4, 5pterp14, 7pterp21, 13)							
9 CervCaAH-09	rev ish enh(3q26.2qter, 5q31q33, 8q, 19) dim(2q33qter, 3p, 4, 5q, 8p23, 10, 11q22qter, 13q21q22)							
10 CervCaAH-10	rev ish enh(2p21p11.2, 3q29, 6p22p21.1, 9q32qter, 11p15, 11q12q23, 14q22qter, 15q22qter, 16pterp16, 17q24q25, 1)							
11 CervCaAH-11	rev ish enh(5p) dim(2pterp22, 2q22, 4, 6q21q25, 7q33qter, 11)							
12 CervCaAH-12	rev ish enh(1pterp36.1, 19q13.1q13.3) dim(4q, 6q12q15, 9q24, 12q21)							
13 CervCaAHCL	rev ish enh(1p31p12, 1q31q32, 2pterp14, 3q11.2q26.3, 5p, 5q22q23, 6q, 6q23, 7p13, 7q31qter, 8q24.2, 11p, 11q12q)							
14 CervCaAHCL	rev ish enh(1p32qter, 3q25qter, 5p, 6pterp21.2, 8q, 11p15, 11q21, 12pterq14) dim(1pterp36.1, 2pterp23, 2q22qter, 3p)							
15 CervCaAHCL	rev ish enh(1q22q32, 3q, 5p, 6pterp22, 7, 8q24.1qter, 10pterp12, 11p15, 11q22, 17p, 22q13) dim(3p13p14, 4p, 4q12q)							
16 CervCaAHCL	rev ish enh(1p31p12, 1q, 3q, 5p, 5q11.2q23, 6pterp21.3, 7q31, 8q, 9p21, 11p14p13, 11q14q22, 12p12q14, 12q21, 13)							
17 CervCaAHCL	rev ish enh(1p31p12, 1q21q42, 2qterq13, 3q13.2q27, 5p, 5q23q31, 5q34qter, 6p, 7p14p12, 7q31qter, 11p14, 11q13q)							
18 CervCaAHCL	rev ish enh(1p31p12, 1q32, 2pterp14, 3q23q26.3, 5p, 5q22qter, 6p, 6q22, 7q35, 11p, 11q12q23, 13q21qter, 14q24q3)							
19 CervCaAHCL	rev ish enh(1p34.2p12, 1q, 2p16p14, 3q, 5pterq14, 6pterp21.3, 7p15p12, 8q, 9q31q33, 11p, 11q22, 12pterq34.1, 15q)							
20 CervCaAHCL	rev ish enh(1p35p32, 2q36q37, 7p15p12, 7q22qter, 10q25qter, 12q24.2qter, 17q, 20) dim(4p14q21, 5p14, 6q12q21, 8p)							
21 CervCaAHCL	rev ish enh(1p21q23, 1q32q41, 2pterp15, 3q21q23, 5p, 5q23q31, 5q35, 6p, 7p14p12, 7q32qter, 9q34, 11p15, 11q12q)							
22 CervCaAHCL	rev ish enh(1p31p12, 1q22q42, 2pterp13, 3q13.3q27, 5p, 5q22qter, 6p, 7p15p12, 7q31qter, 8q24.1qter, 9q31qter, 10p)							
23 CervCaAHCL	rev ish enh(1q, 3q, 5p, 6p, 7q, 8q24.2qter, 9q34, 14q22qter, 15q22qter, 17p, 20q, 21q) dim(2q34qter, 4, 6q14qter, 8p)							
24 CervCaAHCL	rev ish enh(1q22qter, 3q, 5p, 6pterp21.1, 7, 8q24.1qter, 11q15, 11q22, 14q22, 16q13) dim(2q34qter, 4pterq26, 4q32c)							
25 01-VIPA cell I	rev ish enh(1p22p21, 1q23q32, 2q21q32.2, 3p22, 3p12q13.2, 3q22q25, 4q13, 4q22q31.3, 5pterp15.2, 5q14q23, 6p12)							

Figura 20

Base de datos que describe las alteraciones cromosómicas presentes en cada caso (columna A), descritas utilizando el sistema internacional de nomenclatura citogenética (columna B)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	BANDA	T01-IIa-18	T05-IIa-18	T07-IIa-18	T08-IIa-16-18	CL-VIPA-IIa-1	INV IIb	INV IIb	INV IIb	INV IIb
2	1p36.32	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0
3	1p36.31	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0
4	1p36.23	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0
5	1p36.22	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0
6	1p36.21	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0
7	1p36.13	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0
8	1p36.12	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0
9	1p36.11	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0
10	1p35.3	-1	0	0	1	-1	0	0	0	0
11	1p35.2	-1	0	0	1	-1	0	0	0	0
12	1p35.1	-1	0	0	1	-1	0	0	0	0
13	1p34.3	-1	0	0	1	-1	0	0	0	0
14	1p34.2	-1	0	1	1	-1	0	0	0	0
15	1p34.1	-1	0	1	1	-1	0	0	0	0
16	1p33	-1	0	1	1	-1	0	0	0	0
17	1p32.3	0	0	1	1	-1	0	0	0	0
18	1p32.2	0	0	1	1	-1	0	0	0	0
19	1p32.1	0	0	1	1	-1	0	0	0	0
20	1p31.3	1	1	1	0	0	0	0	0	0
21	1p31.2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
22	1p31.1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
23	1p22.3	1	1	1	0	1	0	0	0	0
24	1p22.2	1	1	1	0	1	0	0	0	0
25	1p22.1	1	1	1	0	1	0	0	0	0

Figura 21

Matriz de aberraciones cromosómicas generada por el programa ICSN2matrix converter de www.progenetix.com. En la columna A se muestran las bandas citogenéticas con una resolución de 862 bandas, en las columnas siguientes se enumeran las alteraciones detectadas en cada caso, identificando las ganancias de DNA con el número 1, las pérdidas con -1 y las amplificaciones con el número 2.

Construcción de la base de datos para HGCm

Utilizando las herramientas disponibles en la base de datos de HGC Progenetix (<http://www.progenetix.net/>), se construyó una base de datos de alteraciones cromosómicas detectadas por HGCm durante la progresión del CaCu. Nuestra base de datos contiene 326 casos derivados de tejidos cervicales en diferentes estadios de la progresión (8 coilocitosis, 25 neoplasias intraepiteliales grado I (NIC I), 41 NIC II, 48 NIC III, 7 tumores invasores estadio Ia, 16 Ib, 1 IIa, 37 IIb, 1 IIIa, 36 IIIb, 8 IVa, 1 IVb, 96 muestras invasoras donde no se especifica el estadio clínico y la línea HeLa, derivada de un adenocarcinoma). Una vez construida, el programa ISCN2 Matrix Converter, generó una “matriz de aberraciones”, donde se determinan las alteraciones cromosómicas en cada caso con un código que identifica las ganancias de DNA con el número 1, las amplificaciones de alto número de copias con el número 2 y las deleciones con -1. Esta matriz de aberraciones puede después ser analizada con otros programas de minado de datos, tales como el Cluster y el TreeView para determinar las regiones citogenéticas más alteradas en el conjunto de datos (Figura 21).

Construcción de “onco-árboles” para el estudio de la progresión del CaCu

Con la finalidad de aplicar un análisis estadístico para determinar la secuencia de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CACU, se utilizó el programa de análisis de datos derivados de HGCm denominado Oncotrees (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Schaffer/cgh.html>). Este programa está diseñado para llevar a cabo una serie de análisis estadísticos para inferir, en base a los patrones de pérdida o ganancia de DNA, cuáles son las regiones cromosómicas que sufren alteraciones en etapas tempranas de la progresión y cuáles son las alteraciones cromosómicas que surgen en etapas posteriores. Dada una lista de alteraciones presentes en los casos analizados, se supone que estos eventos llevan una secuencia de

aparición desconocida, es decir, que dentro del conjunto de datos, se infiere la existencia de un orden secuencial en los eventos de alteración, pero este orden no es evidente a simple vista. La existencia de correlación estadística entre dos eventos de alteración citogenética, sugeriría que estos eventos no suceden de forma azarosa, sino que aparecen siguiendo un flujo desconocido de casualidad. Por ejemplo, si se detecta una correlación entre dos alteraciones podría sugerirse que la aparición de una alteración incrementará la posibilidad de aparición de otras alteraciones, y que en algunas ocasiones, se presentará una relación directa entre la primera alteración y la siguiente, mientras que en los casos donde no existe correlación estadística, se puede sugerir que las alteraciones secundarias se presentarán debido a la inestabilidad genómica inherente a la célula tumoral (69).

El programa Oncotrees produce un árbol en donde se determina esta secuencia de eventos. En una primera etapa, el programa utiliza un método estadístico para definir cuales de las alteraciones presentes en los casos representan observaciones que no se deben al azar, para esto toma en cuenta las probabilidades que tiene cada banda citogenética o cada brazo cromosómico de sufrir una alteración en base a su tamaño (70). Una vez definidas las alteraciones no debidas al azar, el programa analiza la distancia relativa entre cada alteración y la raíz del árbol, que en este caso constituye una célula normal sin ninguna alteración. De esta forma se crea una matriz de distancias, con la cual se alimenta un programa de análisis de matrices, como los contenidos en el paquete de programas de análisis filogenético Phylip (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phytip-uk.html>). Estos programas generarán un árbol que identifica en base a sus distancias en relación a la raíz, y una predicción acerca de cuales alteraciones se presentan en etapas iniciales del tumor y cuales se relacionan con la progresión del mismo. Asimismo, define relaciones causales entre

alteraciones tempranas y tardías. Para obtener una versión gráfica de este árbol basado en las distancias, la matriz generada por Oncotrees es alimentada en el programa de árboles filogenéticos TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). Finalmente, para obtener la secuencia de eventos más probable, se lleva a cabo otro análisis matemático que ajustará las observaciones y el árbol mediante la aplicación de un algoritmo matemático para generar un árbol cuyas ramas constituirán la secuencia de alteraciones citogenéticas más probable para el grupo de datos analizados.

Análisis bioinformático de los posibles efectos de los cambios en el número de copias de DNA sobre diversos procesos celulares

Una vez identificados los patrones de alteraciones cromosómicas en CaCu, el análisis de los genes y de las rutas metabólicas posiblemente afectadas debido al cambio en el número de copias de DNA, se llevó a cabo utilizando diversas herramientas de análisis derivadas del proyecto del genoma humano. La tabla “UniGene_2”, que contiene 115,693 registros de genes agrupados en la base de datos UniGene, distribuidos a lo largo de todo el genoma humano, así como la tabla “KnownGene”, que contiene los datos referentes a 43232 genes conocidos mapeados sobre el genoma, fueron obtenida a través de la página del navegador del genoma humano de la Universidad de California en Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgText>). Una vez obtenida esta información, se utilizaron las herramientas disponibles en la página SOURCE de la Universidad de Stanford (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>) para identificar la posición citogenética de cada gen. SOURCE es una herramienta de unificación que de forma dinámica colecta datos derivados de diversas bases de datos científicas y que compila la información genética y de biología molecular disponible acerca de los genes y de los genomas de diversas especies, incluido el ser humano. Utilizando el motor de búsqueda de esta página (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi->

[bin/source/sourceBatchSearch](#)) se llevó a cabo el mapeo de los datos previamente descritos, para identificar su localización citogenética, el nombre e información acerca de las funciones conocidas de cada gen. En base a los patrones de pérdida y ganancia observados mediante HGCm, se asignó un valor a los genes ubicados en las regiones con amplificaciones (valor 1) y deleciones (valor -1).

Una vez construida esta base de datos, se analizó con el programa GenMapp (<http://www.genmapp.org/>) el cual originalmente se diseñó para análisis de microarreglos de expresión. Este programa permite catalogar a los genes presentes en una base de datos en diversas funciones biológicas, tomando como base la “ontología” de cada gen. El proyecto de ontología génica constituye un esfuerzo por estandarizar las descripciones de los nombres y funciones de los genes en diferentes bases de datos, unificándolos en tres vocabularios (ontologías) controlados y estructurados, que describen a cada producto génico en términos de su asociación a sus procesos biológicos asociados, a sus funciones moleculares o al componente celular al que pertenecen. Finalmente el programa MappFinder, incluido en GenMapp, llevó a cabo un análisis para definir cuales grupos funcionales son los que se ven mas alterados en el conjunto de los datos.

RESULTADOS

Con la finalidad de determinar el papel que juegan las alteraciones cromosómicas durante la progresión del carcinoma cérvico uterino, llevamos a cabo experimentos de hibridación genómica comparativa sobre cromosomas en metafase para determinar el patrón de desbalances cromosómicos específico en este tipo de neoplasia. Una vez determinado este patrón de alteraciones y con la finalidad de determinar la secuencia de eventos genéticos durante la progresión tumoral, creamos una base de datos que contiene información de pérdidas y ganancias de material genético durante diferentes etapas de la progresión neoplásica. Esta base de datos fue analizada utilizando diversos métodos bioinformáticos para determinar las alteraciones genéticas más relevantes durante la progresión tumoral, así como para determinar la secuencia de eventos genéticos durante el proceso de carcinogénesis en el epitelio cervical humano. Finalmente, llevamos a cabo experimentos de HGC sobre microarreglos para definir genes particulares que estuvieran involucrados en los fenómenos de pérdida o ganancia de material genético en carcinoma cérvico uterino.

Desbalances cromosómicos en carcinoma cérvico uterino

Una vez establecida la tecnología de HGC, esta se aplicó al estudio de las alteraciones cromosómicas en CaCu. En total se analizaron 60 muestras derivadas de tejidos cervicales (20 tumores invasores y 20 líneas celulares) mediante HGC sobre cromosomas en metafase y 20 muestras mediante HGC sobre microarreglos, detectándose un patrón específico de alteraciones cromosómicas asociado a esta neoplasia.

Extracción del DNA

La figura 23 muestra ejemplos representativos de la calidad del DNA purificado a partir de los tejidos incluidos en parafina, comparados con DNA genómico obtenido a partir de un cultivo de las células Caski

Tipificación de VPH

Las tablas I y II de la sección de material y métodos presentan los datos de presencia de VPH en los tejidos analizados. La figura 24 muestra una región de la secuencia del gen E6 que se utilizó para identificar el tipo viral, proveniente de uno de los tejidos incluidos en parafina positivos para VPH16. Como se esperaba, las líneas Casky y SiHa fueron positivas para VPH16, este mismo tipo viral fue detectado en 16 tumores invasores. El VPH tipo 18 se detectó en 20 muestras (17 líneas celulares y 3 tejidos invasores), el tipo 31 se detectó en una lesión pre-maligna, el tipo 33 en otra, el tipo 58 se presentó en un tumor invasor y en la lesión pre-maligna restante. En cuatro casos se detectaron coinfecciones de los tipos 16 y 18, en cinco casos no fue posible detectar DNA viral con los iniciadores utilizados y en tres casos no fue posible determinar el tipo viral ya que todo el DNA obtenido de estas muestras se utilizó para los experimentos de HGC.

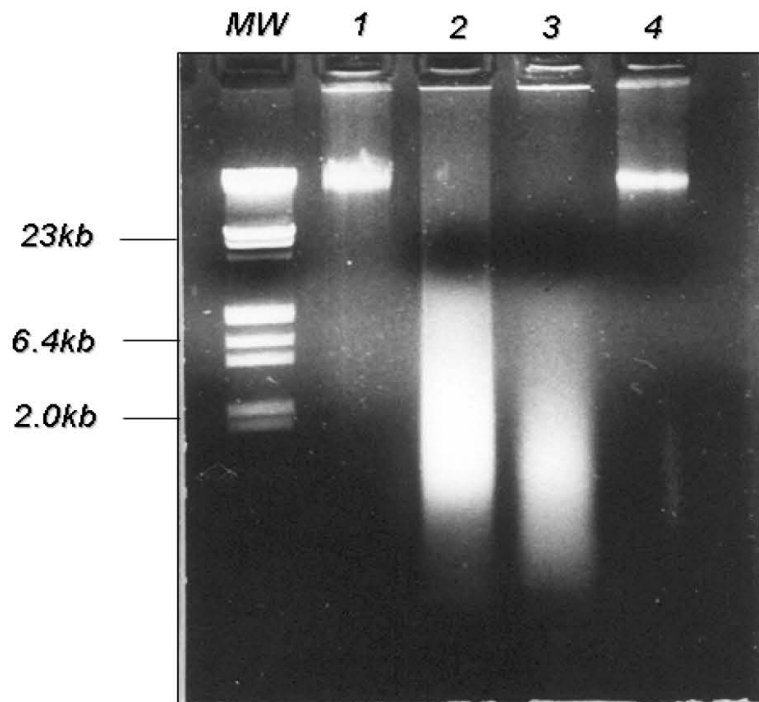


Figura 23
Ejemplos de DNA purificado a partir de cultivos de líneas celulares (carriles 1 y 4) y de tejidos incluidos en parafina (carriles 2 y 3). MW, marcador de peso molecular.

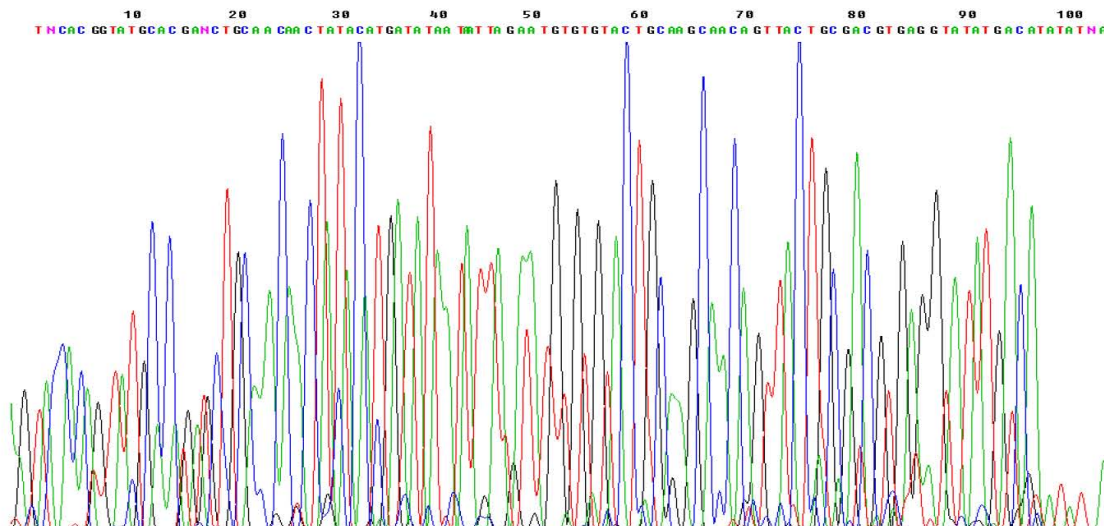


Figura 24
Ejemplo del resultado de la secuenciación del fragmento de PCR del gen E6 del virus de papiloma humano, la secuencia fue después comparada con el algoritmo BLAST para determinar el tipo viral.

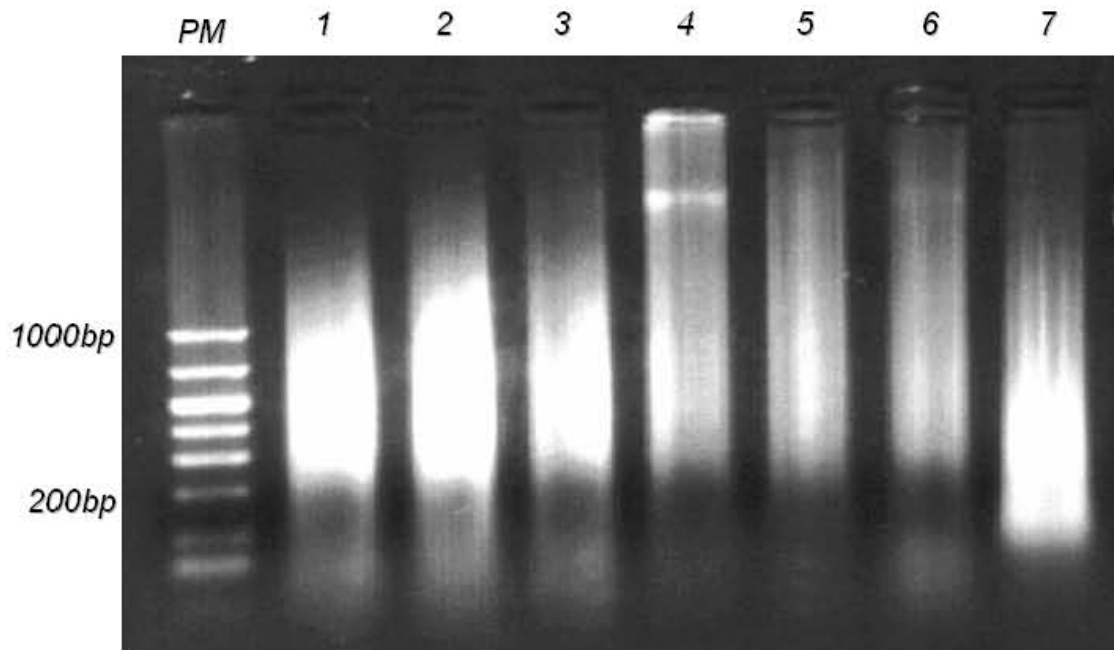


Figura 25
 Resultado del marcaje de las sondas para HGC. Los carriles 1, 2, 3 y 7 muestran ya el tamaño adecuado para la hibridación. Las muestras de los carriles 4-6 tuvieron que ser marcadas por un tiempo más prolongado.

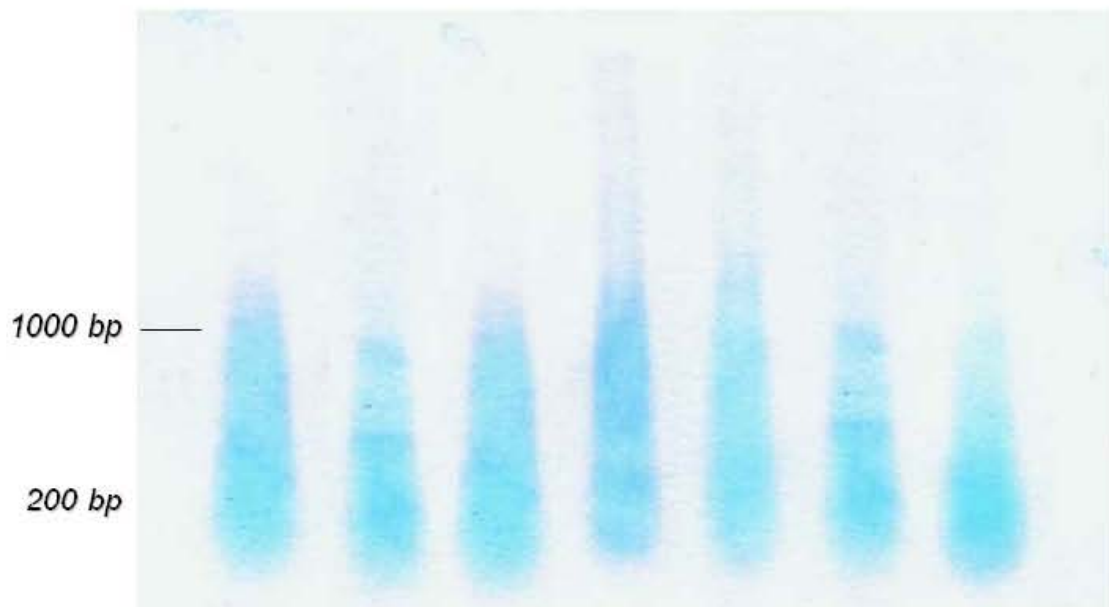


Figura 26
 Transferencia de las sondas marcadas a una membrana de nylon para comprobar que los fragmentos de DNA de las sondas se están marcando adecuadamente.

Marcaje de las sondas para HGCm

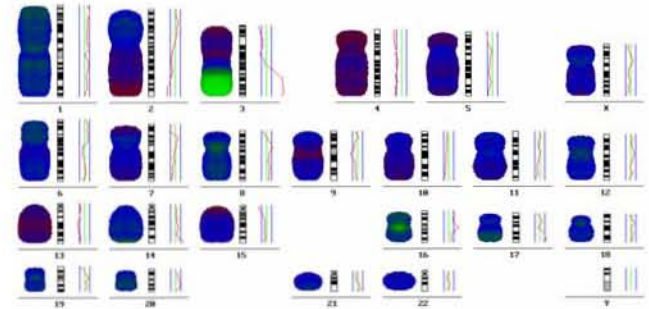
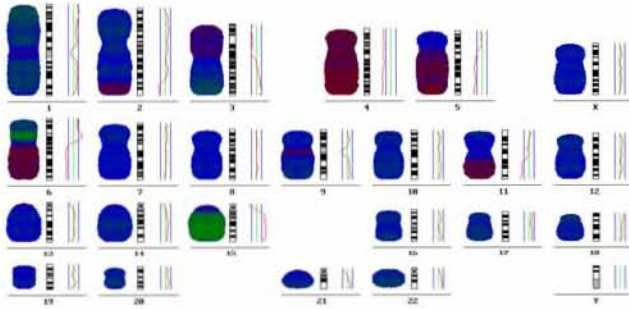
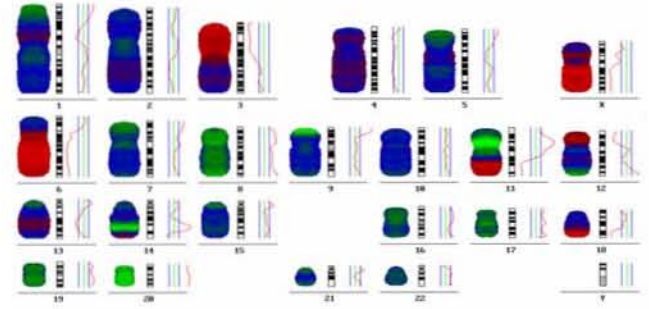
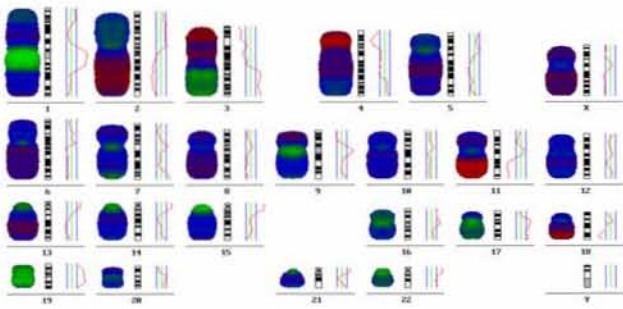
La figura 25 muestra resultados de una reacción típica de marcaje, mostrando algunas de las sonda que han alcanzado ya el rango de tamaño adecuado para la hibridación, dentro del rango de 200 a 2000 pares de bases (carriles 1, 2, 3, 7) y sondas que requirieron un mayor tiempo de incubación (carriles 4, 5, 6). El tamaño promedio de la sonda es un parámetro muy importante para el éxito del experimento, ya que sondas de un tamaño superior a este rango, no podrán difundirse de manera adecuada en la solución de hibridación dificultándose la interacción de la sonda con su secuencia blanco sobre los cromosomas y generando acúmulos inespecíficos de sonda. Por otro lado, si el tamaño de la sonda es inferior a los 200 pb, la hibridación también resultará inespecífica, por lo que al llevar a cabo los lavados de astringencia post-hibridación, la mayor parte de la sonda será eliminada.

La figura 26 muestra el resultado de la transferencia de las sondas a la membrana de nylon, demostrando la incorporación de la marca en la sonda.

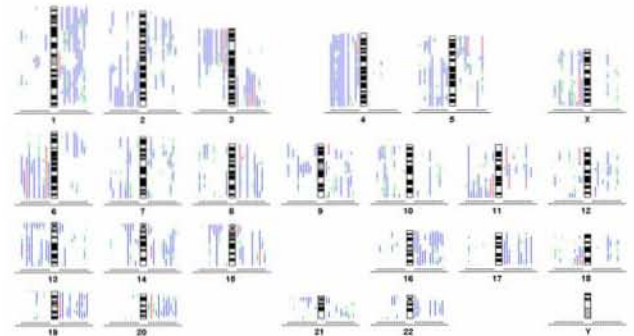
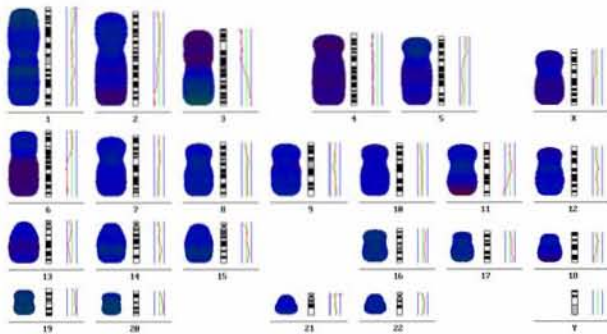
La figura 27 muestra ejemplos de los resultados obtenidos en los 24 casos analizados mediante HGC sobre cromosomas en metafase que se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Iver Petersen, del Laboratorio de Patología Molecular del Hospital Universitario Charité en Berlín, Alemania. Los resultados de estos experimentos se reportan en el artículo anexo número 4.

Todos los casos de este grupo presentaron alteraciones cromosómicas, siendo los tumores avanzados los que más alteraciones presentaron. La más alta frecuencia de alteración se detectó para el cromosoma 3p24, estando presente en 20 casos de 24 (83%), seguido de ganancias en 3q y deleciones en 2q34-q36 en 19 casos (79%). El histograma de los 24 casos analizados en Alemania se presenta en la figura 28A.

Cuando analizamos los casos positivos para VPH18, se detectó un grupo de alteraciones que se presentaba en más del 90% de las muestras (Fig 28B), tales como ganancias de DNA en 1q31-q32, 3q22-q26.3, 5p14, 6p21.3-p22 y 7p13-p14, así como pérdidas en 2q33-qter, 3p12-p14 y 6q27. Adicionalmente, el histograma presentó picos en la curva de incidencia en 8q24.2, 12q13 y 18q21-q22. Los resultados de este grupo de experimentos se reportaron en la publicación anexa número 4.

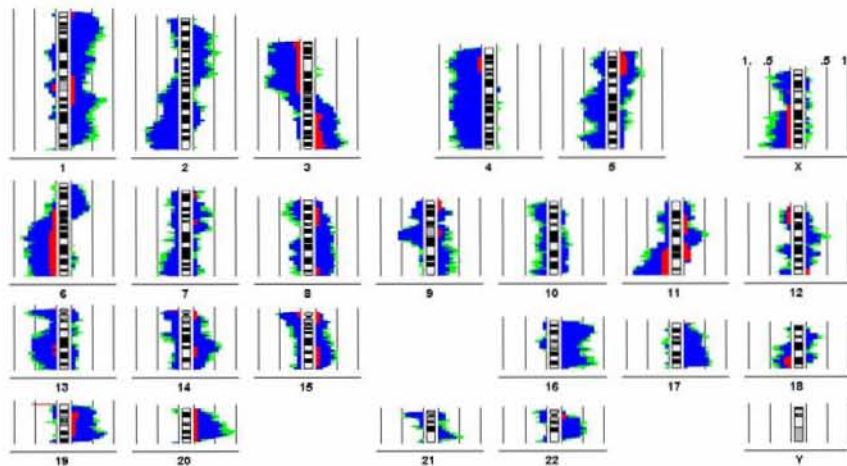


Ejemplos de resultados de HGC sobre cromosomas en metafase en cuatro tumores primarios invasores del cérvix uterino

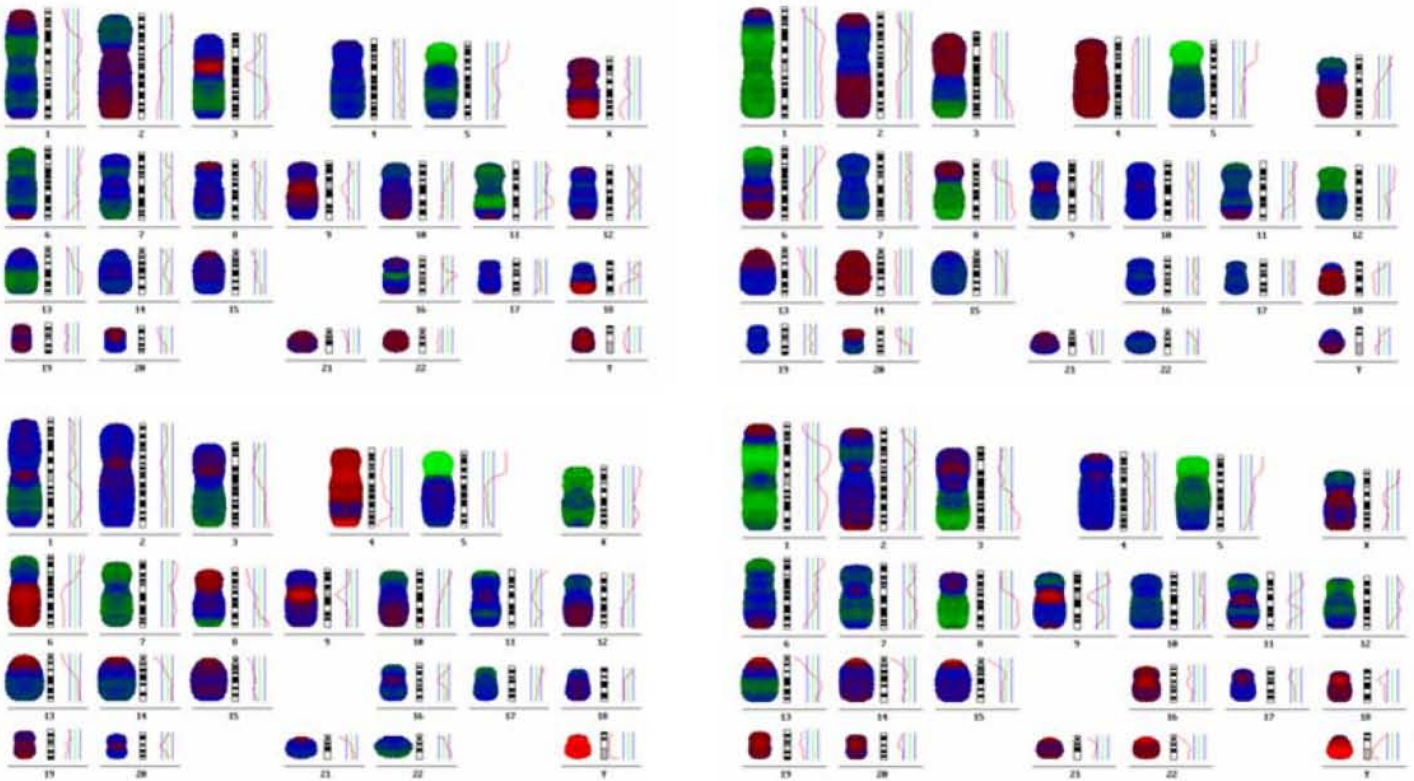


Super cariograma de 12 tumores primarios

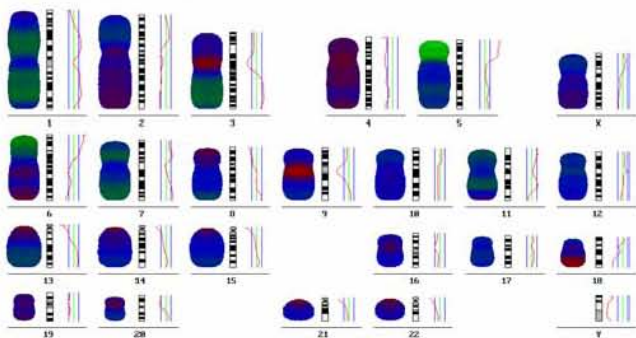
Gráfica de líneas que muestra las alteraciones detectadas en los 12 tumores



Histograma que presenta la incidencia de las alteraciones presentes en los 12 tumores invasores analizados en la publicación del anexo 4



Ejemplos de resultados de HGC sobre cromosomas en metafase en cuatro líneas celulares derivadas de tumores invasores del cérvix uterino



Super cariograma de 12 líneas celulares

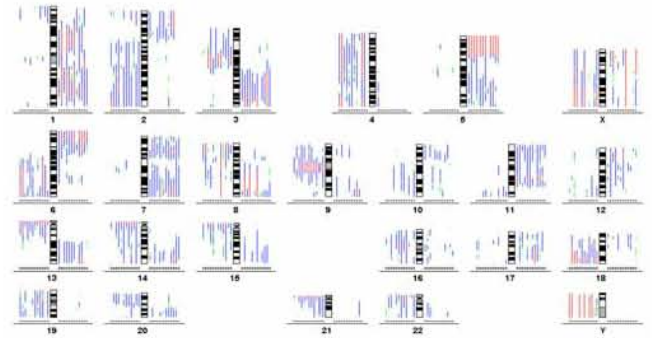
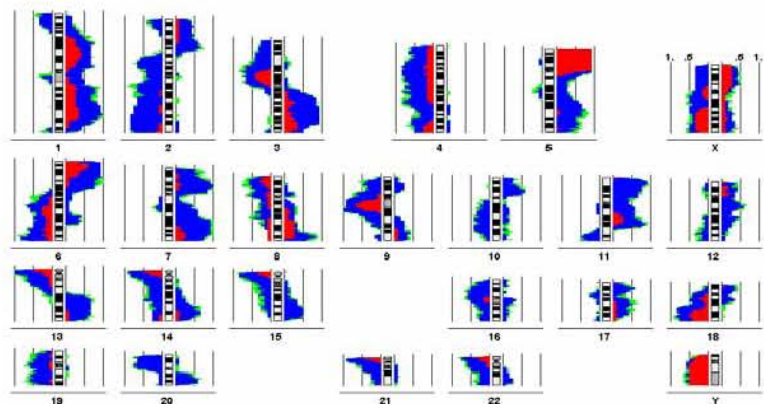
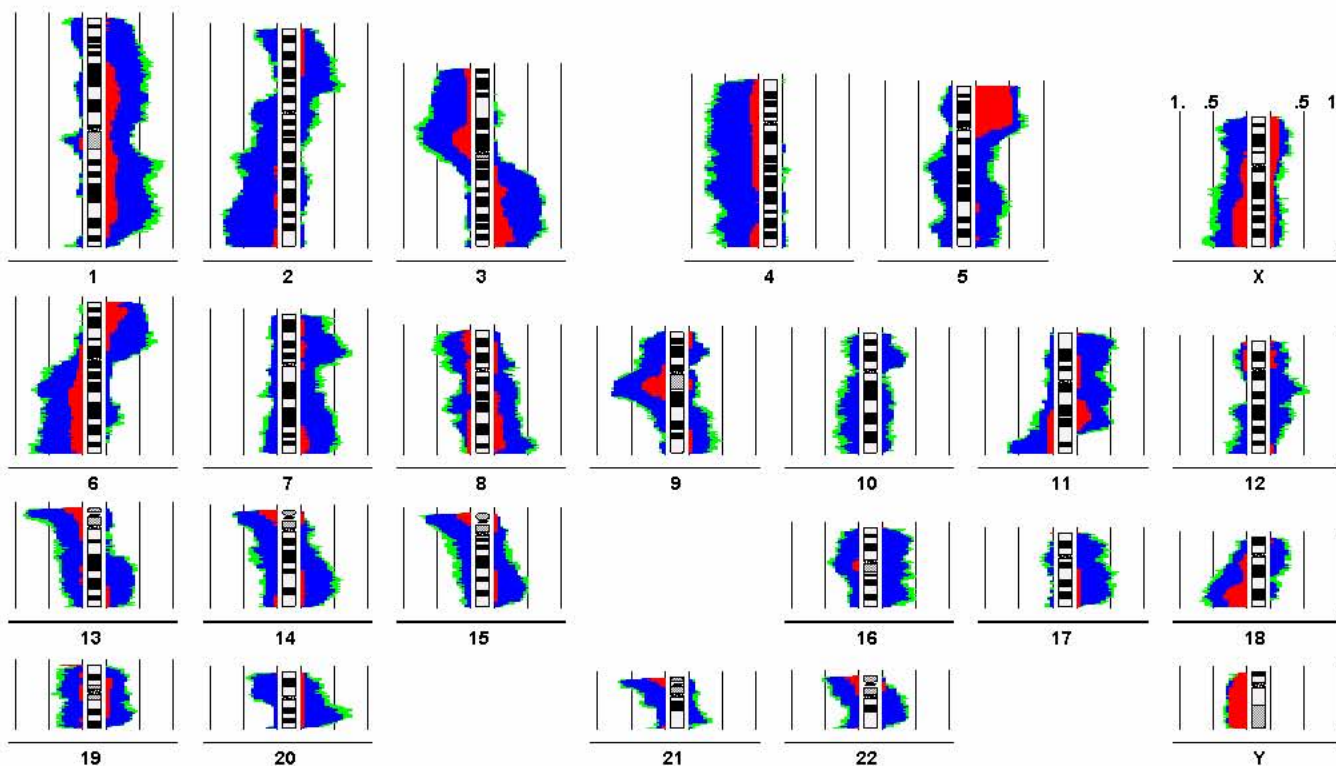


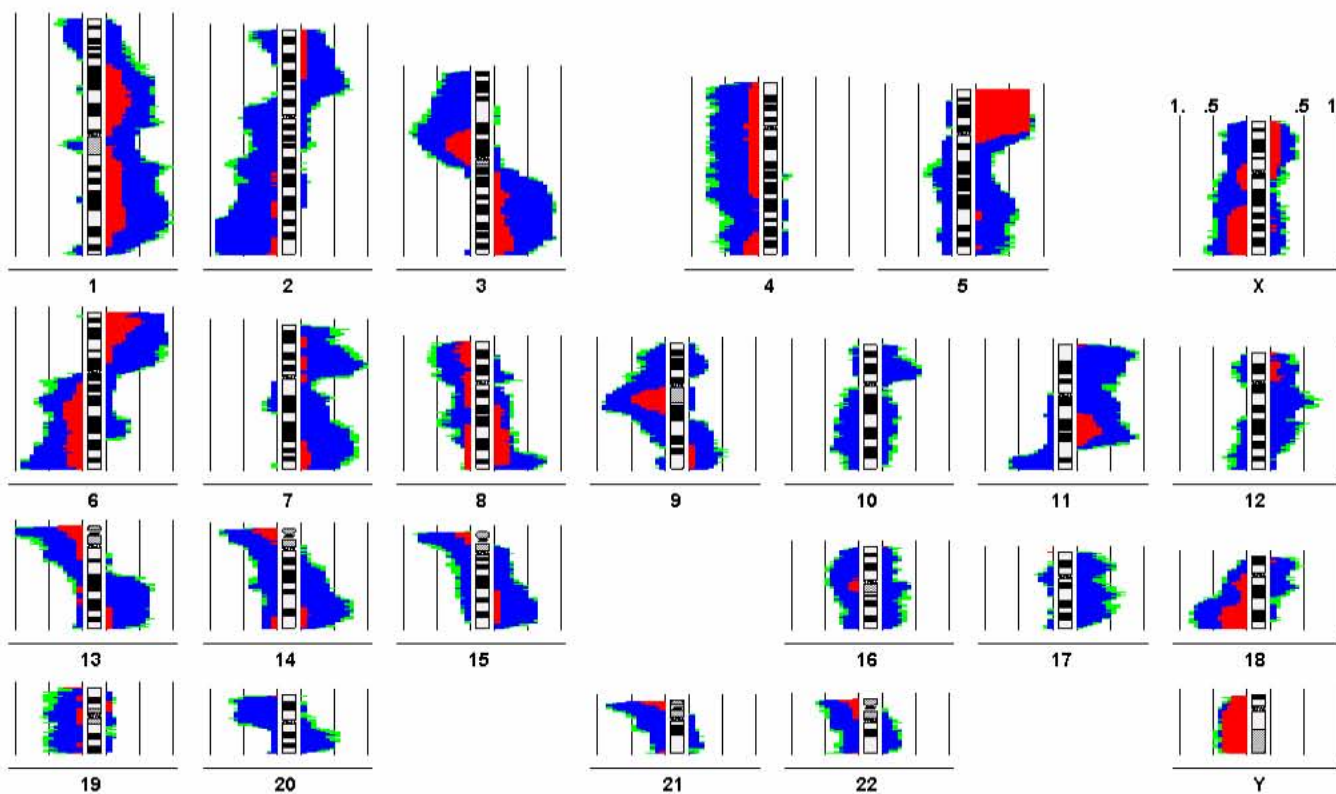
Diagrama de líneas que muestra las alteraciones en las 12 líneas celulares



Histograma que muestra la incidencia de las alteraciones presentes en los 12 líneas celulares analizadas en la publicación del anexo 4



Histograma A. Incidencia de las alteraciones detectadas en las 24 muestras derivadas de CaCu analizadas (12 tumores primarios y 12 líneas celulares) en la publicación anexa 4.



Histograma B. Incidencia de las alteraciones detectadas en los casos positivos exclusivamente para VPH18 (3 tumores y 11 líneas celulares)

Figura 28. El histograma superior (A) representa 24 muestras derivadas de CaCu, el histograma inferior (B), presenta los casos que fueron positivos para VPH 18 (3 tumores y 11 líneas). Algunas regiones cromosómicas presentan alteraciones en más del 85% de los casos, lo que sugiere una posible relación entre estas alteraciones y la infección con este tipo viral.

Posteriormente, una vez transferido y establecido el método en el laboratorio de Oncología Genómica del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, continuamos la caracterización de un mayor número de muestras derivadas de pacientes mexicanas. En nuestro laboratorio hemos analizado un total de 16 casos mediante HGCm. Estos casos incluyen las líneas celulares establecidas en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza por el grupo del Dr. Alberto Monroy, (CALO, ROVA, INBL, VIPA). Estas líneas celulares han sido previamente utilizadas por el grupo del Dr. Monroy para llevar a cabo estudios acerca de los patrones de crecimiento dependientes de densidad celular (65) y en la identificación de péptidos presentados por los antígenos de HLA en estas células (66). Actualmente estas células no han sido caracterizadas en lo que se refiere al número de copias de DNA de VPH presentes en su genoma, a la tasa de expresión de las oncoproteínas virales o a los sitios de integración del genoma viral. El patrón de HGC de cuatro de estas líneas por lo tanto constituye un primer esfuerzo hacia la caracterización genómica de estas líneas celulares. La similitud de los patrones de alteraciones cromosómicas detectados en estas líneas con aquellos detectados en tumores primarios del cérvix uterino, indican que constituyen buenos modelos para el estudio de la carcinogénesis cervical. Los hallazgos referentes a las alteraciones cromosómicas en estas líneas se reporta en la publicación anexa número 5.

En estas cuatro líneas identificamos como alteraciones más comunes las ganancias en 1q23-q32, 3q11.2-q13.1, 3q22-q26.1, 5p15.1-p11.2, 7p15-p13, 7q21, 7q31, 11q21 y 12q12, así como pérdidas en 2q35-qter, 4p16, 6q26-qter, 9q34 y 19q13.2-qter. Los

patrones de HGC de cada línea, así como la gráfica que indica los desbalances cromosómicos detectados en estas cuatro líneas celulares se presentan en la figura 29.

Además de las líneas, hemos analizado otras 16 muestras de CaCu adicionales, detectándose un patrón de alteraciones cromosómicas semejante al previamente descrito.

Las alteraciones detectadas en estas muestras se presentan en la figura 30

Sumario de los hallazgos en los 40 casos analizados mediante HGC sobre cromosomas en metafase

Los 40 casos descritos fueron compilados en una base de datos y analizados con el programa ICSN2 matrix converter de Progenetix, el cual generó los histogramas de la figura 31, que presentan el patrón de HGCm de estas 40 muestras derivadas de CaCu, el histograma de las líneas celulares y el histograma de los tumores invasores. El análisis de la matriz de aberraciones identificó un número promedio de alteraciones cromosómicas por caso (No. Total de bandas citogenéticas alteradas / no. de casos) de 231.8 bandas alteradas por caso, presentándose desde 9 bandas alteradas en el tumor M-07, hasta 460 bandas alteradas en el tumor M-02. En promedio se detectó un número similar de deleciones que de amplificaciones por caso (125.9 VS 105.8 bandas alteradas por caso, respectivamente). Las alteraciones más comúnmente detectadas fueron la amplificación del brazo largo del cromosoma 3, particularmente la región 3q25, amplificada en el 67.5% (27/40) de los casos, seguido de amplificaciones en 5p, particularmente en la región 5p12, presente en el 60% (24/40) de los casos; pérdidas en 2q35-q37, particularmente en 2q37 en el 60% (24/40) de los casos y deleciones en 4p16, 57.5% (23/40) casos.

Diferencias entre las líneas celulares y los tumores invasores

A pesar de presentar un patrón de alteraciones cromosómicas similar, las líneas celulares mostraron en promedio un mayor número de alteraciones que los tumores invasores (297 VS 166.5). Las alteraciones detectadas en las líneas celulares fueron, ganancias de 5p12-

p15, en el 90% de los casos (18/20), 1q32 y 3q24-q25 y pérdida de 6q27 en el 80% de los casos. La región 2q36-q37 se perdió en el 70% de las líneas. En el caso de los tumores invasores la región más frecuentemente alterada fue 4p16, que sufrió pérdidas en el 60% de los tumores, seguido de amplificaciones en 3q29-q26, así como 3q29, en el 55% (11/2) de los casos, seguido de pérdidas en 2q37 en 50% y ganancias en 5p12 en 30% de los casos. Las principales diferencias entre las líneas celulares y los tumores primarios son una mayor prevalencia de amplificaciones de diversas cromosomas, tales como el cromosoma 1, el 3, 5p, 6p, 7, 11, 13 y 14, así como una mayor prevalencia de deleciones en las regiones 2qtel, 6qtel, 8ptel, 9, 18, 19 y 20.

Las diferencias entre los tumores primarios y las líneas celulares pueden tener su origen en diversas razones. Los tumores primarios representan una mezcla de tipos celulares, en donde además de las células tumorales encontramos células inflamatorias, linfocitos infiltrantes y estroma normal, por lo que el porcentaje de células tumorales puras se disminuye cuando lo comparamos con las líneas celulares, que constituyen linajes de células tumorales puros donde las alteraciones se presentan de manera clonal, por lo que son más fácilmente detectables en el análisis. A pesar de lo anterior, la contaminación con células normales fue eliminada en su mayor parte gracias a la microdissección del corte de tejido incluido en parafina. Por otro lado, la heterogeneidad intratumoral constituye otro factor que modificaría la incidencia de algunas alteraciones entre los tejidos primarios y las líneas celulares, por el hecho de que el tumor sólido puede estar constituido por diversas clonas de células transformadas, mientras que los cultivos celulares representan en su mayoría líneas con un origen clonal único.

Por otro lado, la calidad del DNA obtenido a partir de tejido incluido en parafina, comparado con el DNA obtenido a partir de las líneas celulares podría estar representando un factor que indujera las diferencias detectadas, ya que la integridad del

DNA de las líneas celulares siempre será superior al que se obtenga a partir de los tejidos fijados e incluidos en parafina. Sin embargo, ya que solamente tomamos en cuenta para estos resultados reacciones de hibridación de alta calidad (amplio rango dinámico entre la señal de las sondas contra el fondo, señal sin evidencia de acúmulos inespecíficos de sonda, bloqueo adecuado de las regiones altamente repetitivas), comparables con los obtenidos utilizando el DNA de células viables, estamos convencidos de que este factor no tuvo una influencia significativa en las diferencias de número o en el tipo de alteraciones detectadas en las líneas celulares comparadas con los tejidos primarios.

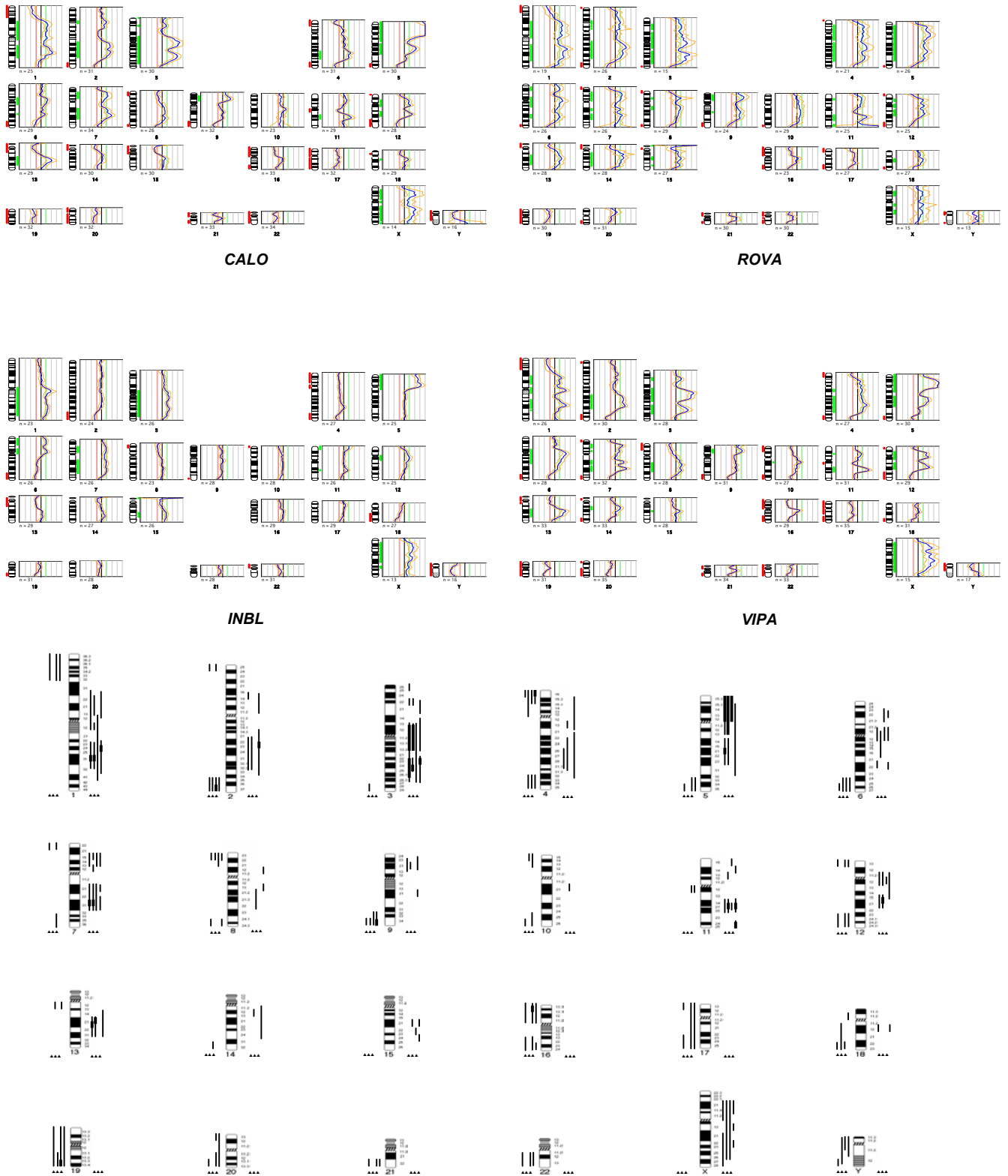


Figura 29. Patrones de HGCm y gráfica de líneas que muestra las alteraciones cromosómicas detectadas en cuatro líneas celulares nuevas establecidas a partir de tumores cervicales invasores de pacientes mexicanas.

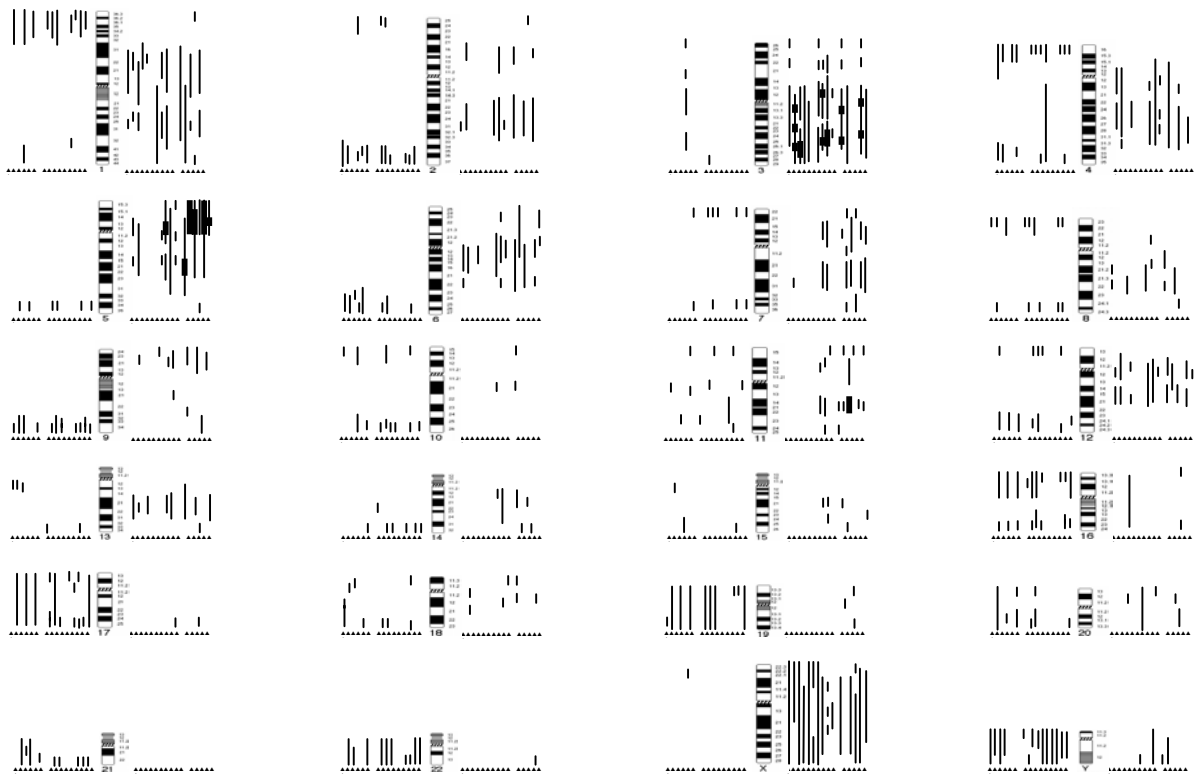


Figura 30. Alteraciones cromosómicas en 16 casos de CaCu

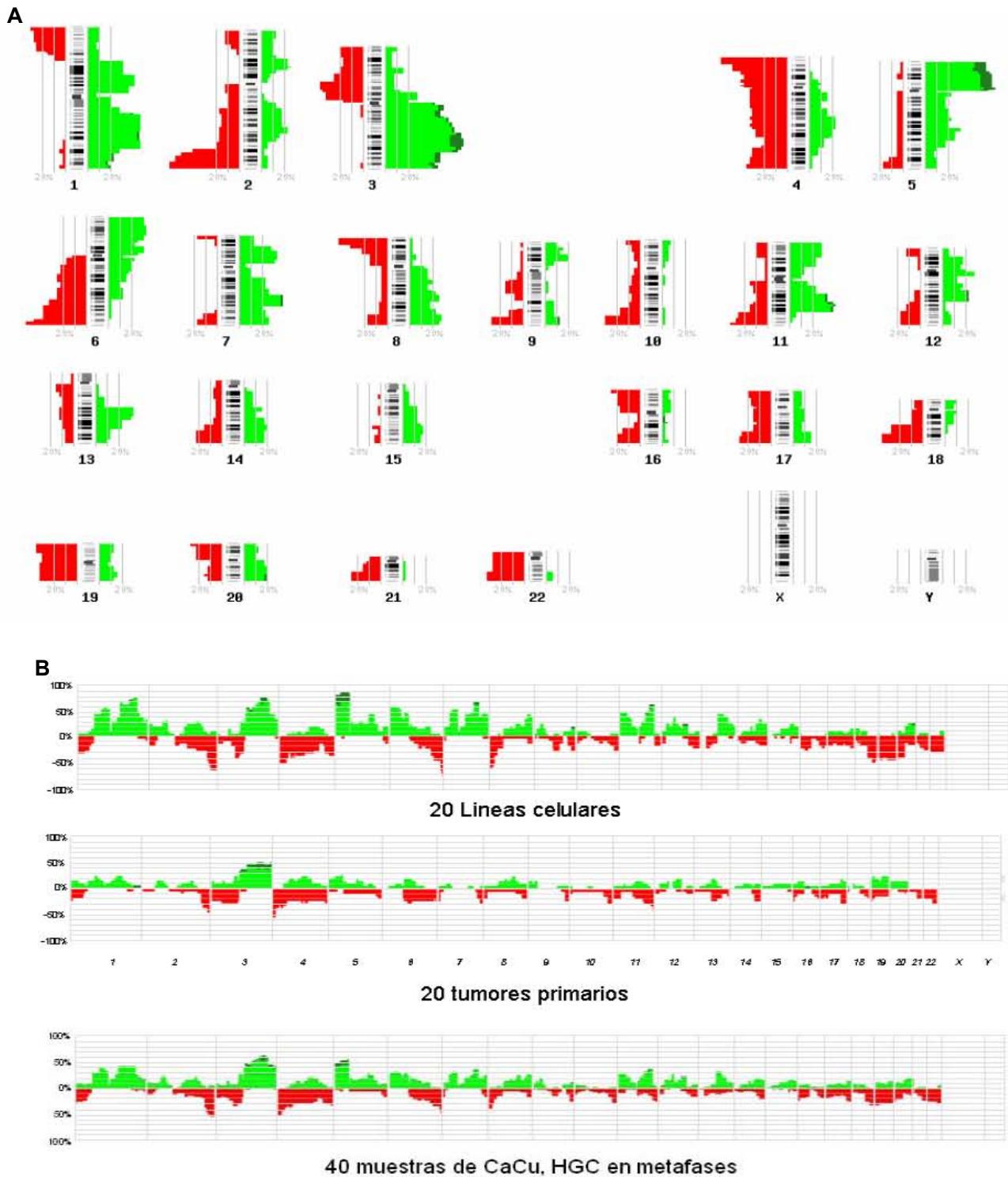


Figura 31

Desbalances cromosómicos detectados en 40 muestras derivadas de tejidos cervicales mediante HGCm. A) El histograma representa las alteraciones en 40 muestras, la curva de incidencia a la izquierda de los ideogramas (rojo), representa pérdidas de DNA, la curva a la derecha (verde), representa ganancias. B) Histogramas de 20 tumores primarios, 20 líneas celulares y las 40 muestras, las líneas verticales dividen cada uno de los cromosomas (1-22, X,Y). Los números a la izquierda de la gráfica representan porcentajes. Las alteraciones más prevalentes fueron la ganancia de los cromosomas 1, 3q y 5p así como pérdidas en los cromosomas 2q 4 y 6q.

HGC sobre microarreglos

La figura 32 muestra un ejemplo del resultado de un experimento de μ HGC. En este grupo de muestras una lesión pre-maligna (neoplasia intraepitelial cervical grado 3, NIC-III), no presentó alteraciones cromosómicas, las otras dos lesiones pre-malignas (NIC-III y NIC-I) presentaron 3 alteraciones en cada caso. En el caso de los tumores invasores y las líneas celulares, en todos los casos se detectaron alteraciones, desde 1/287 (alteraciones/blancos totales en el arreglo) en un tumor invasor grado Ib, hasta 174/287 alteraciones en la línea celular RoVa. En el conjunto de muestras, en promedio el número de amplificaciones casi dobló al de deleciones (28.25 VS 15.4) y el número promedio de alteraciones (NPA= número total de alteraciones en todas las muestras / número total de casos) fue de 43.65 alteraciones por caso. Existen todavía pocos reportes en la literatura internacional que hayan utilizado este sistema de microarreglos de CGH (GenoSensor Array 300), lo que hace un poco difícil hacer comparaciones directas con otras neoplasias. En este sentido, mencionaremos algunos resultados derivados del análisis de glioblastomas. El glioblastoma constituye la forma más común y agresiva de los tumores cerebrales, es un tumor altamente maligno, infiltra el cerebro de forma extensiva y puede convertirse en una masa tumoral muy grande antes de ser sintomático. El análisis de estos tumores con el microarreglo de HGC que utilizamos en esta tesis, ha identificado que en los glioblastomas de grado III el número promedio de alteraciones cromosómicas fue de 9 por caso, mientras que en los grado IV fue de 13.3 alteraciones por caso (71). El número promedio de alteraciones cromosómicas que detectamos en los tumores del cérvix uterino, indica que este tipo de tumor presenta un alto grado de inestabilidad cromosómica.

Alteraciones en lesiones pre-malignas.

En las lesiones pre-malignas que presentaron alteraciones, se detectaron amplificaciones en *MSH2-KCNK12* (mutS homolog 2, colon cancer, non polyposis type 1 (*E. coli*) - Potassium channel, subfamily K, member 12, 2p21) y *TCL1A* (T-cell leukemia/lymphoma 1A, 14q32.13) y *TOP1* (Topoisomerase (DNA) 1, 20q12), las cuales fueron encontradas en un caso de NIC-I, asimismo, la amplificación de 4qtel11 (4qtel), *DMBT1* (Deleted in malignant brain tumors 1, 10q25.3) y *ERBB2* (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian), 17q12 se encontraron en un NIC-III.

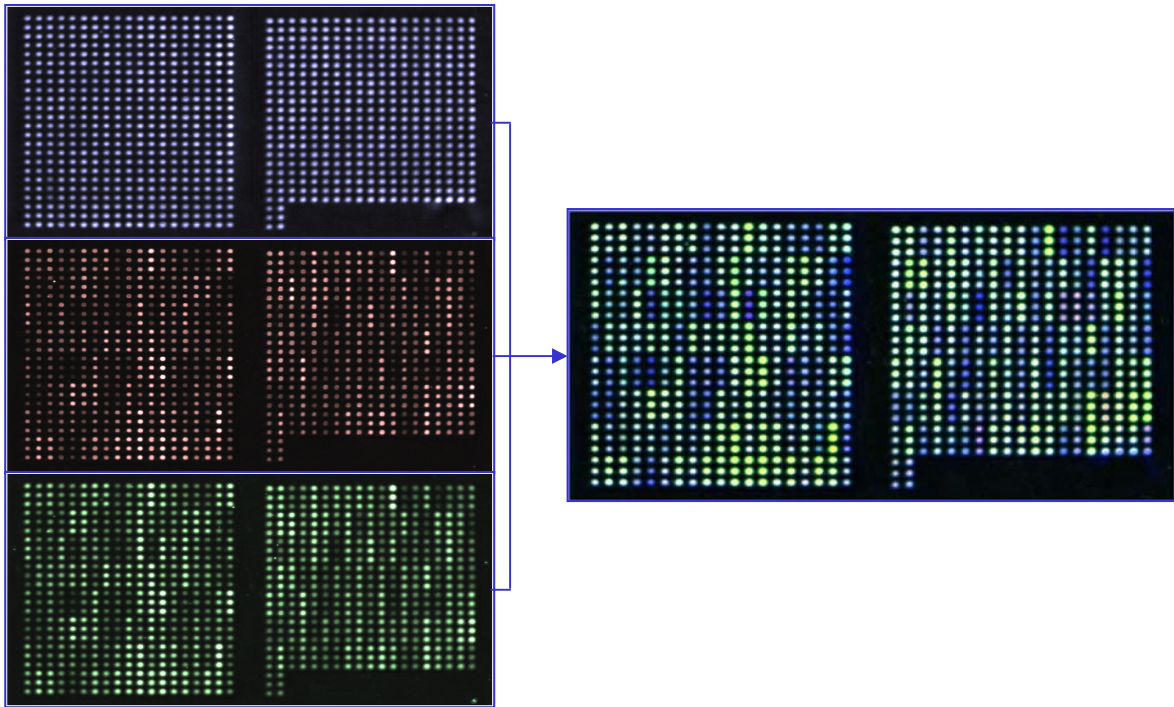
En el conjunto total de las muestras, las alteraciones más comunes se detectaron en el brazo corto del cromosoma 5 y del cromosoma 3, particularmente en las clonas *RBP1-RBP2* (retinol binding protein 1 y 2, 3q21-q22), *Tp63* (Tumor protein 63, 3q27-q29), C84C11/T3 (5ptel), D5S23 (5p15.2) y *DAB2* (disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (*Drosophila*), 5p13), en el 50% (10/20) de las muestras, seguido de amplificaciones en D5S2064 (5p15.2), *EGFR* (Epidermal growth factor receptor, 7p12.3-p12.1), en el 45% (9/20) de las muestras y amplificación de *INS* (Insulina, 11ptel) en el 40% (8/20) de las muestras.

La deleción más común se encontró en la región correspondiente al gen *FHIT* (Fragile histidine triad, 3p14.2), presente en el 40% (8/20) de las muestras, seguido de pérdidas en D1S427-*FAF1* (1p32.3), *KIT* (4q11-q12), *EIF4E* (eukaryotic translation initiation factor 4E, 4q24), D8S504 (8ptel), D9S325 (9qtel), *RB1* (13q14), *CTDP1-SHGC-145820* (18qtel) y DXS7132 (Xq12), presentes en 5/20 (25%) de las muestras. El patrón de alteraciones detectadas mediante el microarreglo de HGC fue consistente con el patrón detectado mediante HGC sobre cromosomas en metafase. A pesar de lo anterior, la limitación del diseño de este sistema es el hecho de que no cubre de manera homogénea la totalidad

del genoma, enfocando el análisis únicamente a regiones particulares que se han visto alterados en cáncer humano. Este hecho hace que todos aquellos genes o regiones no representadas en el arreglo sean pasadas por alto en el análisis. A pesar de lo anterior, la utilidad del sistema resulta innegable, ya que permitió identificar genes específicos involucrados en los eventos de pérdida o ganancia de material genético en las regiones citogenéticas previamente identificadas mediante CGH sobre cromosomas en metafase. Algunos de los genes identificados han sido ya implicados en el CaCu, mientras que otros representan nuevos blancos potenciales para el desarrollo de futuras investigaciones. El papel de cada uno de los blancos génicos identificados se ampliará en la sección de discusión.

El histograma que presenta las alteraciones en el número de copias de DNA presentes en las muestras analizadas mediante μ HGC se presenta en la figura 33.

Figura 32. (Página siguiente) Resultado de un experimento de μ HGC. Las imágenes derivadas de cada fluorocromo se combinan y se evalúa la relación de la fluorescencia tumor (verde)/normal (rojo), para detectar alteraciones en el número de copias. De esta forma se genera una imagen codificada donde se identifican los puntos que sufren deleciones (rojo) o amplificaciones (verde). La gráfica de dispersión compara los valores de fluorescencia entre las dos muestras, mostrando tanto la calidad del experimento, como el grado de alteración de la muestra analizada.



Hibridación normal VS normal

Muestra RoVa, 174 alteraciones

Imagen del arreglo

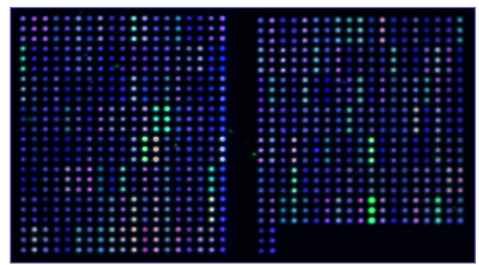
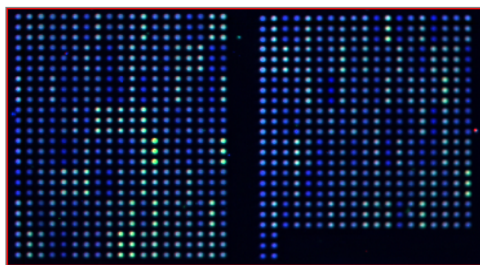
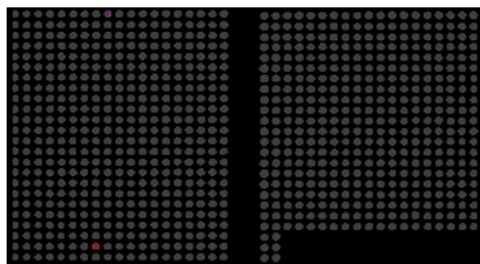
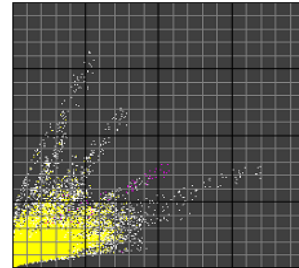
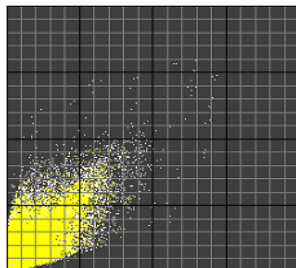


Imagen codificada



Gráfica de dispersión



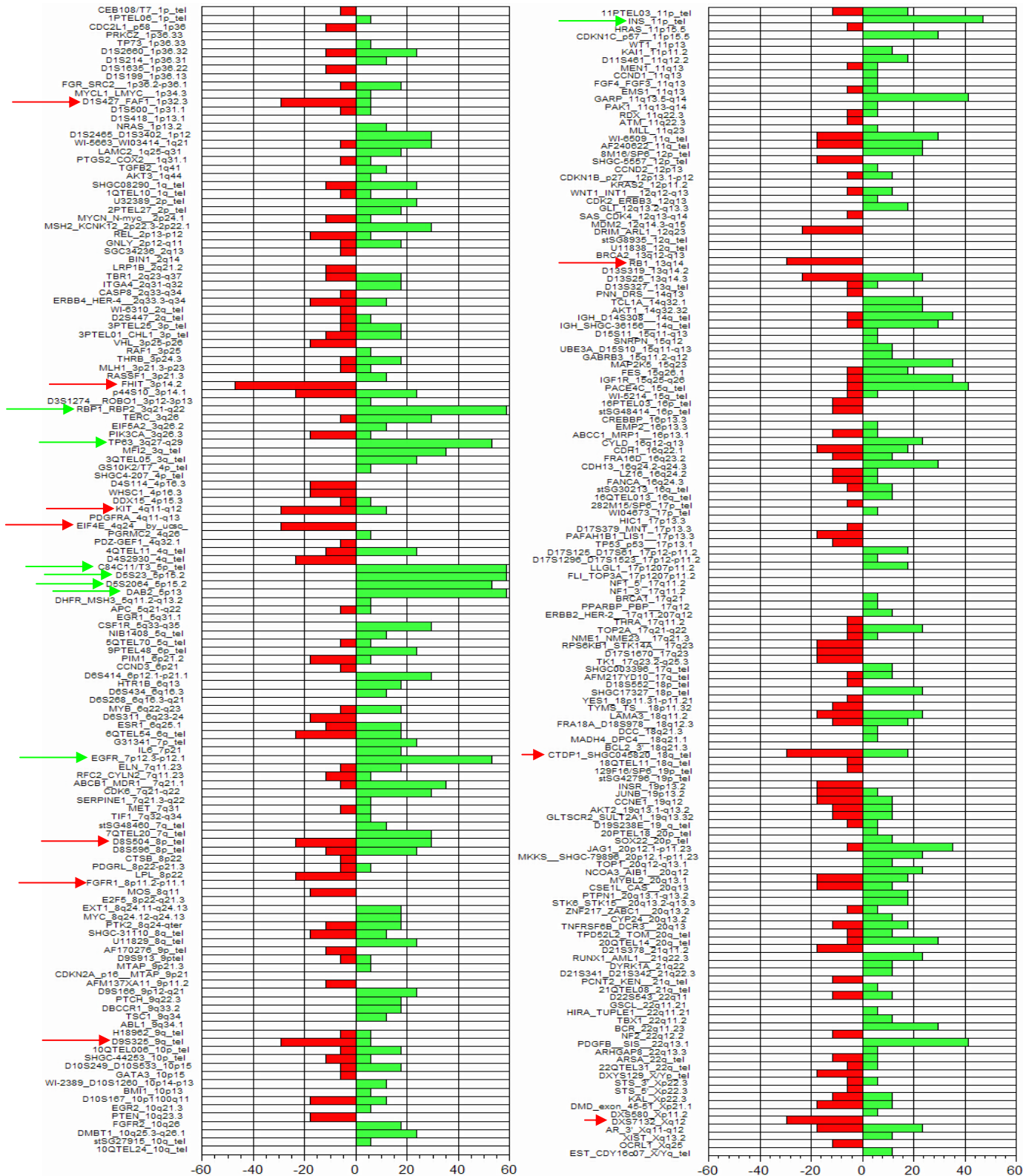


Figura 33. Histograma que presenta la incidencia de alteraciones de cada una de las clonas impresas en el microarreglo de HGC. Las flechas verdes indican clonas amplificadas en mas del 40% de las muestras, las flechas rojas indican las deletadas en mas del 25% de las muestras.

Con la finalidad de analizar la existencia de patrones específicos de alteraciones cromosómicas que estuvieran definiendo características particulares de las muestras, los datos de los microarreglos fueron analizados utilizando métodos de agrupamiento no supervisados. Antes de llevar a cabo este tipo de análisis, es necesario estar seguros de que los datos derivados de diferentes experimentos son estadísticamente comparables o si se requiere algún tipo de proceso de normalización matemática. Para comprobar lo anterior generamos una gráfica de Boxplot para comparar el grado de dispersión de los datos en los diferentes experimentos y determinar si las medianas de los valores de cada experimento estaban centradas en cero. La gráfica generada en el programa "R", que es un lenguaje y un ambiente informático diseñado para llevar a cabo análisis estadísticos y representaciones gráficas (<http://www.r-project.org/>), se muestra en la figura 34, e indica que los datos no requieren normalización. El análisis de agrupamiento jerárquico agrupó las muestras de acuerdo al número total de alteraciones presentes en las muestras, no hubo un agrupamiento en base al tipo de VPH presente en las muestras, lo que sugiere que no existe un patrón específico de alteraciones cromosómicas asociado a tipos de VPH específicos. Una de las ramas del dendrograma agrupó las muestras pre-malignas y un tumor invasor (IIb), con el menor número promedio de alteraciones (NPA=4.5), otra rama se dividió en tres grupos, que incluyeron muestras con un NPA de 34.09 y la rama mas alejada, incluyó las muestras con un promedio de 98.8 alteraciones por caso. En cuanto al agrupamiento de las regiones citogenéticas impresas en el arreglo, se detectaron cinco grupos, como se indica en la figura 35.

Con la finalidad de definir de una forma mas exacta los grupos identificados por el agrupamiento jerárquico y basados en los resultados del mismo, se llevó a cabo un análisis de medias de K, dividiendo los arreglos en 4 grupos y en 5 grupos las regiones impresas en el arreglo y de mapas auto-organizados (SOM), en una matriz de 5 X 5. Las

figuras 36 y 37 muestran los resultados del agrupamiento por medias de K, y SOM mostrando con una mejor definición cada uno de los grupos anteriormente indicados.

El análisis para detectar alteraciones que permitieran identificar diferencias mediante los patrones de pérdida o ganancia de DNA obtenidas por μ HGC a las muestras positivas para VPH 18 de las positivas para VPH 16, identificó 37 clonas que potencialmente podrían estar marcando estas diferencias. Sin embargo, al llevar a cabo el agrupamiento jerárquico de estas 37 clonas, encontramos dos ramas en el dendograma, una conteniendo la mayor parte de las muestras positivas para VPH16, y la otra que contiene a las muestras VPH18 positivas y a dos muestras positivas para VPH16. La figura 38 muestra el agrupamiento de este grupo de datos, indicando las clonas identificadas por el análisis de significancia.

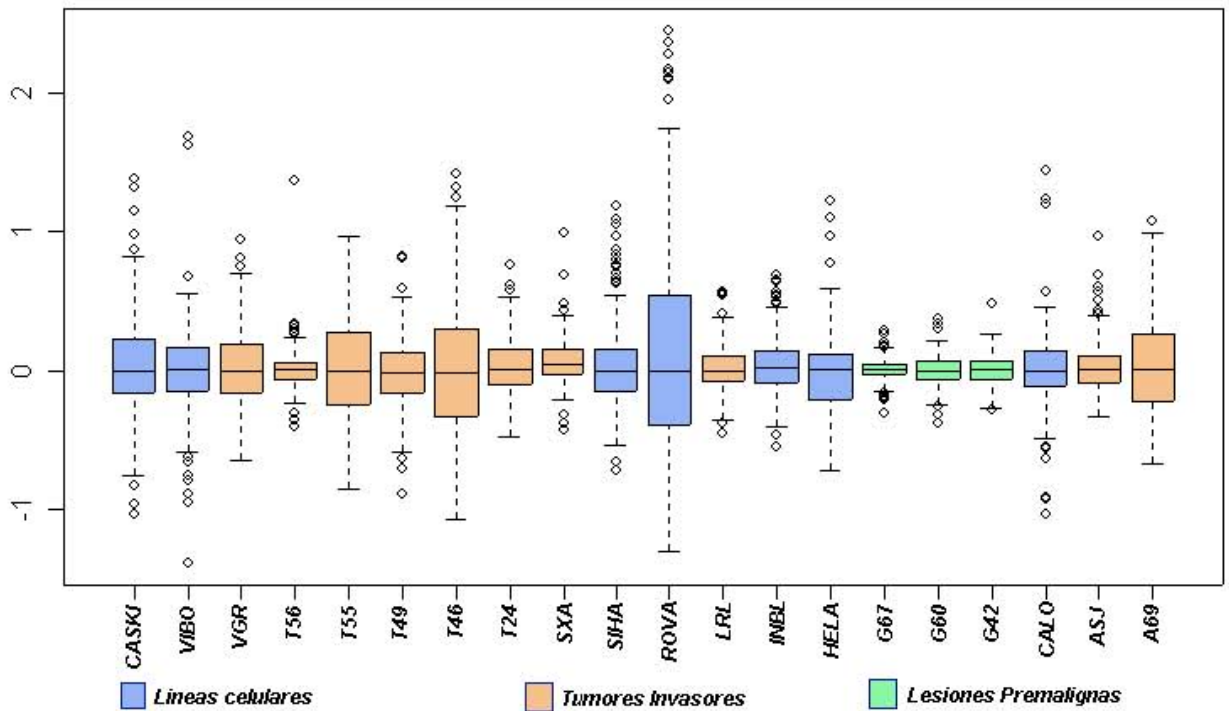


Figura 34. Gráfica de BoxPlot generada a partir de la base de datos que contienen los valores del logaritmo en base 2 de las relaciones de intensidad de la fluorescencia Tumor / Normal de cada blanco en el arreglo y de cada una de las muestras. La gráfica demuestra que la distribución de la mediana en cada experimento independiente no se aleja de cero, por lo que los datos fueron analizados sin llevar a cabo algún otro método de normalización. Se puede observar que la muestra con el mayor número de alteraciones es la línea celular ROVA y que el caso con el menor número de alteraciones fue la lesión premaligna G67.

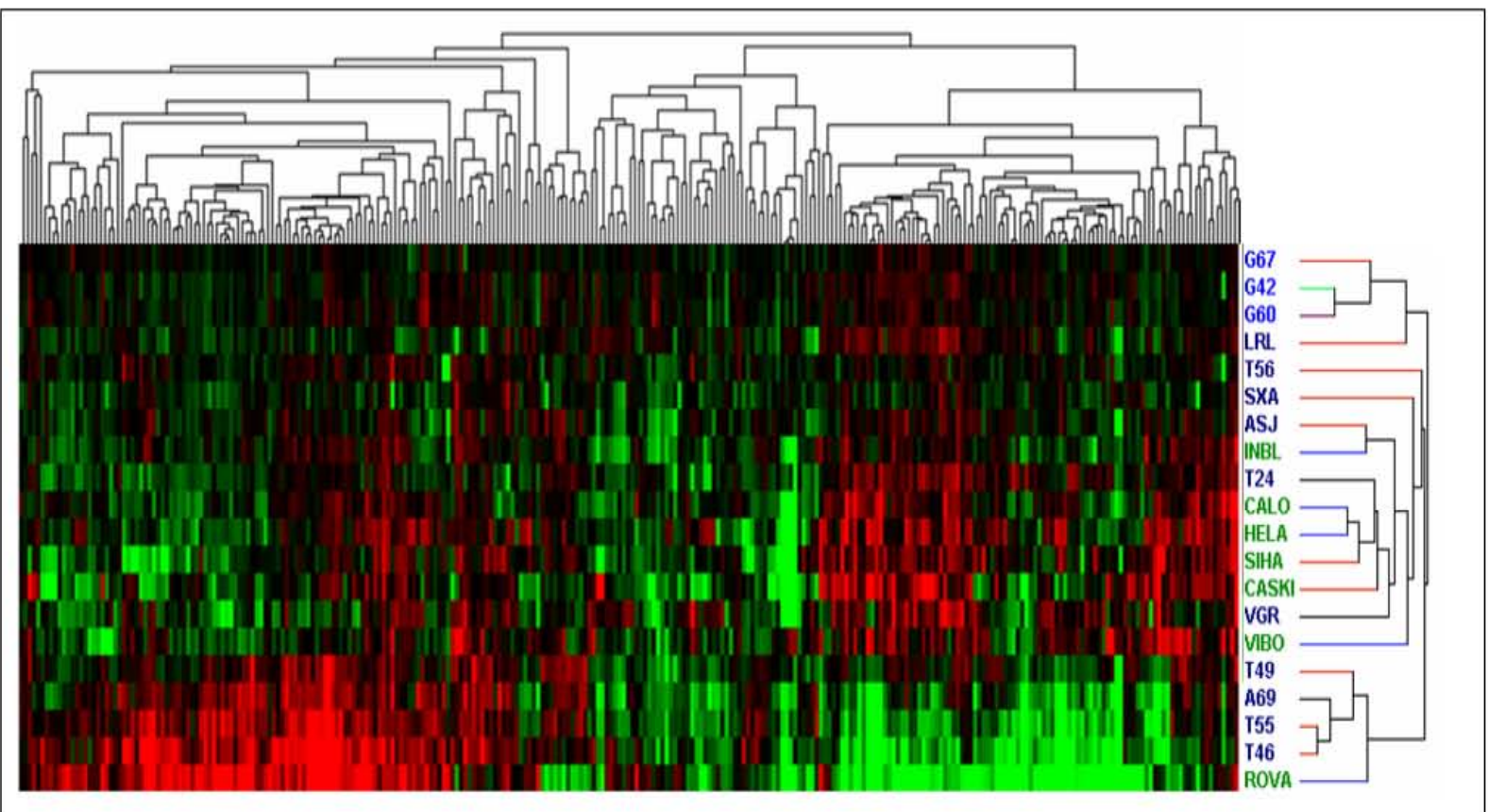


Figura 35

Agrupamiento jerárquico de los datos obtenidos en los experimentos de HGC en microarreglos. El logaritmo en base 2 de las relaciones de intensidad entre la fluorescencia del DNA tumoral entre el DNA normal de cada experimento se utilizó para llevar a cabo el agrupamiento. El dendograma de las muestras muestra 3 grupos de muestras, basados principalmente en el número total de alteraciones en cada caso.

- Lesiones pre-malignas
- Tumores invasores
- Líneas celulares

- VPH16, 10 Muestras
- VPH18, 5 muestras
- VPH31, 1 muestra
- VPH58, 1 muestra

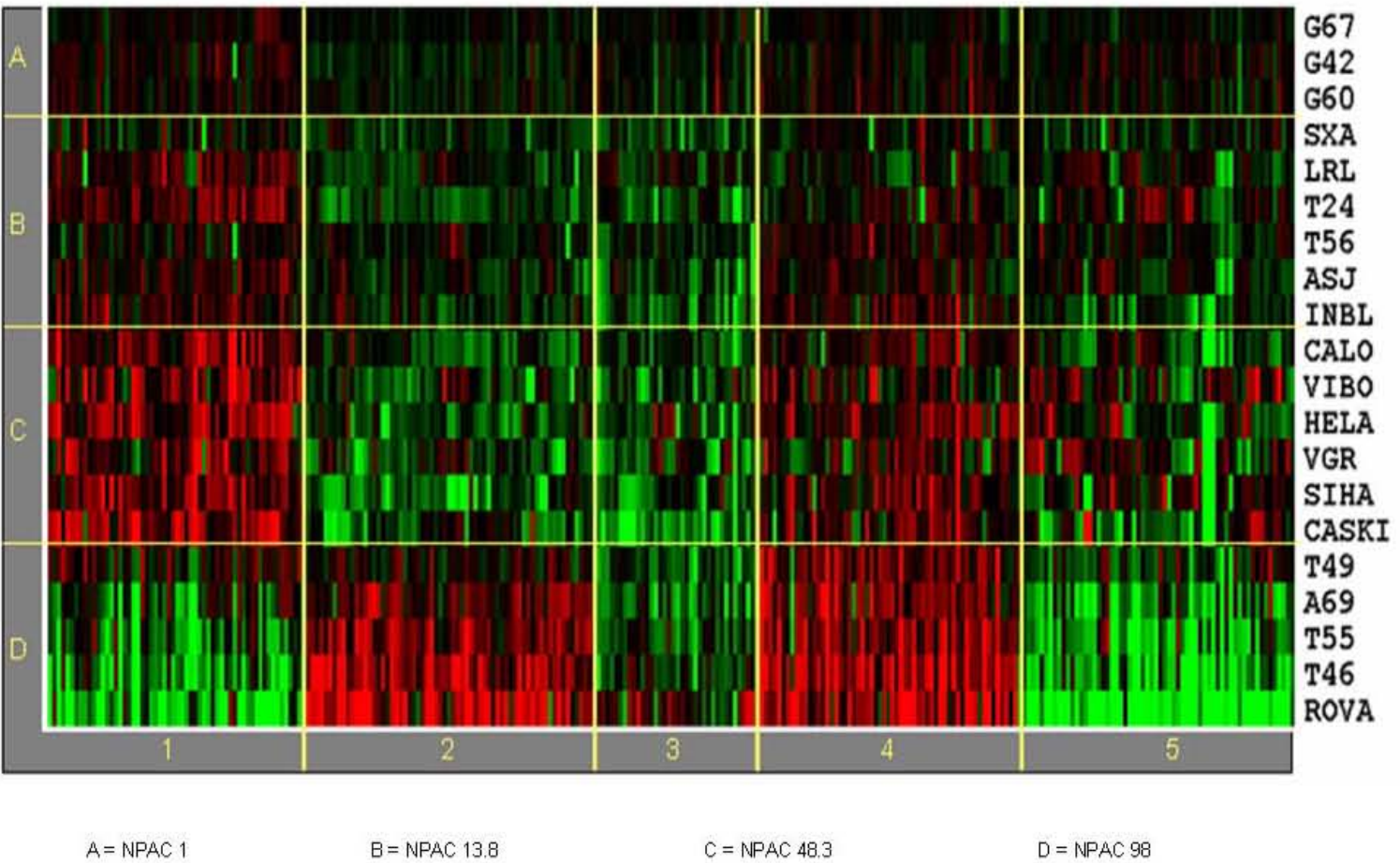
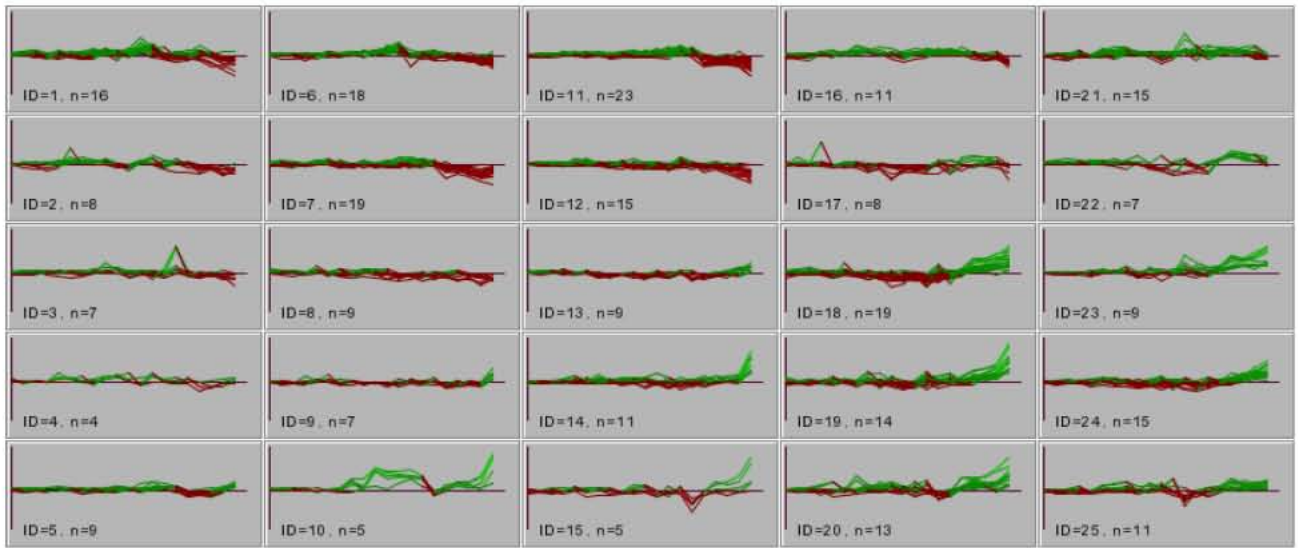
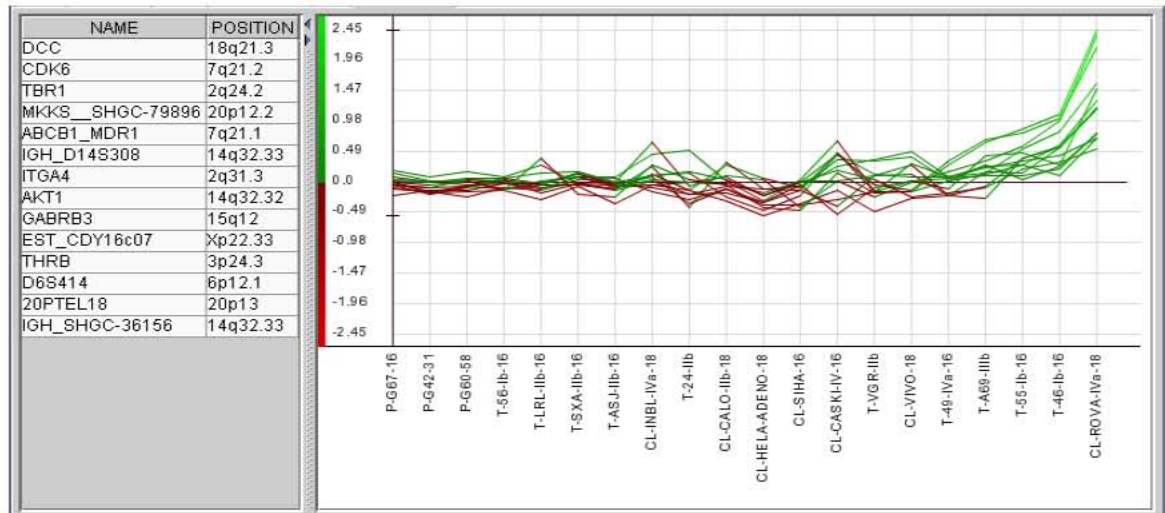


Figura 36

Tomando en cuenta el número de grupos sugerido por el análisis de agrupamiento jerárquico se llevó a cabo un agrupamiento por medias de K, con la finalidad de definir más exactamente el comportamiento de los datos. Como se observa los casos se dividen en 5 grupos (A-D), dependiendo del número promedio de alteraciones cromosómicas (NPAC) en cada grupo. Las clonas impresas en el microarreglo se dividieron en 5 grupos.

A**B****Figura 37**

La gráfica A muestra los grupos de clonas que se comportaron de manera similar, analizados mediante la prueba de medias de K. La gráfica B muestra un grupo de clonas cuya amplificación se presentó preferencialmente en el grupo de muestras con una mayor cantidad de alteraciones cromosómicas.

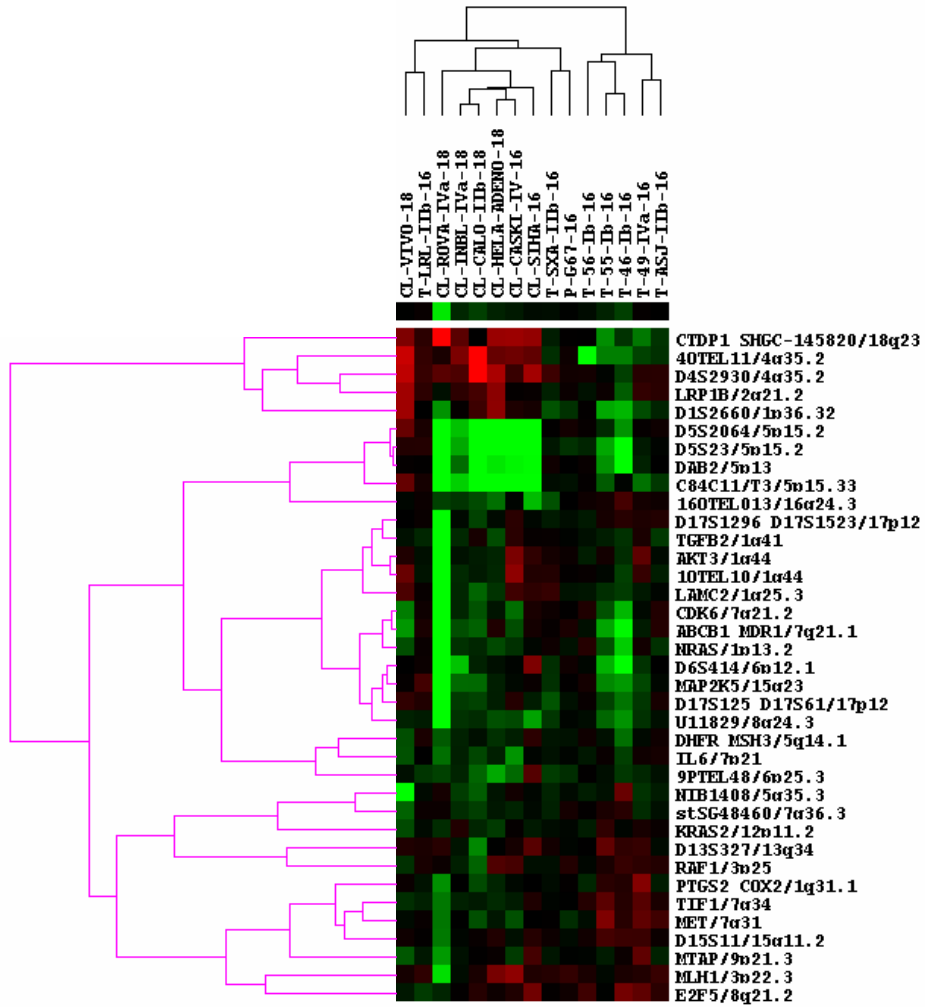


Figura 38
 Agrupamiento de las clonas identificadas como significativamente diferentes entre las muestras VPH18 y VPH16 positivas por análisis de significancia.

Análisis de la base de datos de mHGC de carcinoma cérvico uterino

Alteraciones cromosómicas más comunes en lesiones del cérvix uterino

En la figura 41 se muestra la matriz generada mediante el análisis de la base de datos de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu. Esta matriz representa los casos en donde se detectaron alteraciones cromosómicas (270 de 326) en el eje vertical, ordenados en base a su grado de malignidad (coilocitosis-tumores invasores), el eje horizontal representa las bandas citogenéticas con una definición de 862 bandas. La figura 42 presenta el histograma de las alteraciones cromosómicas detectadas en los 326 casos de lesiones cervicales incluidas en la base de datos. El área verde a la derecha del ideograma representa amplificaciones, el área roja a la izquierda del ideograma representa pérdidas de DNA. Las líneas indican el porcentaje de las muestras en las cuales se presentan las alteraciones. Para fines de comparación, se calculó el porcentaje de bandas aberrantes por caso, utilizando como 100 % las 862 bandas del cariotipo. En promedio, se presentó un porcentaje mas alto de amplificaciones que de deleciones por caso (11.99 % VS 6.85 %), el porcentaje de bandas alteradas por caso fue de 11.99 % de las bandas alteradas por caso. Comparado con otras neoplasias incluidas en la base de datos de Progenetix, el CaCu ocupa un lugar intermedio en el rango de alteraciones por caso (tabla IV), con 11.99 % de bandas alteradas por caso, siendo los carcinomas de pulmón y bronquios las neoplasias con un mayor número de bandas alteradas por caso (22.25 %) y tumores de la piel los que menor número de alteraciones presentan (6.95 % de aberraciones). Los resultados de esta tabla sugieren que diferentes tumores presentan grados diversos de inestabilidad cromosómica, basados en el número promedio de alteraciones cromosómicas que se pueden detectar en cada uno de ellos mediante HGC. Las alteraciones más comunes en el total de las muestras de CaCu fueron la ganancia del brazo largo del cromosoma 3, siendo la región 3q26 la que con mayor frecuencia se

encuentra amplificada (42.6% de 326 muestras), seguida de ganancias en 1q, particularmente 1q32.1 (22.7%), y 5p14.3 (20.9%). Para el caso de las deleciones, la región 2q36 fue la más comúnmente deletada, detectándose en el 23.9% de las muestras, seguida de pérdidas en 2q37 en el 23.6%, 11q25 (20.2%) y 4p16 (19.9%). La figura 43 muestra los histogramas de las alteraciones cromosómicas detectadas en las muestras de cada una de las etapas de la progresión neoplásica.

Tabla IV. Porcentaje de bandas citogenéticas alteradas en base a un cariotipo de 862 bandas, detectado mediante experimentos de HGC sobre cromosomas en metafase.

SITIO ANATOMICO	N	% BANDAS ABERRANTES / CASO	% GANANCIAS / CASO	% DE PERDIDAS POR CASO
PULMON Y BRONQUIOS	280.00	22.25	9.67	12.58
NERVIOS CRANEALES, MEDULA ESPINAL, SNC	295.00	22.06	12.97	9.10
INTESTINO GRUESO, EXCL. APENDICE	306.00	20.12	11.66	8.46
ESOFAGO	117.00	18.30	10.10	8.20
PANCREAS	177.00	18.00	9.91	8.09
OVARIO	233.00	15.53	9.41	6.12
HIGADO	355.00	14.72	7.86	6.86
ESTOMAGO	496.00	13.88	8.44	5.44
NASOFARINGE	124.00	13.49	7.33	6.16
CEREBRO	651.00	13.11	6.87	6.25
TEJIDOS BLANDOS	674.00	12.82	7.25	5.58
HUESO Y ARTICULACIONES	170.00	12.71	8.60	4.11
PLEURA	111.00	12.45	4.32	8.13
CERVIX UTERINO	306.00	11.99	6.85	5.14
MAMA	394.00	11.76	7.68	4.08
SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO	183.00	10.97	7.45	3.52
GLANDULA PITUITARIA	103.00	10.46	7.84	2.62
GLANDULA TIROIDES	225.00	10.30	6.61	3.68
RIÑON	335.00	9.24	3.68	5.55
RETINA	145.00	8.00	5.25	2.75
SANGRE, MEDULA OSEA Y SH	811.00	7.21	5.76	1.45
PROSTATA	366.00	7.10	2.79	4.31
GANGLIOS LINFATICOS	1309.00	7.09	4.25	2.84
PIEL	443.00	6.95	4.28	2.67
HIPOFARINGE	27.00	28.83	18.67	10.15
RECTO	43.00	21.30	12.57	8.73
PENE	26.00	20.41	15.38	5.02
LARINGE	88.00	15.38	7.56	7.82
OROFARINGE	90.00	14.18	8.85	5.33
VULVA	19.00	7.30	4.44	2.86

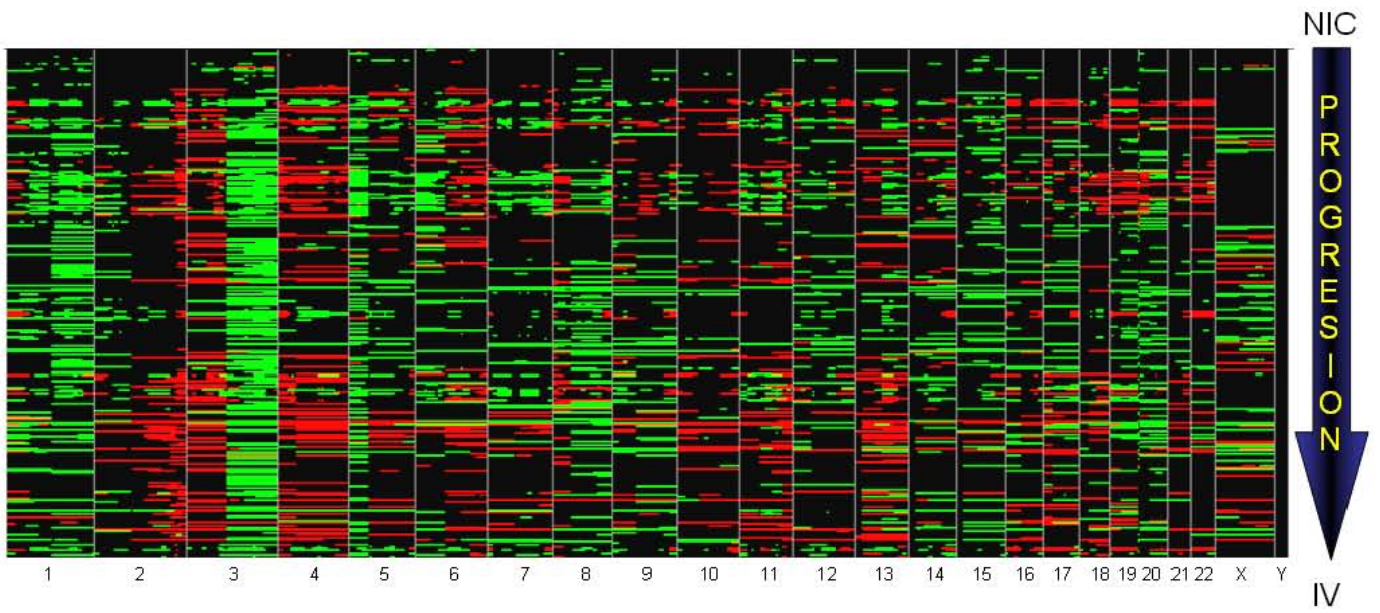


Figura 41

Matriz de aberraciones presentes en 270 casos de 326 que presentaron alteraciones cromosómicas. Las bandas citogenéticas están representadas en el eje horizontal, los casos, ordenados de acuerdo a su estado de progresión están en el eje vertical. El color verde indica ganancia de DNA, el rojo pérdida.

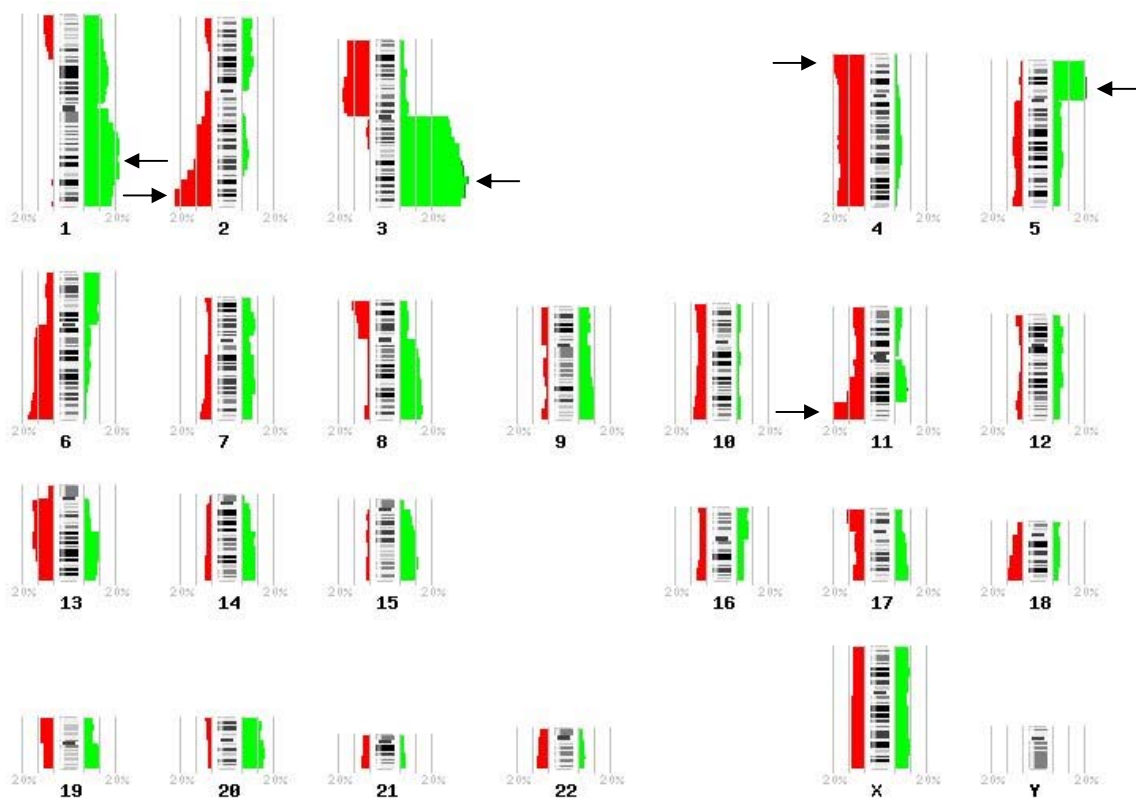


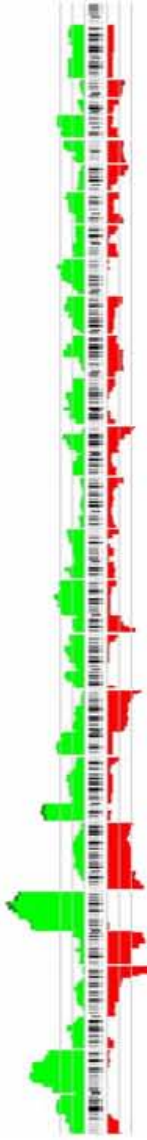
Figura 42

Histograma de las alteraciones cromosómicas presentes en 326 muestras derivadas de tejidos cervicales. El área a la izquierda del histograma representa la incidencia de pérdidas y el área a la derecha las ganancias. Las flechas indican las alteraciones que se detectaron en más del 20% de las muestras, como las amplificaciones en 1q, 3q y 5p, así como las deleciones en la región telomérica de 2q, 4p y 11q.

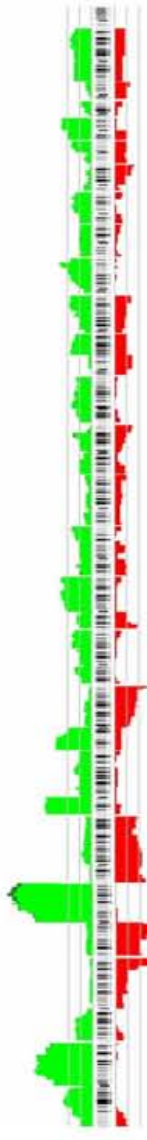
**Lesiones pre-malignas
(N=122)**



**Tumores Invasores
etapa I (N=23)**



Etapa II (N=38)



Etapa III (N=37)



Etapa IV (N=9)

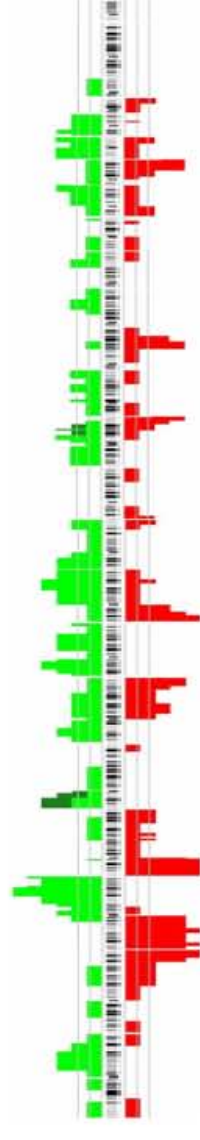


Figura 43. (Página anterior) Patrones de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu. La figura muestra las alteraciones presentes en los casos analizados en la base de datos de alteraciones cromosómicas detectadas mediante mHGC, la cual incluye muestras en diferentes etapas de la progresión. Los histogramas están organizados desde lesiones pre-malignas (superior), hasta tumores grado IV (inferior).

Alteraciones en las lesiones pre-malignas

Para el caso de las lesiones pre-malignas (N=122) las amplificaciones más comunes se detectaron en el brazo largo del cromosoma 3, presentándose un pico en la región 3q26-q27, en el 17.9% de las lesiones, seguida de ganancias en 1q32, (8.9%) y 5p14 (6.5%). Para el caso de las deleciones, la más común se detectó en la región 11q24-q25 (9.8%) seguido de 2q36-q37 y 4p15-p16 (7.3%).

Alteraciones que se mantienen en los tumores invasores

Aquellas alteraciones que se presenten desde etapas tempranas de la carcinogénesis y que se mantengan en etapas avanzadas de la progresión podrían ser potencialmente utilizadas como marcadores de progresión neoplásica en lesiones pre-malignas. La utilidad de estos marcadores sin embargo, debe ser validada mediante la aplicación de otras estrategias experimentales, tales como la hibridación *in situ* o PCR cuantitativa en muestras derivadas de tejidos cervicales en diferentes etapas de la progresión neoplásica. El patrón de alteraciones detectado en las lesiones pre-malignas se acentúa en los tumores invasores, para el caso de los tumores etapa I, la alteración más común se detecta en 3q26.1, en el 62.3% de los tumores en esta etapa, el 65% de los de etapa II, 67% en los etapa III y 75% etapa IV. Asimismo, las amplificaciones en 1q32 se mantienen en el 40% de los tumores invasores.

Las deleciones en 11q24 solamente se detectaron en el 24% de los tumores, mientras que las pérdidas en 2q36-q37 se convirtieron en las deleciones más comunes de los tumores invasores en el 36% de los mismos.

Alteraciones específicas de tumores invasores

Diversas alteraciones se presentaron únicamente en las lesiones invasoras, sin que estuvieran presentes en las lesiones pre-malignas. Tal es el caso de amplificaciones en 8q11 (0% pre VS 17.2% inv), 6p23 (0 VS 16.2%) y 15q23 (0 VS 15.3%) o deleciones en 3p, particularmente 3p14.3 (27.6% inv), 17p13.3 y 2q32 (18.2% inv).

Construcción de “Onco-árboles” para el estudio citogenética de la progresión del CaCu

El programa “onco-trees” identificó 16 alteraciones como estadísticamente significativas y que no se debían al azar. Estos eventos incluyen amplificaciones en los cromosomas 1, 3q y 5p, así como deleciones en 2q, 3p, 4, 6q y 11q.

Estos eventos citogenéticos fueron organizados de manera jerárquica para determinar su secuencia de aparición durante la progresión neoplásica, el onco-árbol de la progresión del CaCu se muestra en la figura 44, en donde podemos observar que existen grupos diferentes, los que se caracterizan por una pérdida temprana de la región telomérica del 2q, seguido de pérdidas en 11q y 4q; el grupo que se caracteriza por la ganancia temprana de secuencias en 3q2, seguido de pérdidas en 3p1, ganancia de 3q1 y posiblemente este grupo se subdivide en otro en donde se detecta la amplificación de 1q2, seguida de ganancias en 1p2, 1q1, 1q3, 1q4, 5p1, 6p1 y 21q1, así como pérdidas en 8p1 y 21q1.

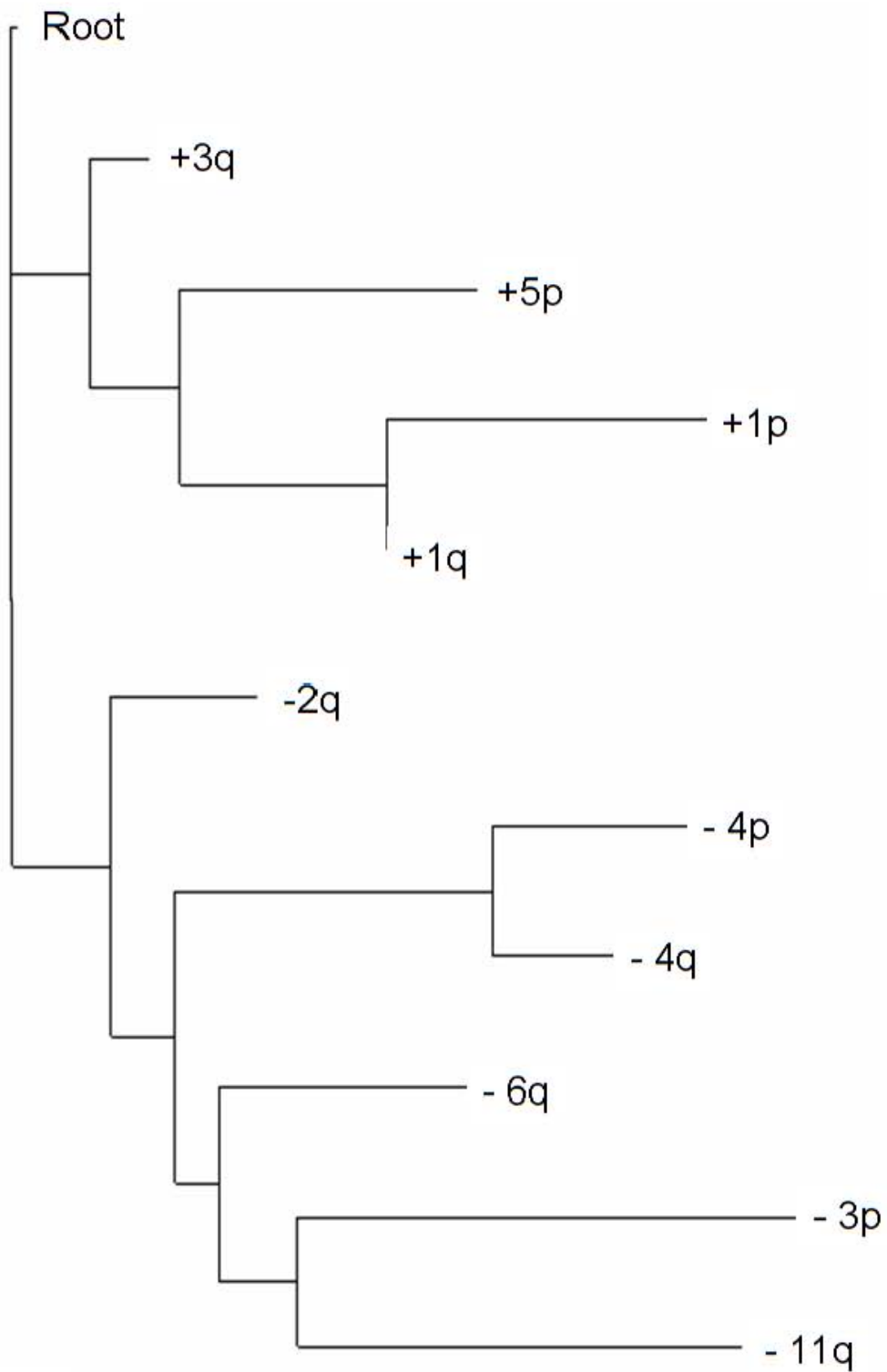


Figura 44

Oncoárbol producidos en base a las alteraciones cromosómicas presentes en los 326 casos derivados de CaCu. La raíz representaría una célula sin alteración, las ramas más cercanas a la raíz indican los eventos que suceden en etapas tempranas de la progresión (amplificaciones de 3q, 5p y 1), las ramas más alejadas indican eventos que suceden en etapas posteriores de la progresión.

Análisis bioinformático de los posibles efectos de los cambios en el número de copias de DNA sobre diversos procesos celulares

El resultado del mapeo de los datos derivados del proyecto del genoma humano fue una base de datos que contiene 18,385 grupos de UniGene mapeados una sola vez sobre el genoma humano. Una vez asignados los valores de pérdida o ganancia a las regiones citogenéticas correspondientes, el análisis con los programas GenMAPP y MAPPfinder identificó los grupos de ontología génica que se presentan en las tablas III-VI como los más afectados por cambios en el número de copias en las lesiones pre-malignas y en los tumores invasores. La figura 45 muestra los genes de la categoría de ontología génica “mitosis”, indicando en verde los genes que sufren amplificaciones y en rojo los que sufren deleciones. Estos resultados sugieren que mecanismos involucrados en el mantenimiento de un cariotipo estable pueden estar sufriendo alteraciones desde etapas pre-invasoras del CaCu.

GOID	GO Name	GO Type	Z Score
8038	neuronal cell recognition	P	6.636
5984	disaccharide metabolism	P	4.273
7064	mitotic sister chromatid cohesion	P	3.831
30826	regulation of cGMP biosynthesis	P	3.831
30800	negative regulation of cyclic nucleotide metabolism	P	3.831
30803	negative regulation of cyclic nucleotide biosynthesis	P	3.831
30827	negative regulation of cGMP biosynthesis	P	3.831
19934	cGMP-mediated signaling	P	3.831
6930	substrate-bound cell migration\, cell extension	P	3.831
16119	carotene metabolism	P	3.831
9450	aminobutyrate catabolism	P	3.831
46359	butyrate catabolism	P	3.831
6134	dihydrobiopterin reduction	P	3.831
7195	dopamine receptor\, adenylate cyclase inhibiting pathway	P	3.831
43112	receptor metabolism	P	3.831
45213	neurotransmitter receptor metabolism	P	3.831
6746	FADH2 metabolism	P	3.831
45212	neurotransmitter receptor biosynthesis	P	3.831
30850	prostate gland development	P	3.831
1655	urogenital system development	P	3.831
7509	mesoderm migration	P	3.831
8045	motor axon guidance	P	3.831
46652	thymocyte differentiation	P	3.831
46352	disaccharide catabolism	P	3.831
5991	trehalose metabolism	P	3.831
5993	trehalose catabolism	P	3.831
16486	peptide hormone processing	P	3.831
15785	UDP-galactose transport	P	3.831
15919	peroxisomal membrane transport	P	3.831
46398	UDP-glucuronate metabolism	P	3.831
6065	UDP-glucuronate biosynthesis	P	3.831
46399	glucuronate biosynthesis	P	3.831
6063	uronic acid metabolism	P	3.831
19585	glucuronate metabolism	P	3.831
9197	pyrimidine deoxyribonucleoside diphosphate biosynthesis	P	3.831
9139	pyrimidine nucleoside diphosphate biosynthesis	P	3.831
15694	mercury ion transport	P	3.831
6233	dTDP biosynthesis	P	3.831
6235	dTTP biosynthesis	P	3.831

Tabla III. Procesos celulares cuyos genes sufrieron deleciones en las lesiones pre-malignas. GOID.- Número identificador del proceso en el proyecto de ontología génica; GO Type P.- proceso celular, Z score.- Valor calculado tomando en cuenta el número de genes identificados en la base de datos correspondientes al proceso celular indicado, el número de genes alterados y el número total de genes analizados, un mayor valor indica un mayor número de genes alterados en el proceso celular indicado.

GOID	GO Name	GO Type	Z Score
6956	complement activation	P	7.145
6958	complement activation\, classical pathway	P	6.577
7009	plasma membrane organization and biogenesis	P	4.642
16064	humoral defense mechanism (sensu Vertebrata)	P	4.407
6957	complement activation\, alternative pathway	P	4.295
16044	membrane organization and biogenesis	P	4.295
244	assembly of spliceosomal tri-snRNP	P	4.086
6959	humoral immune response	P	3.834
30317	sperm motility	P	3.721
6607	NLS-bearing substrate-nucleus import	P	3.629
15988	energy coupled proton transport\, against electrochemical gradient	P	3.506
6433	prolyl-tRNA aminoacylation	P	3.336
6047	UDP-N-acetylglucosamine metabolism	P	3.336
8295	spermidine biosíntesis	P	3.336
8216	spermidine metabolism	P	3.336
6030	chitin metabolism	P	3.336
6032	chitin catabolism	P	3.336
17121	phospholipid scrambling	P	3.326
15991	ATP hydrolysis coupled proton transport	P	3.326
6695	cholesterol biosynthesis	P	3.084
6879	iron ion homeostasis	P	3.06
9613	response to pest/pathogen/parasite	P	2.986
30003	cation homeostasis	P	2.969
6694	steroid biosynthesis	P	2.911
46916	transition metal ion homeostasis	P	2.79
30641	hydrogen ion homeostasis	P	2.79
6555	methionine metabolism	P	2.786
7185	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway	P	2.786
8643	carbohydrate transport	P	2.76
19725	cell homeostasis	P	2.753
6081	aldehyde metabolism	P	2.737
16126	sterol biosynthesis	P	2.611
50791	regulation of physiological process	P	2.554
15758	glucose transport	P	2.549
8645	hexose transport	P	2.549
15749	monosaccharide transport	P	2.549
9607	response to biotic stimulus	P	2.489
7507	heart development	P	2.48
6534	cysteine metabolism	P	2.479

Tabla IV. Procesos celulares cuyos genes sufrieron amplificaciones en las lesiones pre-malignas.

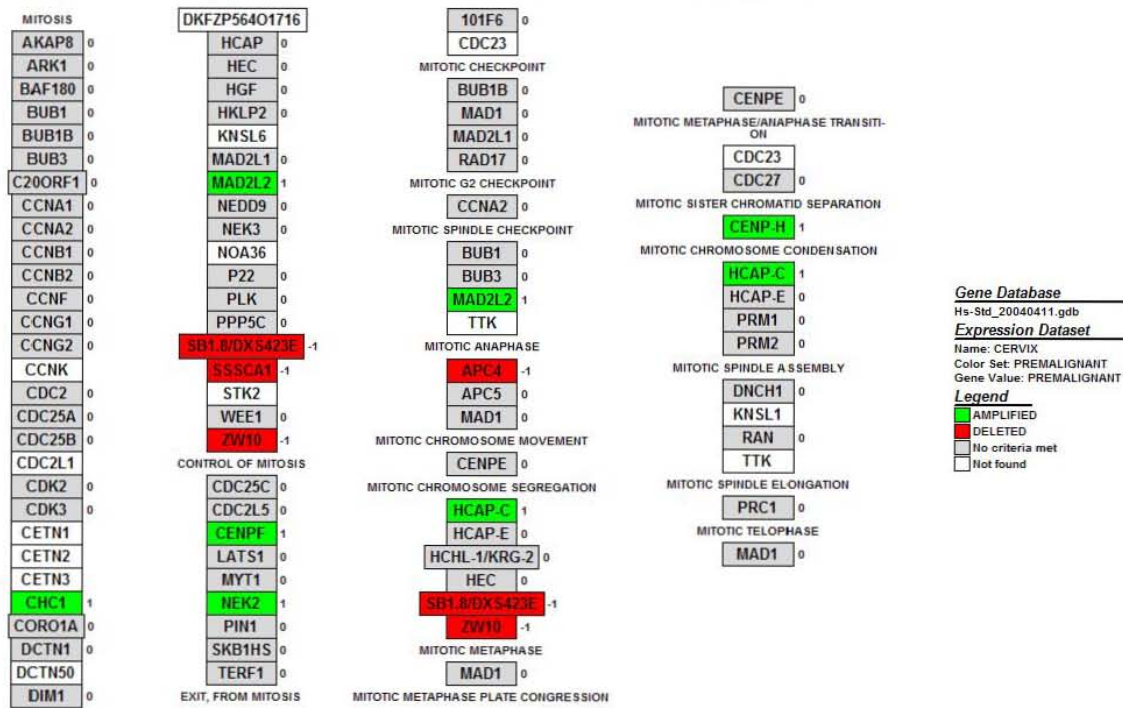
GOID	GO Name	GO Type	Z Score
7156	homophilic cell adhesion	P	6.448
7186	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	P	3.655
6508	proteolysis and peptidolysis	P	3.531
42330	taxis	P	3.441
6935	chemotaxis	P	3.441
30163	protein catabolism	P	3.433
9628	response to abiotic stimulus	P	3.416
19370	leukotriene biosynthesis	P	3.364
9057	macromolecule catabolism	P	3.196
9987	cellular process	P	3.167
9056	catabolism	P	3.092
15875	vitamin/cofactor transport	P	3.014
46456	icosanoid biosynthesis	P	2.952
7260	tyrosine phosphorylation of STAT protein	P	2.901
42136	neurotransmitter biosynthesis	P	2.901
8284	positive regulation of cell proliferation	P	2.873
6633	fatty acid biosynthesis	P	2.853
7166	cell surface receptor linked signal transduction	P	2.833
45765	regulation of angiogenesis	P	2.796
16525	negative regulation of angiogenesis	P	2.796
6069	ethanol oxidation	P	2.796
6067	ethanol metabolism	P	2.796
6422	aspartyl-tRNA aminoacylation	P	2.796
15695	organic cation transport	P	2.796
16053	organic acid biosynthesis	P	2.757
46394	carboxylic acid biosynthesis	P	2.757
50877	neurophysiological process	P	2.684
50875	cellular physiological process	P	2.668
7608	perception of smell	P	2.608
6516	glycoprotein catabolism	P	2.562
42127	regulation of cell proliferation	P	2.508
16337	cell-cell adhesion	P	2.502
42221	response to chemical substance	P	2.493
18108	peptidyl-tyrosine phosphorylation	P	2.461
42102	positive regulation of T-cell proliferation	P	2.461
6954	inflammatory response	P	2.446
187	activation of MAPK	P	2.446
30574	collagen catabolism	P	2.424
30193	regulation of blood coagulation	P	2.422

Tabla V. Procesos celulares cuyos genes sufrieron deleciones en los tumores invasores.

GOID	GO Name	GO Type	Z Score
6956	complement activation	P	4.365
6958	complement activation\, classical pathway	P	4.094
9395	phospholipid catabolism	P	3.308
6957	complement activation\, alternative pathway	P	3.227
45088	regulation of innate immune response	P	3.13
50776	regulation of immune response	P	3.13
15991	ATP hydrolysis coupled proton transport	P	3.13
7009	plasma membrane organization and biogenesis	P	2.934
15988	energy coupled proton transport\, against electrochemical gradient	P	2.934
6612	protein-membrane targeting	P	2.869
30317	sperm motility	P	2.869
45047	protein-ER targeting	P	2.869
6879	iron ion homeostasis	P	2.859
30102	negative regulation of natural killer cell activity	P	2.711
45454	cell redox homeostasis	P	2.711
30503	regulation of cell redox homeostasis	P	2.711
45845	regulation of natural killer cell activity	P	2.711
7181	transforming growth factor beta receptor complex assembly	P	2.711
50778	positive regulation of immune response	P	2.711
45089	positive regulation of innate immune response	P	2.711
6435	threonyl-tRNA aminoacylation	P	2.711
46324	regulation of glucose import	P	2.711
46323	glucose import	P	2.711
244	assembly of spliceosomal tri-snRNP	P	2.711
6821	chloride transport	P	2.623
46916	transition metal ion homeostasis	P	2.533
16044	membrane organization and biogenesis	P	2.492
8652	amino acid biosynthesis	P	2.471
8645	hexose transport	P	2.241
15758	glucose transport	P	2.241
15749	monosaccharide transport	P	2.241
9312	oligosaccharide biosynthesis	P	2.213
6433	prolyl-tRNA aminoacylation	P	2.213
50665	hydrogen peroxide biosynthesis	P	2.213
9226	nucleotide-sugar biosynthesis	P	2.213
42743	hydrogen peroxide metabolism	P	2.213
7386	compartment specification	P	2.213
6621	Protein-ER retention	P	2.213
7309	oocyte axis determination	P	2.213

Tabla VI. Procesos celulares cuyos genes sufrieron amplificaciones en los tumores invasores.

A



B

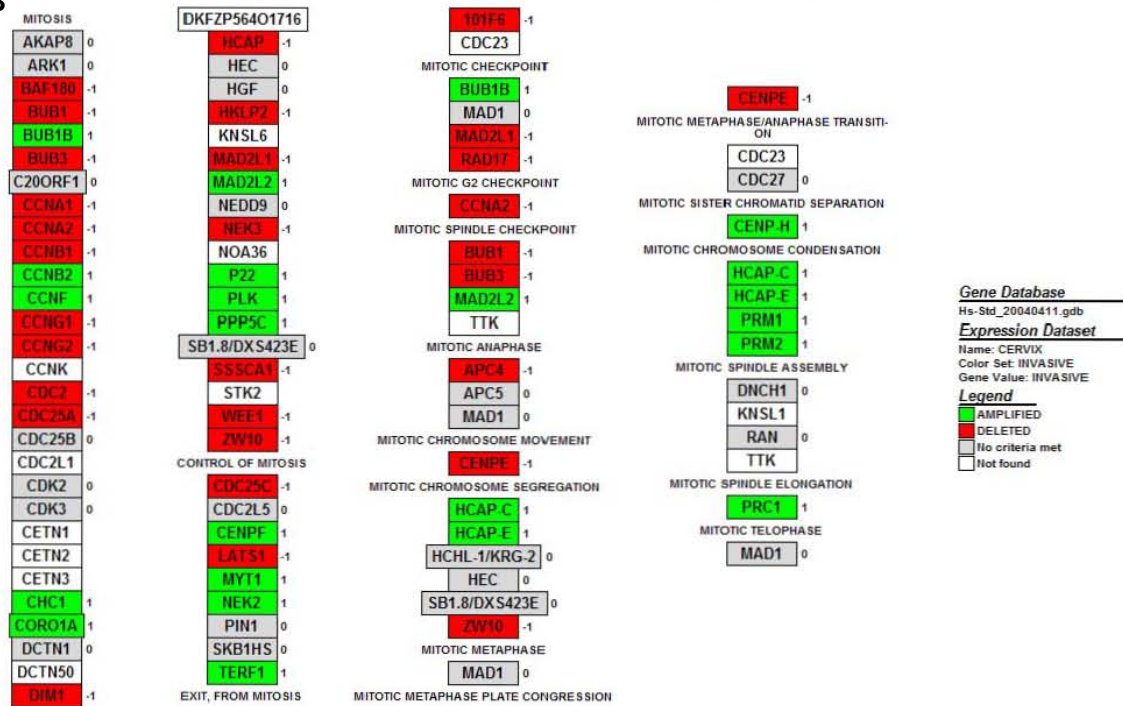


Figura 45

Genes involucrados en el término de ontología génica "Mitosis" y su alteración en las lesiones pre-malignas (A) y en los tumores invasores (B). El color rojo indica que el gen se encontró amplificado, el rojo deletado y el gris indica que ese gen no se encontró en la base de datos.

DISCUSION

En este trabajo de tesis se definieron los patrones de alteraciones en cuanto a ganancia y pérdida de material genético en carcinoma cérvico uterino, utilizando hibridación comparativa sobre cromosomas en metafase y sobre microarreglos. Así mismo se creó una base de datos a partir de nuestros resultados y de datos publicados acerca de este tumor para definir la secuencia de alteraciones citogenéticas durante la progresión neoplásica. Por otro lado, se llevaron a cabo diversos análisis bioinformáticos para explorar el impacto potencial de los cambios en el número de copias de DNA en diversos procesos celulares.

El carcinoma cérvico uterino es una neoplasia que se caracteriza por presentar un alto grado de inestabilidad cromosómica. Asimismo el desarrollo de este tipo de inestabilidad es un evento crucial que se da en etapas muy tempranas de la transformación celular mediada por VPH (72). Los cariotipos de los tumores cervicales, así como de las células transformadas por VPH, presentan alteraciones complejas, incluyendo alteraciones numéricas tales como ganancia y pérdida de regiones cromosómicas o de cromosomas completos y aberraciones estructurales, como translocaciones cromosómicas (52-62), anormalidades en el proceso de condensación cromosómica (73), mitosis multipolares, núcleos gigantes o multilobulados, cromosomas rezagados y puentes en anafase (74).

En el caso particular de las alteraciones numéricas desbalanceadas, la metodología de hibridación genómica comparativa ha resultado particularmente útil para detectar un patrón de alteraciones en este tipo de tumor, mientras que metodologías como el pintado de cromosomas mediante hibridación múltiple *in situ* (M-FISH) y la cariotipificación espectral (SKY), han permitido detectar una serie de intercambios de material entre diversos cromosomas (75).

Gracias a estos estudios ha sido posible determinar el patrón de alteraciones cromosómicas que está definiendo a este tipo de tumor.

El análisis de la base de datos de HGC sobre metafases permitió definir las alteraciones más prevalentes durante la progresión del CaCu, confirmando la importancia de diversas alteraciones, tales como amplificaciones en el brazo largo del cromosoma 3, en particular 3q26.1; en la región 1q31.1 y en el brazo corto del cromosoma 5, así como deleciones en 3p, 2q37 y el cromosoma 4 en el proceso de carcinogénesis cervical.

De manera importante, la inclusión de lesiones pre-malignas en la base de datos, permitió definir las alteraciones cromosómicas cuya presencia podría representar un mayor potencial de progresión neoplásica. Entre las alteraciones más relevantes en este sentido, nuevamente la amplificación de la región 3q26.1 juega un papel importante, ya que esta se encuentra en el 17.2% de las lesiones pre-malignas y se mantiene en el 59.6% de los tumores invasores. Ganancias en 1q32.1 (9% en NICs, 31% en invasoras y en 5p (6.6 y 31.5% de los NICs y de los invasores, respectivamente), también podrían contener genes cuya amplificación podría estar jugando un papel importante en el desarrollo de una neoplasia invasora. La deleción de 11q24-q25, presente en el 30.8% de los NICs y en el 28% de los invasores, así como pérdida de la región 2q35-q37 (9.8% NICs, 25.6% en invasores), podrían estar indicando la presencia de genes supresores de tumor, cuya pérdida resultaría en la progresión tumoral. Esta situación deberá ser evaluada mediante análisis de la expresión de genes particulares localizados en estas regiones, la pérdida de la expresión de estos genes en los tumores con relación al tejido normal, contribuiría a señalarlos como potenciales genes supresores de tumor en CaCu. Por otro lado, podrían llevarse a cabo estudios de pérdida de heterocigocidad para determinar la presencia de mutaciones inactivantes en alguno de los alelos de estos genes.

El análisis sobre microarreglos permitió evaluar cambios en el número de copias de DNA de genes particulares que se han visto involucrados en cánceres humanos. En coincidencia con los datos de HGC en cromosomas, la HGC en microarreglos también identificó entre las alteraciones más comunes en las muestras analizadas amplificaciones en las clonas localizadas en estas regiones citogenéticas, tales como los genes *RBP1-RBP2* (Retinol binding protein 1 and 2) y *Tp63* (58.8% de las muestras), ubicados en 3q21-q22 y 3q27-q29, respectivamente. *RBP1* es la proteína involucrada en el transporte del retinol desde sus sitios de almacenamiento en el hígado hasta los tejidos periféricos. La vitamina A juega un importante papel en diversos procesos importantes, tales como el crecimiento y la diferenciación de los tejidos epiteliales. Se ha detectado una disminución de la expresión debida a la metilación del promotor de *RBP1* en tumores de mama, ovario, colorrectales y otros tipos tumorales, sin embargo, no se detectó metilación del promotor o disminución de la expresión del gen en la línea celular HeLa, derivada de un tumor de cérvix, por lo que la pérdida o disminución de la expresión de *RBP1* a nivel de RNA no juega un papel en el CaCu (76). Sin embargo, mediante técnicas de radioinmunoensayo e inmunohistoquímica, se ha detectado una cantidad significativamente más alta de la proteína del gen *RBP* en tumores cervicales escamosos, comparado con el tejido normal, lo que sugiere la posibilidad de que existan mecanismos post-traduccionales que estabilicen a la proteína o que permitan su acumulación en los tejidos tumorales (77). La acumulación de esta proteína, con la consecuente alteración en el metabolismo de vitamina A en el epitelio cervical podría estar afectando el proceso de diferenciación epitelial.

El gen *TP63* es un homólogo del gen supresor de tumor p53. Su proteína también es blanco de degradación por la proteína E6 de VPH y juega un papel primordial en el desarrollo de los epitelios escamo-estratificados. *TP63* está altamente expresado en el

estrato basal de estos epitelios, disminuyendo su expresión en los estratos diferenciados, lo que sugiere que la presencia de esta proteína preserva la capacidad de auto-renovación de la célula madre epitelial después de una división asimétrica, en donde una célula hija debe conservar su fenotipo de célula madre epitelial y la otra debe comprometerse en el proceso de diferenciación (78). La expresión de esta proteína en el epitelio cervical humano ha sido detectada en las capas basales y para-basales del epitelio ectocervical y no está presente en las capas diferenciadas. En lesiones pre-malignas y tumores invasores se ha descrito una alta expresión de p63 (79, 80), la cual ha sido asociada con una baja en el tiempo de supervivencia y con la falta de respuesta local-regional después de la radiación y la quimioterapia. En ese mismo trabajo, la expresión del factor de crecimiento epidermoide (*EGFR*, 7p12.3-p12.1), que se encontró amplificado en el 52.9% de las muestras invasoras analizadas por microarreglos, se estableció como un factor predictivo de una falla en el tratamiento en tumores extra-pélvicos, y tanto la expresión del *EGFR* como de p63, se detectaron como potentes marcadores moleculares de riesgo en pacientes con estadios IIB de carcinoma de células escamosas del cérvix, las cuales hayan recibido radioterapia y quimioterapia (81).

El gen *DAB2* (5p13), se encontró también amplificado en el 58.8% de los casos invasores por microarreglos. El gen *DAB2* ha sido identificado como un potente gen supresor en carcinomas de ovario y de próstata (82), y la pérdida de su expresión ha sido asociada con la transición de las células epiteliales ováricas hacia estadios pre-malignos (83). *DAB2* ha sido implicado en el control de la polaridad y el posicionamiento de la célula y parece mediar los requerimientos que presentan las células epiteliales hacia permanecer adheridas a la membrana basal (84). Reportes recientes demuestran que *DAB2* tiene un papel en la regulación de la cascada de señalización de WNT (85), la cual está involucrada en el mantenimiento de la integridad genómica. Las alteraciones en el número

de copias que observamos mediante CGH sobre metafases y sobre microarreglos, tal vez esté relacionada con la expresión aumentada de genes relacionados con esta cascada de regulación, la cual ha sido detectada por nuestro grupo en CaCu mediante microarreglos de DNAC (Vázquez G, observaciones no publicadas). Para confirmar lo anterior, resultará necesario llevar a cabo experimentos que nos permitan evaluar cuantitativamente tanto el número de copias, como la expresión del RNA y de la proteína de *DAB2*, lo cual se puede llevar a cabo mediante experimentos de hibridación *in situ*, PCR cuantitativa o protección de RNAsas e inmunohistoquímica. Por otro lado, la evaluación del papel de *DAB2* en la vía de señalización de WNT, podría ser analizada mediante experimentos con modelos celulares que nos permitan, ya sea sobre-expresar el gen, o eliminar su expresión mediante RNA de interferencia o antisentido, con la finalidad de evaluar los cambios en los patrones de expresión de los genes involucrados en la vía de WNT provocados por los cambios en la expresión de *DAB2*.

En lo que se refiere a las pérdidas de DNA, el gen *FHIT* (fragile histidine triad, 3p14.2) presentó deleciones en el 47% de los casos. La disminución de la expresión de este gen ha sido bien documentada en carcinoma cervical y se ha asociado a la presencia de metástasis ganglionares, invasión parametrial e invasión a vagina en tumores cervicales (86). Una asociación entre anomalías en la expresión del gen *FHIT* e infección con tipos particulares de VPH ha sido sugerida, ya que el 87% de los casos sin expresión de *FHIT* fueron positivos para infección por VPH 16 (87). Es más, la expresión anormal de este gen se ha detectado en pacientes significativamente más jóvenes que aquellas con una expresión normal, lo que sugiere que estas anomalías en la regulación del gen podrían estar acelerando el proceso de carcinogénesis en cooperación con VPH (88). Estas observaciones pueden estar relacionadas con la integración preferencial de VPH en

sitios frágiles del genoma, particularmente en el sitio frágil FRA3B, en donde se localiza el gen *FHIT* (89).

El gen *KIT* (4q11-q12) deletado en el 29.4% de las muestras, incluyendo la línea celular CALO, no se encontró alterada en la línea celular INBL, sin embargo, ambas líneas expresan receptores *KIT* funcionales, los cuales podrían estar jugando un papel importante en el crecimiento dependiente de densidad de estas células (65). El gen *EIF4E* (4q24) se ha encontrado amplificado y sobre-expresado en diversos tumores, incluyendo los de cérvix y se ha sugerido que la actividad de esta proteína que se une al “cap” de los RNAs mensajeros, podría estar provocando el sobre-expresión específico de genes relacionados con el proceso de malignización y de metástasis. Asimismo, la sobre-expresión de este gen ha sido fuertemente relacionada con el fenotipo transformado, haciendo del mismo un blanco atractivo para desarrollar opciones terapéuticas o como un marcador de progresión tumoral (90). La aparente contradicción entre nuestros resultados, donde lo encontramos deletado, en el 29.4% de las muestras analizadas, y los datos acerca de su sobre-expresión en cáncer, no podrán ser conciliados hasta que no llevemos a cabo experimento que evalúen la expresión de *EIF4E* en muestras donde detectamos deleciones de la región donde se ubica el gen. En el caso de detectar sobre-expresión, aun cuando existiera deleción de la región cromosómica, podrían llevarse a cabo experimentos que nos permitieran determinar cual de los alelos se ha deletado y si la sobre-expresión se debe a alteraciones en los mecanismos de control de la expresión en el alelo restante.

Análisis de HGC en microarreglos mediante algoritmos de agrupamiento

El análisis de agrupamiento jerárquico y de medias de K nos permitió identificar grupos de loci que mostraron un patrón similar de pérdida o ganancia de DNA en las muestras, y de manera particular, nos indicó la presencia de genes cuya pérdida o ganancia está

relacionada con el número total de alteraciones presentes en una muestra particular. Esto se confirmó mediante el uso del programa CIT, el cual detectó las clonas que se comportaron significativamente diferentes ($P < 0.5$) en las muestras con un alto número de alteraciones (Número Promedio de Alteraciones = 98), comparado con el resto de las muestras. De este análisis no es posible determinar si estos genes están jugando un papel funcional activo en la acumulación de alteraciones cromosómicas. Sin embargo, alteraciones en la expresión de algunos de estos genes se han visto relacionadas con la progresión del CaCu, tales como el gen *JAG1* (20p12.1), cuya proteína se sobre-expresa en tumores cervicales, junto con otros miembros de la vía de señalización de Notch (91) o el gen *PTEN* (10q23.3), en donde se han descrito alteraciones bi-alélicas relacionadas con la progresión del CaCu, las cuales tienen también relación con el éxito del tratamiento (92). Este grupo también incluyó genes que han sido implicados en cáncer, pero que no han sido analizados en tumores cervicales, como el gen *MAP2K5* (mitogen-activated protein kinase kinase 5, 15q23), que se ha encontrado sobre-expresado en tumores de próstata metastásicos, posiblemente jugando un papel en la estimulación de la proliferación y en la invasión (93) o *RFC2* (7q11.23), que es la sub-unidad responsable de la unión de ATP del factor de replicación C, el cual juega un papel importante en vías celulares involucradas en el mantenimiento de la estabilidad genómica, a través de la detención del ciclo celular en presencia de daño a DNA o de replicación incompleta (94). Existen reportes que indican que los tumores positivos para VPH18 presentan un comportamiento clínico más agresivo, una mayor capacidad invasiva y un mayor grado de integración viral que los que están infectados con VPH16 (95). Por lo anterior, nos interesó explorar la presencia de alteraciones cromosómicas particulares para muestras con estos tipos virales. El análisis de significancia, a pesar de haber identificado un grupo de clonas que se comportan significativamente diferente en las muestras positivas para

VPH18 y 16, no detectó ningún marcador molecular que permitiera hacer una diferencia entre ambos grupos. Una posible explicación a esta observación es el hecho de que el arreglo que utilizamos no cubre la totalidad del genoma humano en intervalos regulares, por lo que otras regiones que podrían alterarse preferencialmente por un tipo viral determinado no fueron detectadas en este estudio.

Modelo de progresión neoplásica en cáncer de cérvix

Gracias al análisis de las alteraciones cromosómicas detectadas en CaCu mediante el programa "OncoTrees", fue posible determinar un árbol que representa la secuencia en la que se presentan las alteraciones citogenéticas durante la progresión de este tumor. Este modelo indica la existencia de dos posibles vías para el desarrollo del CaCu, una caracterizada por una pérdida temprana de la región telomérica del 2q, seguido de pérdidas en 11q y 4 y otra caracterizada por la ganancia temprana de secuencias en 3q, seguido de amplificaciones en 1 y 5p, así como pérdidas en 3p y 6q

Como se ha expuesto previamente, la importancia de la ganancia de secuencias en 3q, así como las pérdidas en 2q, han sido algunas de las alteraciones citogenéticas a las cuales se ha puesto una mayor atención en cuanto a un análisis mas detallado de su papel en CaCu. Estudios recientes se han enfocado al análisis de algunas de estas regiones citogenéticas con la finalidad de detectar cuales son los genes blanco de estas alteraciones, para determinar su potencial utilidad como marcadores biológicos o para determinar su papel en el proceso de transformación del epitelio cervical. En el 2003, Narayan y cols. (61) llevan a cabo experimentos de HGC sobre metafases y mapeo de deleciones de alta resolución para identificar la región mínima de deleción en la región 2q33-q37, identificando pérdida de heterocigocidad (LOH) en 60 tumores invasores y delimitando dos regiones mínimas de deleción en 2q35-q36.1 y 2q36.3-q37.1. De manera importante, cuando analizaron la presencia de LOH en 2q en lesiones pre-malignas, esta

se detectó en el 40% de las lesiones de bajo grado y en el 89% de las lesiones de alto grado, lo que indica la importancia de esta deleción en la progresión del CaCu. Una vez delimitadas estas regiones, se analizó la presencia de mutaciones, la expresión y el estado de metilación de diversos genes localizados en esta región citogenética (*CASP10*, caspase 10, apoptosis-related cysteine protease; *CASP8*, caspase 8, apoptosis-related cysteine protease; *BARD1*, BRCA1 associated RING domain 1; *XRCC5*, X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa); *PPP1R7*, protein phosphatase 1, regulatory subunit 7; *CFLAR*, CASP8 and FADD-like apoptosis regulator; *NCL*, nucleolin y *NEDD5*, neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 5), sin que se detectaran mutaciones inactivantes en *CASP10*, *BARD1*, *XRCC5* o *PPP1R7*, aunque si se detectó una expresión disminuida de *CFLAR*, *CASP10* y *PPP1R7* en líneas celulares derivadas de CaCu (61). La expresión de estos genes se restituyó en las líneas celulares después de exponerlas a agentes de-metilantes y a inhibidores de histona de-acetilasa (HDAC). A pesar de la relevancia de los datos generados en este trabajo, aún no se identifican cabalmente el o los genes supresores de tumor localizados en las regiones mínimas de deleción 2q35-q36.1 y 2q36.3-q37.1 cuya alteración resulta crítica para el desarrollo del CaCu (61). La figura 46 muestra algunos de los genes conocidos localizados en las regiones mínimas de deleción mencionadas. La imagen fue tomada del Navegador del Genoma Humano de la Universidad de California en Santa Cruz (genome.ucsc.edu).

Por otro lado, la alta prevalencia de amplificaciones en 3q, en particular la región 3q21, ha llevado al reciente desarrollo de una prueba basada en hibridación *in situ* fluorescente para la detección de amplificaciones del gen que codifica para el componente de RNA de la telomerasa (*TERC*) en lesiones del cérvix (96). Utilizando un grupo de sondas marcadas con tres fluorocromos diferentes, las cuales incluyen sondas del gen *TERC* y

Genes conocidos localizados las regiones mínimas de delección en CaCu

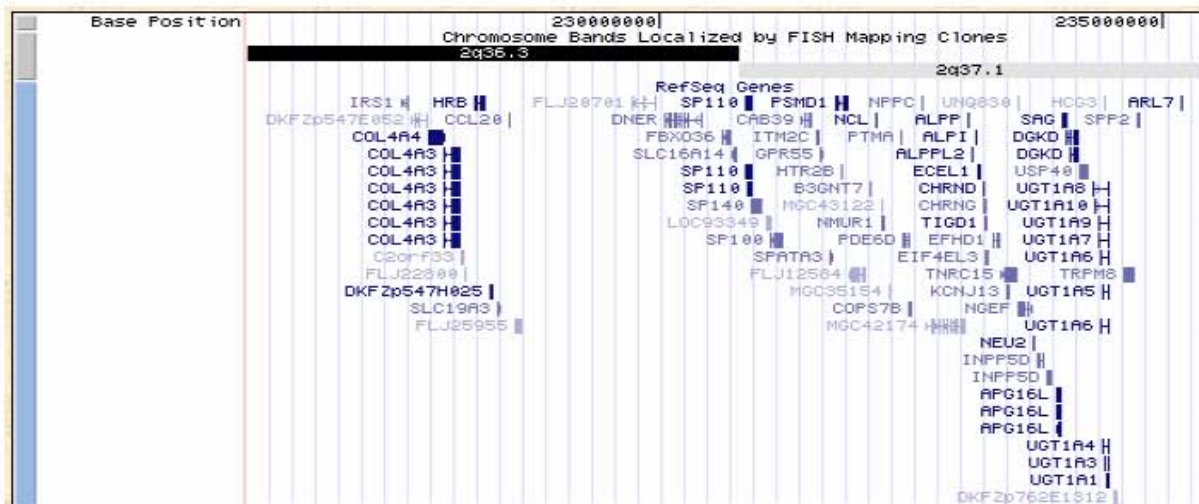
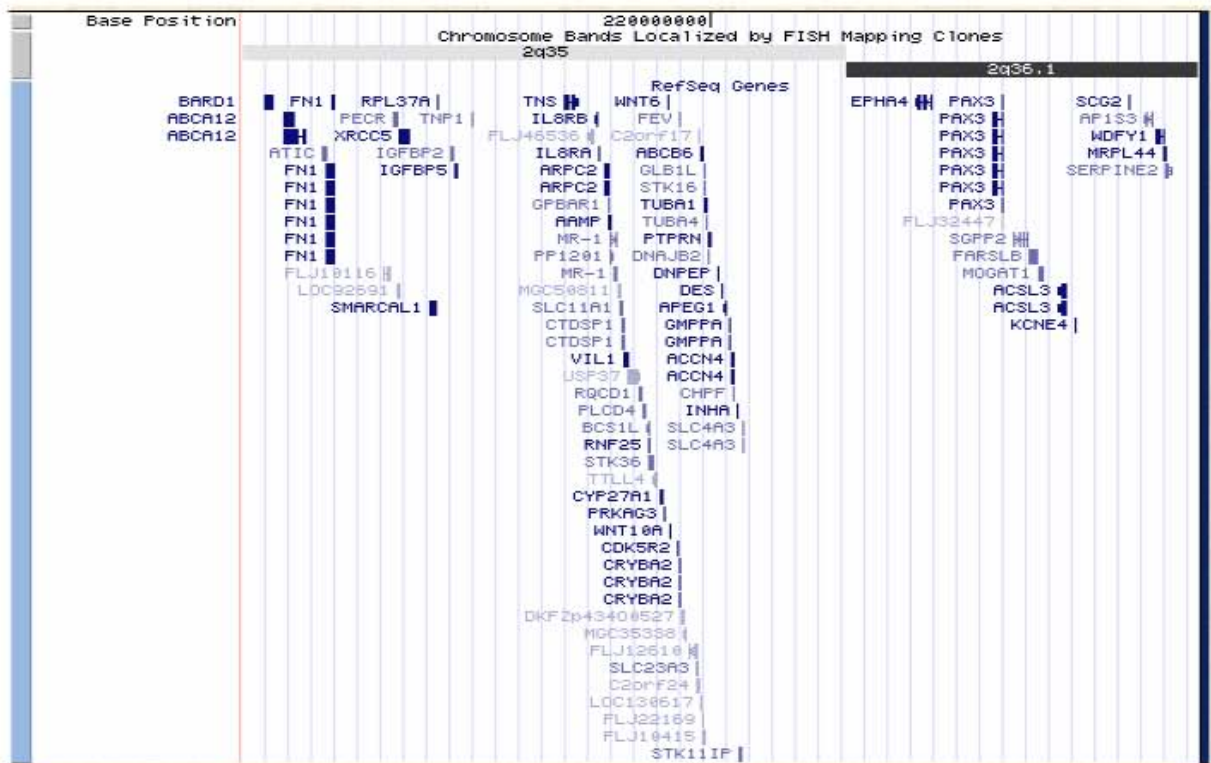


Figura 46. Genes localizados en las regiones mínimas de delección en las regiones cromosómicas 2q35-q36.1 y 2q36.3-q37.1, según el "Human Genome Browser" de la Universidad de California en Santa Cruz. El número en la parte superior de las gráficas indica la posición nucleotídica dentro del cromosoma, las barras gris y negra indican la banda citogenética, los genes en azul son los que se han ubicado dentro del genoma gracias a la base de datos "RefSeq", que constituye la secuencia de referencia del genoma humano.

centrómeros de los cromosomas 3 y 7, el cual rara vez sufre cambios en su número de copias en CaCu, se llevó a cabo un estudio en el cual se valoró la presencia de la amplificación de este gen en laminillas de papanicolau en capa fina, identificándose copias extras del gen fueron en el 15.4% (2 de 13) muestras normales, 0% (0/5) muestras con células escamosas atípicas, 7.1% (1/15) lesiones intraepiteliales de bajo grado (NIC), 62.5% (5/8) lesiones intraepiteliales de alto grado (grado 2, NIC2) y 76.4% (13/17) lesiones de alto grado con grado 3 (NIC3) (96). Gracias al uso de las sondas centroméricas, fue posible llevar a cabo también la valoración de un índice de inestabilidad cromosómica, el cual mostró una tendencia similar a la observada para la amplificación de secuencias de 3q, aumentando de acuerdo al grado histológico de la lesión. Esto sugiere que la ganancia de 3q puede surgir aun en células que son genéticamente estables, y que la inestabilidad cromosómica surge principalmente en lesiones con displasia severa (96). Asimismo, cuando se evaluó la ploidía, en base a los patrones de hibridación, se detectó tetraploidía en el 29% de las lesiones de bajo grado, en el 75% de los NIC2 y en el 73% de los NIC3. En algunos casos, a pesar de la existencia de tetraploidía, no se detectaron ganancias del 3q, mientras que en otros casos estas ganancias fueron detectadas tanto en células diploides como en células tetraploides, lo cual sugiere que la ganancia de estas secuencias puede darse antes de la tetraploidización, otorgándole a las células que adquiere esta característica una ventaja de crecimiento y provocando su expansión clonal. La detección de ganancias del gen *TERC* en células diploides que no presentan alteraciones detectables en su morfología, y que por lo tanto no serían detectables mediante análisis citológico, podría ser utilizada como una herramienta importante para determinar el riesgo relativo de una paciente a desarrollar una neoplasia cervical con mayor certeza que los métodos tradicionales de diagnóstico (96). Nuestros estudios indican que, además de la región donde se localiza

TERC, se están amplificando otras regiones y casi la totalidad del brazo largo del cromosoma 3, por lo que otros genes relevantes para el proceso de carcinogénesis deben estar también jugando un papel importante en el proceso de transformación neoplásica del cérvix uterino, los cuales podrían funcionar también como marcadores de progresión neoplásica. Un candidato interesante, localizado en la región 3q21, lo constituye el gen *NEK11* (Never in mitosis gene a – related kinase 11, 3q21.3), el cual juega un papel importante en el control de la mitosis y que se activa en células detenidas en G1/S (97). Este gen está involucrado en el control de la replicación de DNA y en la respuesta hacia insultos genotóxicos (98). El ortólogo de este gen en levadura, *Nek2*, juega un papel primordial en el control de la fosforilación de proteínas que coordinan la fidelidad en la segregación cromosómica (99), El análisis de la expresión de este gen en muestras derivadas de CaCu resultará de interés para determinar su posible papel en el desarrollo de las alteraciones citogenéticas observadas.

Análisis de los posibles efectos de los cambios en el número de copias de DNA en diversos procesos celulares.

El análisis de los procesos celulares cuyos genes sufrieron cambios en el número de copias nos brinda una predicción acerca de los posibles impactos de la pérdida y ganancia de DNA en el funcionamiento celular. No escapa de nuestra atención el hecho de que los hallazgos de HGC se limitan únicamente a alteraciones a nivel del DNA, esta información no nos indica si la expresión de los genes afectados sufre modificaciones o si las proteínas codificadas por los mismos son funcionales. Asimismo, este análisis se llevó a cabo únicamente *in silico*, y sólo podremos evaluar el impacto de las alteraciones en el funcionamiento de la célula hasta llevar a cabo experimentos de tipo funcional. Sin embargo, los resultados obtenidos en este tipo de análisis señalan algunos procesos

celulares que se saben alterados en CaCu, tales como la respuesta inmunológica, la adhesión celular o el control de la mitosis. Este último proceso resulta de particular importancia para la pregunta de la cual es objeto esta tesis. Los procesos de control de segregación cromosómica, tales como el control de la cohesión de las cromátidas hermanas durante la mitosis (GOID 7064) está entre los procesos que se detectaron con un número de genes alterados desde las lesiones pre-malignas, esta situación podría estar en parte explicando, con las reservas antes mencionadas acerca de que estos datos provienen de DNA, el surgimiento de alteraciones cromosómicas desde etapas muy tempranas de la progresión neoplásica. Entre los genes involucrados en mitosis que sufren alteraciones en las lesiones pre-malignas encontramos la amplificación del gen *CHC1* (Chromosome condensation 1, alias *RCC1*, 1p36.1), el cual está involucrado en la iniciación de la condensación cromosómica durante la fase S del ciclo celular, además de que forma parte de una cascada de señalización que sensa DNA no replicado (100). Otro de los genes amplificados en las lesiones pre-malignas es *MAD2DL* (*MAD2* mitotic arrest deficient-like 2 (yeast), 1p36), el cual es un componente del punto de control de ensamble del huso mitótico, que impide la entrada a mitosis hasta que todos los cromosomas se encuentren alineados (101). Por otro lado otros procesos afectados están involucrados en la respuesta inmunológica humoral, lo cual podría estar relacionado con la persistencia de la infección por VPH que se observa en pacientes que desarrollan lesiones invasoras después de mucho tiempo de estar infectadas por tipos virales de alto riesgo. Las tablas I y II presentan algunos de los genes localizados en las regiones alteradas, los cuales están involucrados en los procesos de segregación mitótica e inmunidad humoral. En muchos casos, los genes descritos en estas vías no han sido estudiados en CaCu, por lo que representan importantes blancos que abren nuevas perspectivas de investigación para comprender el proceso de carcinogénesis en este tejido.

Posibles mecanismos de generación de alteraciones cromosómicas

En base a los resultados reportados hasta la fecha, el desarrollo de aneuploidía en CaCu está precedido por la tetraploidización, aunque como vimos anteriormente, en algunos casos también se pueden dar amplificaciones cromosómicas en células diploides. La tetraploidización al parecer es el resultado de la interacción de las proteínas virales con la maquinaria de control de ciclo celular (102). Las proteínas virales tempranas E2 y E4 pueden provocar alteraciones en este sentido, la expresión de E2 en queratinocitos humanos normales, induce un incremento en el contenido de DNA superior a 4N, lo cual va acompañado de una importante reducción en los niveles de p53 debido a un mecanismo de inhibición post-transcripcional, indicando que E2 puede inducir varios ciclos de replicación de DNA sin que exista un evento mitótico intermedio, debido a la eliminación de un punto de control mitótico controlado por p53 (103). Esto, aunado a los cambios en número de copias de genes involucrados en los puntos de control de mitosis y de segregación cromosómica, podría traer como consecuencia las alteraciones cromosómicas detectadas en esta neoplasia.

Por otro lado, E2 es capaz de unirse al promotor de la reverso-transcriptasa de la telomerasa humana (hTERT), provocando la inhibición de su expresión (104). El papel de la telomerasa y de los telómeros en el proceso de transformación neoplásica ha sido ampliamente analizado (105), jugando ambos un papel muy importante en cuanto a su capacidad de suprimir o de inducir la carcinogénesis (106). En el análisis de la base de datos de CaCu que llevamos a cabo, detectamos alteraciones en regiones teloméricas de los cromosomas 2q, 3q, 4p, 5p y 11q en el 20% o más de los casos analizados, sugiriendo que, en algunos cromosomas la erosión del telómero podría estar jugando un papel importante en la generación de las alteraciones cromosómicas. Esto abre la posibilidad de llevar a cabo estudios en donde se mida el largo telomérico en lesiones

cervicales para determinar si la pérdida de secuencias en estas regiones está relacionada con la progresión de una lesión. Este tipo de análisis ya se han llevado a cabo en lesiones cervicales mediante metodologías basadas en el southern blot (107). Sin embargo, estos métodos presentan el inconveniente de que únicamente nos informan del largo telomérico promedio de las células de las cuales se ha purificado el DNA. Recientemente, se ha desarrollado un sistema que permite analizar el largo de los telómeros *in situ*, utilizando sondas de PNA (peptide nucleic acid, o bases nitrogenadas unidas mediante enlaces peptídicos), las cuales tienen una mayor estabilidad termodinámica y permiten una detección más específica de sus secuencias blanco. Estas sondas reconocen las secuencias teloméricas y permiten evaluar de manera semicuantitativa el largo de los telómeros en células individuales (108). Este método ha sido aplicado al estudio de lesiones pre-malignas de la próstata, mama y páncreas, así como en lesiones precursoras de la vejiga, intestino grueso, cavidad oral y cérvix uterino (109), detectándose alteraciones en los telómeros, principalmente acortamientos en el largo telomérico en el 88.6% de los casos, lo que sugiere que esta alteración es una de las primeras en presentarse durante la progresión neoplásica en tejidos epiteliales, pudiendo jugar un papel muy importante en el desarrollo de inestabilidad cromosómica en este tipo de neoplasias. Asimismo, estudios en modelos celulares han demostrado que el telómero más corto es el factor que desencadena el proceso de inestabilidad cromosómica, de ahí la importancia de medir la longitud telomérica de manera precisa en cada cromosoma durante la progresión del CaCu.

En el caso del cérvix, la expresión de hTERT se ha identificado de forma normal en queratinocitos ectocervicales primarios y en células epiteliales endo-cervicales (110) asimismo, transcritos de hTERT y del componente de RNA de la telomerasa (hTERC), han sido encontrados en el estrato basal del epitelio del ectocérvix mediante hibridación *in*

situ (111), indicando que la expresión y la actividad de la telomerasa resulta relevante en la biología normal del epitelio cervical, posiblemente manteniendo la estructura de los telómeros en las células madre epiteliales.

Hasta hace poco se pensaba que la expresión normal de hTERT estaba limitada a ciertos linajes celulares tales como los ya mencionados queratinocitos (112), los linfocitos (113) y las células madres hematopoyéticas (114). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que existe una regulación fisiológica del gen *hTERT* en la mayoría, si no en todas las células humanas en ciertas fases del ciclo celular (115). Una expresión aumentada de esta proteína ha sido detectada en células normales durante su transición a través de la fase S del ciclo celular. Esta expresión regulada de *hTERT* provoca una activación transitoria de la telomerasa, lo que sugiere que el mantenimiento activo de los telómeros es un proceso necesario para la proliferación de las células humanas normales. Es más, la inhibición de la expresión de *hTERT* durante la fase S en células normales altera la capacidad proliferativa y replicativa de las mismas, sin que esto resulte en una pérdida neta de las porciones de doble cadena de los telómeros, pero induciendo una pérdida acelerada del extremo 3' de cadena sencilla, la cual constituye una parte fundamental de la estructura o "lazo T" terminal de los telómeros. En una situación normal esto resultará en una entrada tardía en la fase S y una acumulación en las fases G2/M, así como un decremento en el tiempo de vida de las células debido a una entrada acelerada a la senescencia de las células donde se inhibe la expresión de *hTERT*. Por lo tanto, la inhibición de la expresión de hTERT en el epitelio cervical normal, puede traer como consecuencia una alteración en la estructura del capuchón (cap) telomérico, lo cual sería detectado como daño al DNA celular y desencadenaría el arresto celular, la senescencia o la apoptosis de estas células. Es aquí donde entran en juego las capacidades transformantes de E6 y E7. Además de proveer un fondo adecuado para permitir la

síntesis no planeada de DNA para replicar el genoma viral, la inactivación de las vías de p53 y Rb mediada por estas oncoproteínas virales, traerá como consecuencia una pérdida de la respuesta a la señal de daño al DNA, ya sea provocado por daño externo, daño endógeno o reconocimiento de daño debido a la degradación del cap telomérico. Como se mencionó previamente, en tumores cervicales y en células que expresan E6 y E7 se presentan diversas alteraciones que podrían provocar aneuploidía, entre ellos están la amplificación de centrosomas, la presencia de cromosomas rezagados o no alineados durante la metafase, la presencia de puentes en anafase sin que exista una pérdida neta del largo telomérico y de manera importante, se ha detectado que las oncoproteínas virales producen daño al DNA, ya que en estas células se detectan proteínas involucradas en la reparación de daño, entre ellas PARP (poly (ADP-ribosa) polimerasa) y g-H2AX (histona H2AX fosforilada), sin que se otorgue una explicación de donde o por que mecanismos podría estarse dando este daño (116). Algunas de las proteínas involucradas en la reparación de daño a DNA también han sido localizadas en telómeros que han sufrido alteraciones en la estructura de su “cap”, al parecer debido al reconocimiento de los telómeros no cubiertos como rompimientos de doble cadena (117). En fibroblastos normales, este punto de control inducirá la senescencia celular, el detenimiento del ciclo o la apoptosis mediada por p53 y al parecer, de Rb. De manera interesante, en fibroblastos que expresan E6 y E7 se observan anomalías en los cromosomas y fusiones teloméricas, las cuales pueden ser suprimidas mediante la expresión de proteínas que conforman el cap telomérico (118).

De esta forma, la pérdida de los puntos de control mediados por p53 y Rb permitirán la sobrevivencia de células con un alto potencial de transformación, ya que el DNA telomérico no protegido estará expuesto a procesos moleculares que normalmente se aplican a rompimientos de cadena doble dentro de los cromosomas, tales como fusión de

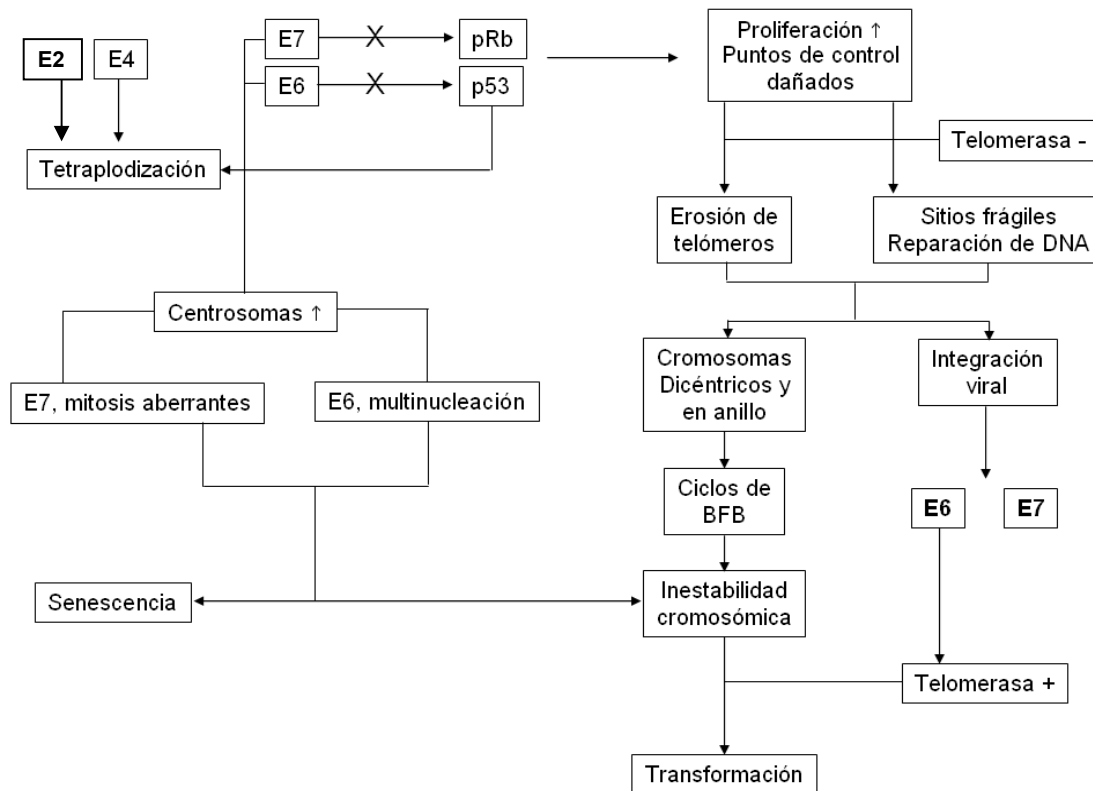
los extremos libres, degradación o eventos de recombinación que generarían fusiones teloméricas. Por lo tanto, las dos consecuencias genómicas principales provocadas por la pérdida de la protección del cap telomérico serían: A) la formación de cromosomas dicéntricos o multicéntricos, los cuales formarían puentes en anafase y se verían sujetos a ciclos de rompimiento-fusión-rompimiento cuando la célula se divida, lo cual resultará en aneuploidía y, B) la pérdida potencial de información genética debida a la degradación de las regiones terminales de los cromosomas cuyos telómeros están expuestos.

En el caso de la carcinogénesis del cérvix uterino, la inhibición de la expresión de la telomerasa en las células epiteliales normales, mediada desde etapas muy tempranas de la infección por la expresión de la proteína viral E2, podría estar provocando un cambio en la estructura y el estado de los telómeros de la célula infectada. Asimismo, la expresión de E2 y E4 puede estar jugando un papel en la generación de una población celular con contenido genómico tetraploide, la cual es más susceptible de presentar aberraciones cromosómicas posteriormente. Las alteraciones en la ploidía y los cambios en la estructura telomérica, son elementos potenciales que podrían desencadenar el surgimiento de aberraciones cromosómicas. Gran parte de las células con alteraciones cromosómicas serán detectadas y destruidas mediante procesos de apoptosis o de senescencia celular, sin embargo, un grupo de células, tal vez en aquellas donde exista una expresión elevada de las oncoproteínas virales E6 y E7 debido al fenómeno de integración viral, no tendrán la capacidad de iniciar estas respuestas protectoras, debido a la interferencia que ejercen estas oncoproteínas virales sobre las moléculas supresoras de tumor Rb y p53, las cuales constituyen controles maestros de la detección de daño y la reparación de DNA, además de jugar papeles muy importantes en los procesos de apoptosis y senescencia celular.

Para el caso de las lesiones pre-malignas, se presentan alteraciones en las regiones teloméricas de los cromosomas 2, 4 y 11, asimismo, como ya lo mencionamos los tumores invasores presentan algunos picos en el histograma de alteraciones cromosómicas en regiones teloméricas y sub-teloméricas, lo que podría ser evidencia de que el proceso descrito anteriormente esta jugando un papel en la generación de alteraciones cromosómicas durante la progresión del carcinoma cérvico uterino. Recientemente se han llevado a cabo estudios que analizan los diferentes componentes de la maquinaria de mantenimiento de telómeros (expresión temporal de la telomerasa, largo telomérico y respuesta en diferentes puntos de control durante el ciclo celular) durante la progresión de lesiones precursoras a carcinoma invasor del cerviz (119). Los telómeros mostraron un acortamiento significativo en todas las muestras pre-malignas y no se observaron mayores acortamientos en los tumores invasores. La presencia de telómeros muy cortos se asoció con una actividad constitutiva de la vía de respuesta de daño a DNA y a una proliferación celular incrementada. Por otro lado, la expresión de hTERT se vio preferencialmente en los casos de NIC III (noeplasia intraepitelial cervical grado 3) y en los tumores invasores. Esto sugiere que el acortamiento telomérico se presenta de manera predominante en las etapas iniciales de la carcinogénesis cervical, mucho antes de la activación de la telomerasa y que una vez activada la expresión de esta proteína, el largo telomérico se estabiliza en los tumores invasores (119). Otro estudio reciente (120), indica que la presencia de aneuploidización e inestabilidad cromosómica precede al evento de integración viral, y que la inestabilidad puede ser provocada por alteraciones en el control de la expresión de los oncogenes virales, aún cuando el genoma viral se encuentre en forma de episoma. Esta inestabilidad facilitaría a su vez el evento de integración viral, con la consiguiente pérdida del control de la expresión de las oncoproteínas virales, otorgándole a las células que presentan

aneuploidía e integración del genoma viral, una ventaja replicativa que les permitirá progresar hacia lesiones con un mayor grado de capacidad invasora (120). Finalmente, se ha demostrado que la expresión de E6 de VPH 16 provoca el acortamiento telomérico y la aparición de puentes en anafase, es decir, al erosionarse el telómero hasta un punto crítico, los extremos de los cromosomas se fusionan, por lo tanto, durante la división celular, los cromosomas fusionados no son capaces de segregarse adecuadamente, formando “puentes” durante la mitosis, estos puentes representan material genético de ambos cromosomas fusionados, el cual se somete a fuerzas de tensión que provoca su rompimiento durante la segregación, lo cual puede traer como consecuencia pérdida o ganancia de material genético en las células hijas. Este proceso desencadenará ciclos de fusión-rompimiento-fusión, los cuales podrían ser el mecanismo por el cual se generan las alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu.

Lo anteriormente expuesto apoya el modelo propuesto en este trabajo, en donde sugerimos que la erosión telomérica es uno de los factores iniciales que podrían permitir el surgimiento temprano de alteraciones cromosómicas y del fenotipo de inestabilidad genómica en CaCu, promoviendo la aparición de un fenotipo transformado. La figura 47 describe un diagrama por el cual proponemos que podrían estar generándose las alteraciones cromosómicas detectadas en esta tesis.



Posibles mecanismos de adquisición de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu. Las células epiteliales normales infectadas con VPH de alto riesgo pueden sufrir alteraciones que modifican el control de la expresión de las proteínas virales. Esta situación permitirá la expresión no regulada de las oncoproteínas E6 y E7, aun cuando el genoma viral se encuentre en forma episomal, esto resultará en una mayor capacidad proliferativa, el surgimiento de mitosis aberrantes y células multinucleadas debido a alteraciones en el ciclo de replicación de centrosomas, la tetraploidización, erosión telomérica y aparición de ciclos de rompimiento-fusión-rompimiento (ciclos BFB), lo cual traerá como consecuencia la inestabilidad cromosómica y la aneuploidía. A su vez, la inestabilidad cromosómica favorecerá la expresión de sitios frágiles y la integración del genoma viral. En una gran cantidad de casos, como lo evidencia el largo período de latencia de las lesiones pre-malignas antes de que se desarrolle un tumor invasor, las células pre-malignas serán eliminadas a través del proceso de senescencia celular. En las células que sobreviven, el fenómeno de integración viral provocará la pérdida en el control de la expresión de E6 y E7, las cuales provocarán alteraciones en un gran número de procesos celulares a través de su interacción con proteínas celulares, tal como es el caso de la inactivación de las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb, permitiendo también la reactivación de la expresión de la telomerasa, lo que resulta en la estabilización del largo telomérico y otorga a las células con genomas aberrantes una fuerte ventaja replicativa, lo cual les permitirá ser preferencialmente seleccionadas como una de las clonas que darán lugar al crecimiento tumoral.

Conclusiones y perspectivas

En este trabajo de tesis se conjuntaron y aplicaron metodologías de análisis genómico de alto rendimiento para el análisis de las alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu. Gracias a la colaboración con diferentes grupos nacionales e internacionales (documentos anexos), fue posible transferir y establecer en nuestro laboratorio las metodologías de HGC en metafases y en microarreglos, construir una base de datos de alteraciones cromosómicas en CaCu, acceder y utilizar herramientas bioinformáticas adecuadas para el minado y explotación de los datos biológicos.

Los resultados obtenidos en esta tesis, así como datos generados por otros grupos, demuestran la existencia de un patrón de alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu. Nuestros resultados apoyan la idea de que la alteración en una sola región citogenética, la amplificación de 3q, difícilmente puede ser suficiente para desencadenar la progresión. Esta alteración, a pesar de ser muy relevante como potencial prueba de diagnóstico y pronóstico, debe ser tomada en cuenta junto con otras aberraciones cromosómicas que se dan en etapas tempranas de la progresión. Este tipo de alteraciones se presentan desde etapas muy tempranas de la progresión neoplásica y podrían también ser utilizadas para desarrollar pruebas que permitan definir la capacidad potencial de progresión de una lesión premaligna particular. Por otro lado, el análisis con microarreglos nos permitió definir de una forma más discreta la identidad de los genes particulares que sufren cambios en su número de copias en esta neoplasia, revelando posibles marcadores moleculares que serán susceptibles de ser analizados en una mayor cantidad de muestras clínicas utilizando otras metodologías, tales como arreglos de tejido. Por otro lado, el análisis bioinformático de las diversas bases de datos generados en este trabajo, permitió definir la posible secuencia de alteraciones durante el proceso de

transformación neoplásica, así como el efecto potencial de los cambios en número de copias de DNA en diversos procesos celulares.

De esta forma, este trabajo de tesis ha permitido desarrollar un modelo de progresión neoplásica en el CaCu basado en las alteraciones cromosómicas detectadas mediante HGC. Como se mencionó en la introducción, en 1999 se propuso un modelo de progresión en donde las lesiones pre-malignas no presentaban alteraciones citogenéticas, siendo la primera alteración en detectarse la amplificación de 3q en carcinomas invasores. El trabajo desarrollado en esta tesis indica que esta alteración se presenta desde lesiones pre-malignas y que debe interactuar con otras aberraciones cromosómicas para permitir la evolución de una neoplasia cervical (Figura 48). El uso de los microarreglos de HGC permite ahora determinar la identidad de posibles genes marcadores que se ubican en esta región, tales como los genes *RBP1-RBP2* (retinol binding protein 1 y 2, 3q21-q22) y *p63* (Tumor protein 63, 3q27-q29), así como los genes *DAB2* (disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (*Drosophila*), 5p13) o *EGFR* (Epidermal growth factor receptor, 7p12.3-p12.1, localizados en regiones citogenéticas con un alto grado de amplificación en CaCu.

De esta forma este trabajo abre nuevas posibilidades de investigación que analicen el papel de estos genes en el proceso de transformación neoplásica del cérvix uterino. No escapa de nuestra atención el hecho de que es necesario llevar a cabo experimentos que validen la utilidad de estos posibles marcadores de progresión, para lo cual proponemos que en un futuro se lleven a cabo estudios que involucren la evaluación del número de copias de cada uno de ellos en muestras derivadas de lesiones con diferentes grados de progresión, estos experimentos podrían llevarse a cabo utilizando metodologías de hibridación *in situ* sobre DNA con sondas de los marcadores potenciales, o mediante experimentos de PCR en tiempo real, comparando tejidos normales contra lesiones

cervicales. Otra estrategia potencial de análisis del papel de las alteraciones cromosómicas durante la progresión del CaCu la constituye el llevar a cabo experimentos diseñados para evaluar la expresión de proteínas involucradas en los procesos de segregación mitótica y en mecanismos de mantenimiento de telómeros en lesiones del cérvix con diferentes grados de progresión, así como experimentos que permitan evaluar de manera funcional los mecanismos de las alteraciones inducidas en el control de la estabilidad cromosómica por las diferentes proteínas virales. Este punto resulta de particular relevancia a la luz de los datos experimentales obtenidos recientemente por diversos grupos de investigación, los cuales sugieren que una de las alteraciones más tempranas durante la progresión del CaCu la representa la presencia de aneuploidía y la inestabilidad cromosómica, las cuales pueden ser provocadas por la expresión alterada de oncoproteínas virales, aun cuando el genoma viral se encuentre como un epitoma.

Una vez identificados y validados genes específicos que sufran alteraciones en su número de copias y en sus patrones de expresión, se deberán llevar a cabo experimentos que nos permitan evaluar la funcionalidad de los mismos en modelos celulares de CaCu, con la finalidad de determinar su papel biológico en el proceso de la carcinogénesis cervical. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante experimentos que permitan la re-expresión controlada de los genes deletados o la eliminación de la expresión de genes amplificados y sobre-expresados, mediante experimentos de RNA de interferencia.

De esta forma, este trabajo sienta las bases de la identificación de nuevos blancos génicos que pueden estar jugando un papel en la progresión del CaCu, abriendo nuevas perspectivas de investigación para determinar el papel funcional de estas alteraciones en el mecanismo de la carcinogénesis cervical y señalando estos marcadores como blancos potenciales de la progresión neoplásica.

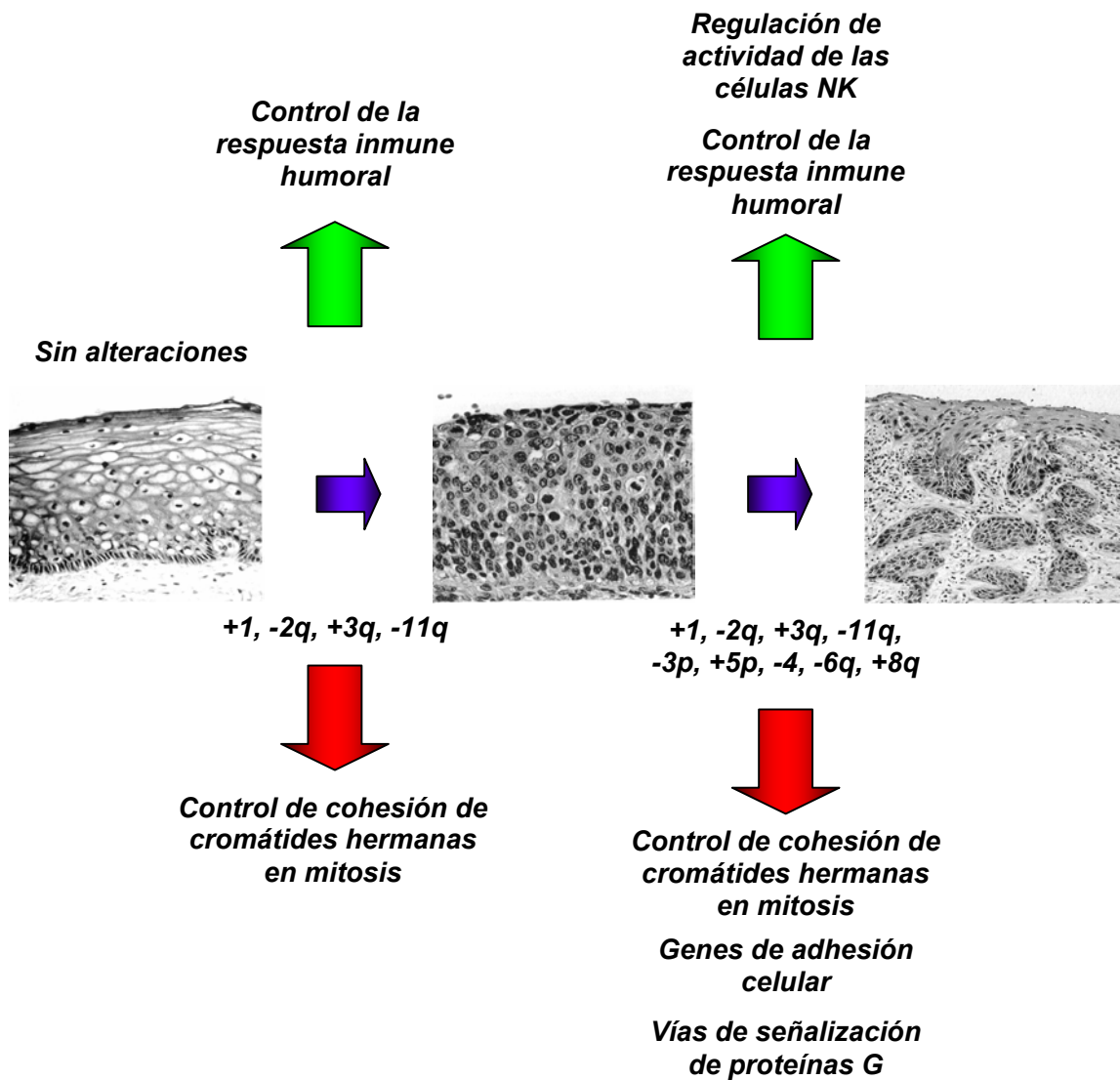


Figura 48

Modelo de progresión neoplásica en CaCu. Alteraciones cromosómicas específicas se detectan desde etapas muy tempranas de la progresión, pudiendo afectar procesos celulares de vital importancia para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica y para la eliminación de la infección viral o de las células infectadas por VPH



Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumour cell lines

A. Hidalgo^{a,b}, C. Schewe^a, S. Petersen^a, M. Salcedo^b, P. Gariglio^c, K. Schlüns^a,
M. Dietel^a, I. Petersen^{a,*}

^a*Institute of Pathology, University Hospital Charité, Schumannstrasse 20–21, D-10098 Berlin, Germany*

^b*Oncological Diseases Research Unit, National Medical Center S-XXI, IMSS, Mexico City, Mexico*

^c*Department of Genetics and Molecular Biology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico*

Received 26 July 1999; received in revised form 18 October 1999; accepted 20 October 1999

Abstract

Human papilloma virus (HPV) infection is the crucial step in the initiation of cervical carcinomas. In addition, HPV18 has been implicated in tumour progression and adverse clinical outcome. We determined the HPV types in 12 primary cervical carcinomas and 12 cell lines and compared the findings with the comparative genetic hybridisation (CGH) pattern of chromosomal alterations. The most frequent alteration was the deletion at 3p14 followed by the loss of 2q34–q36 along with 3q gain. High risk HPV types were detected in all samples except one primary tumour. In contrast to the normal distribution, HPV18 was present in 75% of cases including all cell lines. The cell lines carried a higher number of genetic alterations and a different CGH pattern for several chromosomes than the primary tumours, despite microdissection. Purely HPV18 positive cases indicated a high incidence of imbalances at specific loci with peaks of the histogram coinciding with known HPV integration sites. The study suggests that HPV infection is associated with a recurrent pattern of chromosomal changes in cervical carcinomas and that the development and progression of these alterations is triggered by integration into the host genome. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: CGH; Cervical carcinoma; HPV; Chromosomal imbalances

1. Introduction

Uterine-cervical carcinoma represents the second most common malignancy in women worldwide, both in incidence and mortality. More than 471 000 new cases are diagnosed every year, especially amongst the economically disadvantaged in developing and industrialised nations [1]. In Mexico this neoplasm represents the primary cause of death amongst the female population. Even when there are diverse known factors that might be related to the development of this tumour, including the number of living births, number of sexual partners, first sexual intercourse at an early age and smoking [2], human papilloma virus (HPV) infection is considered to be the initiating event in cervical epithelial transformation [3]. More than 100 HPV types have been identified [4], and high risk HPV types account for more

than 80% of all invasive cancers and are already detectable in cervical intra-epithelial neoplasia [5]. HPV infection deregulates cell cycle control via interaction of viral oncoproteins and cellular tumour suppressor proteins, and this phenomenon seems to be critical for cell immortalisation. However, only a fraction of HPV infected patients develop cancer, suggesting that infection, viral oncogene expression and HPV integration must cooperate with a specific genetic background of the host to initiate the multistep process of cervical carcinogenesis [6].

Several studies have addressed this issue using different approaches, including cytogenetics [7], loss of heterozygosity [8] and, more recently, comparative genomic hybridisation (CGH). CGH has led to a model in which gain of chromosome arm 3q is regarded as the specific chromosomal alteration involved in the progression from severe dysplasia to invasive carcinoma of the cervix. Since the 3q gain is usually maintained in advanced tumour stages it represents one of the most prevalent changes associated with disease progression [9–12].

* Corresponding author. Tel.: +49-30-2802-2611; fax: +49-30-2802-3407.

E-mail address: iver.petersen@charite.de (I. Petersen).

In the present study, we analysed 12 primary invasive squamous cell carcinomas (SCC) of the cervix together with 12 cervical SCC-derived cell lines by CGH and HPV-typing in order to detect genetic alterations associated with infection status and tumour progression.

2. Material and methods

2.1. Tissue samples

Paraffin-embedded tumour material was collected from hysterectomies performed between 1994 and 1997 at the Institute of Pathology of the University Hospital Charité, Berlin, Germany. Tumours were staged and classified according to the guidelines of the International Union Against Cancer (UICC) and the World Health Organisation (WHO). After diagnosis on a haematoxylin and eosin (H&E) stained slide, defined tumoral tissue areas were microdissected from 25 serial sections each about 5 µm thick, totalling around 125 µm of tissue. Microdissection was performed manually without the use of a microscope. After deparaffinisation, DNA was isolated by proteinase K digestion and phenol-chloroform extraction.

2.2. Cell lines

The 12 cell lines studied were established at the National University of Mexico from IIa and IIb stage tumours derived from 120 tumour explants by standard procedures [13]. The clinicopathological data of the cell lines and the primary tumours is summarised in Table 1.

2.3. HPV detection and typing

HPV infection status was assessed by polymerase chain reaction (PCR), using the consensus primers for the L1 region MY 09 (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3') and MY11 (5'-Biotin-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3'), where M = A + C, R = A + G, W = A + T, Y = C + T [14]. After denaturation at 94°C for 5 min, 40 amplification cycles were performed at 94°C for 1 min, 55°C for 2 min and 72°C for 3 min with a final extension step of 7 min at 72°C. These conditions yield consistently an amplicon of approximately 450 base pairs. The specificity of the PCR products and their typing were established using the hybrid capture method (DIGENE Corp., Beltsville, USA). Briefly, upon hybridisation with a specific single-stranded RNA probe to the 5'-biotinylated PCR product, the specific RNA:DNA hybrids were bound to the surface of streptavidin-coated microwells and detected by an enzyme linked anti-hybrid antibody assay. Two probe mixtures were used in pre-screening experiments to discriminate

low and high risk HPVs. The HPV RNA probe A (low risk group) correspond to types 6, 11, 42, 43, and 44 and the probe B (high risk group) to the types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 and 58. The high risk group responsive samples were subsequently examined in an identical way with single RNA probes for the types 16, 18, 31, 33 and 35, respectively. In each case, the DNA quality was checked by amplification of the β-globin genomic sequence. DNA samples of the same extraction were used both for HPV typing and CGH analysis.

2.4. CGH analysis

The protocols for CGH preparation have been described previously and are available on our web site at <http://amba.charite.de/cgh/>. Similarly, image acquisition and digital image analysis were performed as previously described. Briefly, 10 to 15 metaphases/karyograms were analysed per tumour sample with computation of CGH sum-karyograms and mean ratio profiles with confidence intervals [15–17]. Normal reference DNA was derived from peripheral blood leucocytes of female donors. Hybridisations were done on to commercially purchased male metaphase spreads (Vysis). The sex chromosomes were generally excluded from the numerical evaluation of DNA imbalances.

Table 1
Clinicopathological and genetic parameters of the tumour collective

Case	pTNM	FIGO	HPV	Gains	Losses	Σ
G1	pT4 pN1	IVa	None	12	13	25
G2	pT4 pN1	IVa	16	21	13	34
G3	pT1b pN1	Ib	18	10	10	20
G4	pT1b pN0	Ib	16; 18	9	13	22
G5	pT2b pN1	IIb	16	12	11	23
G6	pT1b pN0	Ib	16	6	7	13
G7	pT1b pN0	Ib	18	22	8	30
G8	pT2b pN0	IIb	16; 18	14	12	26
G9	pT1b pN0	Ib	16; 18	8	10	18
G10	pT4 pN0	IVa	18	22	17	39
G11	pT2b pN0	IIb	33	15	7	22
G12	pT1b pN0	Ib	16	9	9	18
T1	pT2s	IIa	18	15	19	34
T2	pT2b	IIb	18	18	14	32
T3	pT2b	IIb	18	17	11	28
T4	pT2b	IIb	18	14	21	35
T5	pT2a	IIa	18	17	11	28
T6	pT2b	IIb	18	13	9	22
T7	pT2a	IIa	18	17	11	28
T8	pT2a	IIa	16; 18	10	10	20
T9	pT2b	IIb	18	23	16	39
T10	pT2b	IIb	18	22	17	39
T11	pT2b	IIb	18	16	11	27
T12	pT2b	IIb	18	10	14	24

HPV, human papilloma virus; G, primary tumours; T, cell lines; FIGO, staging system according to the Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique; Σ, number of changes.

2.5. Determination of chromosomal imbalances

DNA gains and losses were determined by statistical methods, i.e. deviations of the mean FITC:TRITC profiles from the normal ratio of 1.0 were tested for significance by a Student's *t*-test. In this test we required at least a significance of 95% to score an alteration as a DNA gain or loss. After the statistical determination of the chromosomal imbalances of each sample using 95% and 99% significance in the Student's *t*-test, a histogram for all cases was calculated. It included all samples and represented the incidence of DNA gains and losses of the sample group along all chromosomes, showing gains at the right of the ideogram and losses at the left of the ideogram, e.g. the maximum value of 100% is reached if all samples of the group carry an imbalance at a specific chromosomal region. The two significances are indicated by distinct colours: blue areas indicate those alterations with 99% significance whereas the green areas include those with 95% significance. Pronounced DNA gains and losses were defined as those alterations for which the ratio profiles exceeded the values of 1.5 and 0.5, respectively. They most likely represent high copy number amplifications or multi-copy deletions. In Figs. 1 and 2 they are shown in red.

3. Results

The histopathological data of the primary tumours and cell lines, together with the HPV status and the numerical analysis of the CGH findings are summarised in Table 1.

3.1. HPV genotyping

DNA from the microdissected areas was subjected to PCR amplification for HPV genotyping. In the primary tumours HPV16 was detected in 4 of 12 cases, HPV18 in 3, HPV16/18 coinfection in 3, HPV33 in one sample and only one tumour did not carry the HPV sequences. All the cell lines presented HPV18, in one case with coinfection of HPV16. As a control of the DNA quality for PCR, all samples were successfully amplified for the β -globin genomic sequence.

3.2. CGH analysis

The results of the primary tumours and cell lines are summarised in Tables 1 and 2. Individual ratio profiles can be viewed and combined to CGH histograms on our homepage <http://amba.charite.de/cgh/>. On average,

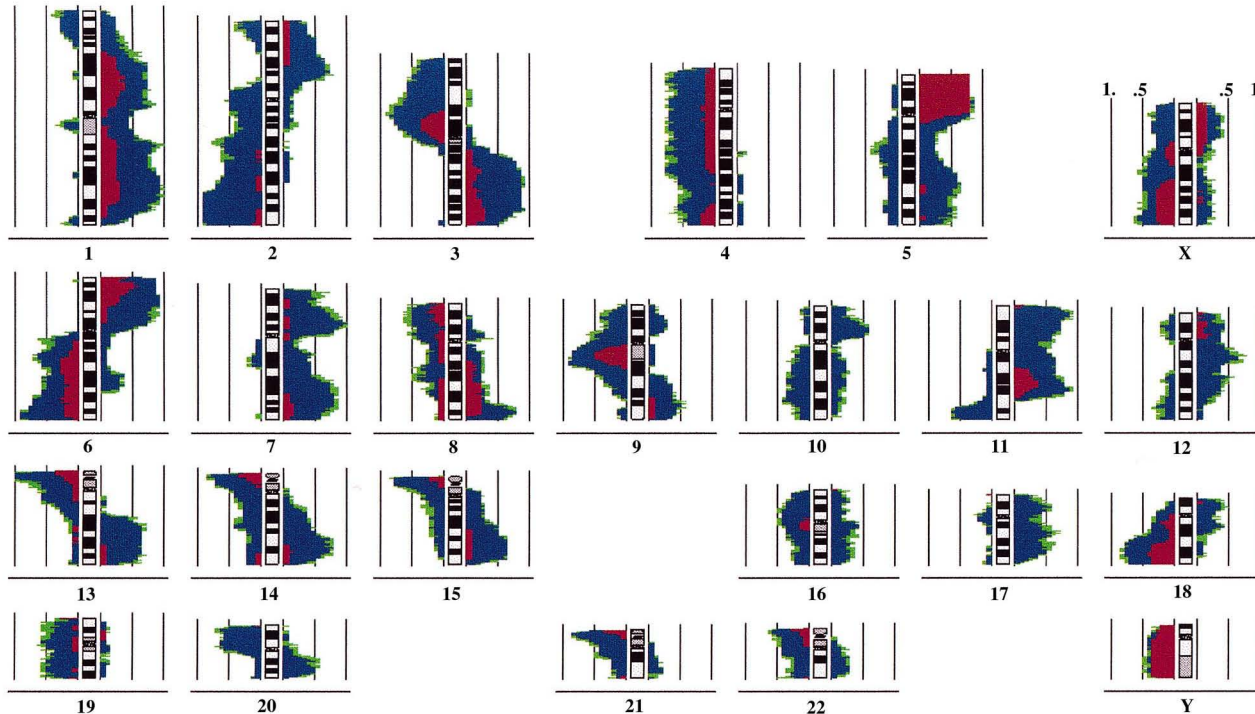


Fig. 1. Summary of the genetic alterations of 24 cervical carcinomas, i.e. 12 primary tumours and 12 tumour cell lines, in a histogram presentation. Areas on the left side of the corresponding chromosome ideogram demonstrate the relative number of cases with DNA losses, whereas over-representations of genetic material in the samples are shown to the right of the ideograms. The percentage of cases with changes that are significant with a confidence of 99% are shown in blue, the percentage of cases with alterations of confidence between 95% and 99% are shown in green, regions where the imbalance exceeded the 1.5 and 0.5 threshold are shown in red. Heterochromatic areas (centromeric and paracentromeric regions of chromosomes 1, 9, 16, p arms of acrocentric chromosomes) were excluded from the analysis.

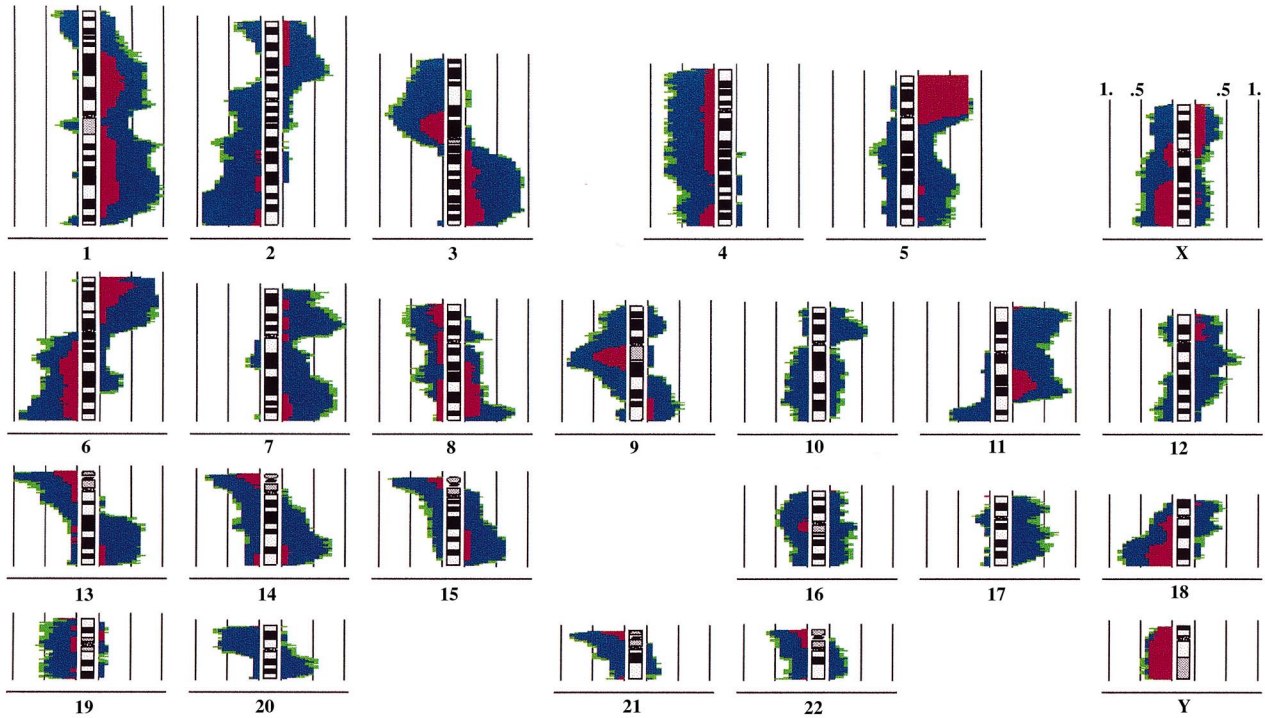


Fig. 2. Histogram of all genetic alterations of the purely HPV18 positive cases including 14 cases, i.e. 3 primary tumours and 11 cell lines. Representation of DNA gains and losses, as well as the confidence intervals are the same as in Fig. 1. Interestingly, some chromosomal alterations are present in more than 85% of the cases, suggesting a possible relationship between these alterations and HPV18 infection.

our tumour collective carried 27 aberrations per case, i.e. 15 gains and 12 losses. Cell lines presented a higher number of genetic imbalances ($\Sigma = 30$) than the primary tumours ($\Sigma = 24$). All cases presented alterations and samples with advanced tumour stages (for the most part) showed a higher number of aberrations.

The CGH histogram of all 24 cases, representing the incidence of chromosomal imbalances determined by

statistical analysis is shown in Fig. 1. The highest frequency of alterations was observed at chromosome 3p14 being present in up to 20 cases (83%) followed by gain at 3q and loss at 2q34-q36 in 19 cases (79%). Additional alterations with at least 30% incidence are listed in Table 2.

Generally, the pattern of imbalances for the majority of the chromosomes was similar between the primary

Table 2
Chromosomal imbalances in squamous cell carcinomas of the cervix

	DNA underrepresentations	DNA overrepresentations
Primary tumours (n = 12)		
High incidence changes ($\geq 50\%$)	2q22-q23, 2q32-qter, 3p, 4, 5q14-q23, 5q32-q33, 6q12-qter, 11q23-qter, 13q21-q32.	1p21-p22, 1p31-pter, 1q21-q24, 3q, 14q21-q23, 16p11.1-p13.2, 16q12.2, 16q22-q23, 17q21-qter, 19, 20q11.1-q13.2, 22q12-q13
Less prevalent changes ($> 30\%$, $< 50\%$)	2q22-q32, 7q32-qter, 11q14-q23, 13q32-qter, 18q22	1p11-p13, 1p22-p31, 1q25-q42, 2p11.2-p22, 5p, 7p13, 7q11.2-q11.3, 8q, 9p21, 9q22, 11p11.1-p13, 12q13, 14q24-q31, 15q21-q26
Pronounced changes ^a	3p25-p26, 6q14-q26, 11q21-qter, 18q22	3q22-q23, 3q26.1-qter, 5p12-p15, 11q14-q22, 19p13.1-p13.2
Cell lines (n = 12)		
High incidence changes ($\geq 50\%$)	2q, 3p11-p21, 4, 6q, 8p, 11q24-qter, 14q22, 16p11.2-p13.1, 18q12-qter, 19, 20p	1p13-p31, 1q12-q42, 2p14-p21, 3q13.2-qter, 5p, 5q21-q34, 6p, 7p12-pter, 7q21-qter, 8q24.1-qter, 10p11.2-p12, 11p12-pter, 11q12-q22, 12q12-q13, 13q21-qter, 14q24-q32, 15q24-qter, 17p12, 17q21, 20q13.1-q13.3.
Less prevalent changes ($> 30\%$, $< 50\%$)	1p35-pter, 2p25-pter, 3p21-p24, 8q21.1-q21.3, 9p13-p23, 10q21-q25, 14q12-q21, 16q11.2-q21	1q43-qter, 5q21, 6q22-q23, 8q23, 14q23, 17q12-q24
Pronounced changes ^a	3p11-p14, 4p11-q26, 4q32-qter, 6q16-qter, 8p21-p23, 18q11, 18q21-qter	1p13-p31, 1q21-q41, 3q22, 3q26.1-qter, 5p11-pter, 8q22-q24.3, 11q14-q22, 12p11-p13, 14q31
HPV18 tumours (n = 14)		
$> 90\%$ incidence	2q33-qter, 3p12-p14, 6q27	1q31-q32, 3q22-q26.3, 5p14, 6p21.3-p22, 7p13-p14

^a DNA gain with ratio > 1.5 , DNA loss with ratio < 0.5 , only those alterations which occurred at least twice were listed.

tumours and cell lines. The cell lines, however, carried a higher proportion of pronounced gains in particular, but also pronounced losses, indicating high copy DNA amplifications and multi-copy deletions as summarised in Table 2. They also showed more extensive deletions, e.g. for chromosomes 2q, 8p and 18q. In addition, there were notable differences for several chromosomes, particularly for 3p, 5, 6p, 7, 11, 13, 16, 19 and 20.

For chromosome 3p, the primary tumours showed more deletions of the telomeric part whereas the cell lines harboured more underrepresentations of the centromeric part. For chromosome 5, the short arm was amplified in most cell lines whereas, unlike in the primary tumours, 5q was rarely lost. Similarly, chromosomes 6p and 7 carried more amplifications and overrepresentations in the cell lines. Deletions of the telomeric part of chromosome 11 was higher in the primary tumours, whilst the cell lines presented more amplifications of 11p and also the centromeric part of 11q. Chromosome 13 including the telomeric part 13q21-qter was more frequently lost in the primary tumour cases, whilst the cell lines presented more amplifications at the 13q21-24 region. There was a high proportion of gains in chromosome 16 in the primary tumours, whereas losses predominated in the cell lines. Whilst primary tumours showed chromosome 19 gains, cell lines presented more often losses of this chromosome. Deletions on 20p were observed exclusively in the cell lines.

A histogram of all the purely HPV18 positive cases, representing 11 cell lines and 3 primary tumours is presented in Fig. 2. We observed an incidence of more than 90% for the DNA gains at 1q31-q32, 3q22-q26.3, 5p14, 6p21.3-p22 and 7p13-p14, as well as the DNA losses at 2q33-qter, 3p12-p14 and 6q27. In addition, the histogram carried several peaks of the incidence curve, e.g. at 8q24.2, 12q13 and 18q21-q22.

4. Discussion

Uterine cervical carcinoma is characterised by a recurrent pattern of chromosomal imbalances [9–12], however, their importance in tumour progression and their relation to HPV types has not been fully explored.

4.1. HPV and chromosomal alterations

In this study we observed a high incidence of chromosomal imbalances at specific chromosomal regions in the HPV18 positive cases. All these loci have been described as HPV integration sites or fragile sites within the genome [18–22]. Specifically, the 7p13-p14 region has been shown to harbour a transcribed human sequence related to HPV18 *E5* gene, named *pe5l*, suggesting that *pe5l* is a target for HPV recombination and

integration [23]. HPV18 integration sites in the HeLa cell line are colocalised with *c-myc* amplicons at 8q24 and throughout the cell's genome, indicating that integration preceded amplification [24]. Other recurrent chromosomal alterations, including specific deletions and amplifications have also been observed near HPV integration points [25]. HPV immortalised cells have already developed several specific chromosomal aberrations, some of which have also been detected in HPV positive tumour samples [26–28]. Incidence studies around the world indicate that HPV16 is present in 50% of the tumours, followed by HPV18 (14%) [5]. The primary tumours of our study were derived from German patients and presented with a similar HPV distribution. However, the cell lines derived from Mexican patients did not present this expected pattern. This situation cannot be explained by a higher prevalence of HPV18 in this population since HPV type distribution in Mexico is not significantly different from the rest of the world [29]. Studies in Mexico indicate that HPV18 is preferentially observed in invasive cervical carcinoma cases [30]. Similarly, HPV18 positive tumours have been associated with a worse prognosis in contrast to other HPV types [31]. This is a possible explanation for the observed prevalence of HPV18 in the cell lines, since cell cultures can generally be established more easily from aggressive primary tumours and their genetic alterations are known to reflect those that are important for tumour progression. Interestingly, prevalent changes of HPV18 positive tumours like the DNA gains on 1q31-q32, 8q24 and deletions on 3p12-p14, 4pter, 6qter correlate with those alterations which we previously found to be significantly associated with the metastatic phenotype of lung SCC providing a putative explanation for the worse prognosis of HPV18 tumours [32].

4.2. Incidence of DNA imbalances in cervical carcinomas

There is no consensus yet on the best way to determine DNA changes by CGH. Many laboratories prefer fixed thresholds for scoring DNA gains and losses often using different values for DNA samples derived from archival tissue (formalin-fixed, paraffin-embedded) and viable cells. We used instead a statistical procedure which is more sensitive for scoring chromosomal imbalances than frequently used fixed thresholds like 0.85 and 1.15 (16, 32, data not shown). The reasons for this are manifold. Fixed thresholds are still arbitrary although they may have resulted from control experiments; the quality of the hybridisation and thus the fluorescence signal used for digital image analysis is influenced by many factors of which formalin-fixation and paraffin-embedding are only two. There are samples from archival tissue with excellent signals whereas high quality DNA samples may also give poor results. Thus,

in our view, it is not justified to generally apply distinct threshold values for different kinds of DNA samples; there is considerable evidence recently that statistical evaluation is more accurate and thus, the method of choice [33,34]. The histogram of Fig. 1 was calculated by scoring significant deviations of the ratio profile from the normal value 1.0 according to the Student's *t*-test using 95 and 99% significance levels. It is based on the analysis of all 24 cervical carcinomas and indicates the incidence of DNA gains and losses at specific chromosomal sites providing an overview of those regions that are characteristically affected in this tumour. In our view, the histogram representation is the most appropriate way to visualise the chromosomal imbalances of large tumour collectives. Even the results of several hundred cases can be demonstrated which is impossible by a line representation. In contrast to sum ratio profiles, the histogram provides much richer information on the incidence of an imbalance at a particular chromosomal site and also allows the representation of pronounced DNA gains and losses correlating with high copy amplifications or multicopy deletions. Both, sum profiles and line representations which are still useful for small collectives can be viewed at our CGH online tumour database web site. Histograms can also be calculated by using fixed ratio thresholds. Since we recently implemented the final part of our custom-made CGH software (the so-called CGH-Super Program for the calculation of histograms, sum ratio profiles, line representations, difference histograms, etc.) in Java, any reader may visualise and explore our data via the Internet at <http://amba.charite.de/cgh/>. Importantly the same data set can be analysed by the different evaluation schemes that are currently used for determining chromosomal imbalances by CGH, i.e. statistical methods and fixed thresholds. These thresholds can be adjusted offering each reader/user the possibility to compare our results with their own using their personal method of evaluation.

The increased sensitivity of our method does correlate with the higher incidence of imbalances and, in particular, of deletions that we observed in this study compared with previous ones [9–12]. Our previous studies showed an excellent agreement of CGH findings when either control experiments like inverse labelling or additional molecular genetic tests were applied (e.g. 15, 17). Therefore, we believe in the validity of the present data even though no additional analysis was applied.

The alteration with the highest incidence was the deletion at chromosome 3p14. This is in agreement with earlier studies by allelotyping, pointing to the importance of this chromosome region in the very early stages of tumorigenesis [8].

Other studies reported that the 3q gain is present in almost all carcinomas (90%), although it was reported in only 1 of 13 severe dysplasia [9]. Investigations of

dysplasia alone revealed no gain on chromosome 3q [11]. This has led to a model in which the 3q gain is considered the key alteration in the transition to invasive carcinomas. However, our results suggest that the deletion on chromosome 2q34-q36 is as important as the 3q gain since it occurred with the same frequency.

4.3. Comparison of primary tumours and cell lines

We observed a higher number of alterations in the cell lines compared with the primary tumours. This might be explained by several reasons. Primary carcinomas are often a mixture of tumour tissue, inflammatory cells and normal stroma thus, decreasing the percentage of tumour cells compared with pure cell lines. However, the influence of normal cell contamination was largely excluded by microdissection. In addition, intratumoral genetic heterogeneity might also decrease the sensitivity for detecting certain alterations. Since the primary tumours exhibited a considerable variability of HPV types and also a higher frequency of viral coinfections we feel that tumour heterogeneity is indeed more pronounced in the primary tumours compared with the cell lines and may thus, reduce the sensitivity of the detection of DNA imbalances. Moreover, CGH analysis using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue might yield less intense fluorescence signals than DNA derived from viable cells or from fresh frozen tissue. However, since we evaluated only high quality hybridisations from formalin-fixed samples and also applied a very sensitive method for the determination of chromosomal alterations, we are convinced that this factor did not have a significant influence on the number of chromosomal changes. As mentioned above, cell lines generally represent more advanced tumour stages which carry more genetic changes than early stage tumours. Finally, cell lines may also select for and accumulate additional genetic changes during cell culturing.

For several chromosomes we found a different CGH pattern in both tumour types. We observed more extended deletions and smaller size amplifications in the cell lines compared with the primary tumours. A similar pattern was observed during the progression of lung squamous cell carcinomas to a metastatic stage, again corroborating the observation that cell lines generally represent more aggressive tumours [32].

In summary, this study further supports the evidence that cervical carcinomas are characterised by a recurrent pattern of chromosomal alterations with specific imbalances being important for tumour initiation and progression. In addition, it supports the assumption that these chromosomal changes are triggered by the integration event suggesting that HPV integration is a necessary step for tumour initiation. Finally, it points to the possible association between specific HPV types and distinct genetic lesions.

References

1. Cervical Cancer, NIH Consensus Statement. 1996 **14**, 1–38.
2. Brisson J, Morin C, Fortier M, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol* 1994, **140**, 700–710.
3. International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 64. Human Papillomaviruses*. Lyon, IARC, 1995.
4. Zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996, **2**, 55–78.
5. Bosch FX, Manos FM, Munoz M, et al. Prevalence of human papillomavirus in human cervical cancer, a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995, **87**, 796–802.
6. Magnusson P, Sparen P, Gyllensten U. Genetic link to cervical tumors. *Nature* 1999, **400**, 29–30.
7. Atkin NB. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: a review. *Cancer Genet Cytogenet* 1997, **95**, 33–39.
8. Mullokandov M, Kholodilov N, Atkin N, Burk R, Johnson A, Klinger H. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papilloma virus tumor status. *Cancer Res* 1996, **56**, 197–205.
9. Heselmeyer K, Schröck E, Du Manoir S, et al. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine-cervix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**, 479–484.
10. Heselmeyer K, Macville M, Schröck E, Blegen H, Hellstrom AC, Shah K. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, **19**, 233–240.
11. Aubele M, Zitzelsberger H, Schenck U, Walch A, Höfler H, Werner M. Distinct cytogenetic alterations in squamous intraepithelial lesions of the cervix revealed by laser-assisted microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer* 1998, **84**, 375–379.
12. Kirchhoff M, Rose H, Petersen BL, et al. Comparative genomic hybridization reveals a recurrent pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma *in situ* of the cervix and in advanced-stage cervical carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999, **24**, 144–150.
13. Urdiales J, Gariglio P, Salcedo M, Chavez P, Mendez M, Weiss B. *Characterisation of cells originated from carcinomas of the uterine cervix. XVII World Congress of anatomic and clinical pathology. Mexico, 1993*. Bologna, Italy, Monduzzi Editore.
14. Ting Y, Manos M. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, eds. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. New York, San Diego, Academic Press, 1990, 356–367.
15. Petersen I, Langreck H, Wolf G, et al. Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q, and 17p. *Br J Cancer* 1997, **75**, 79–86.
16. Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A. Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1997, **57**, 2331–2335.
17. Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I. Image analysis for comparative genomic hybridization by a windows based karyotyping program. *Anal Quant Cytol Histol* 1997, **19**, 461–474.
18. Popescu N, DiPaolo J. Preferential sites for viral integration on mammalian genome. *Cancer Genet Cytogenet* 1989, **42**, 157–171.
19. Lazo P, Gallego M, Ballester S, Feduchi E. Genetic alterations by human papilloma viruses in oncogenesis. *FEBS Letters* 1992, **300**, 109–113.
20. Popescu N, DiPaolo J. Integration of human papillomavirus 16 DNA and genomic rearrangements in immortalized human keratinocyte lines. *Cancer Res* 1990, **50**, 1316–1323.
21. Reuter S, Bartelmann M, Vogt M, et al. APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *EMBO J* 1998, **17**, 215–222.
22. Durst M, Croce CM, Gissmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, **84**, 1070–1074.
23. Geisen C, Delius H, Lichter P, Kahn T. A transcribed human sequence related to the mouse HCl and the human papillomavirus type 18 E5 genes is located at chromosome 7p13-14. *Hum Mol Genet* 1995, **4**, 1337–1345.
24. Macville M, Schröck E, Padilla-Nash H, et al. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* 1999, **59**, 141–150.
25. Gallego MI, Lazo PA. Deletion in human chromosome region 12q13-15 by integration of human papilloma virus DNA in a cervical carcinoma cell line. *J Biol Chem* 1995, **270**, 24321–24326.
26. Solinas-Toldo S, Dürst M, Lichter P. Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus transfected cells during progression toward immortality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**, 3854–3859.
27. Savelieva E, Belair CD, Newton MA, et al. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 1997, **14**, 551–560.
28. Steenbergen D, Walboomers J, Meijer C, et al. Transition of human papillomavirus type 16 and 18 transfected human foreskin keratinocytes towards immortality: activation of telomerase and allele losses at 3p, 10p and/or 18q. *Oncogene* 1996, **13**, 1249–1257.
29. Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998, **70**, 115–120.
30. Hernandez-Avila M, Lazcano-Ponce EC, Berumen-Campos J, Cruz-Valdez A, Alonso de Ruiz PP, Gonzalez-Lira G. Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-control study. *Arch Med Res* 1997, **28**, 265–271.
31. Burger R, Monk B, Kurosaki T, et al. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996, **88**, 1361–1368.
32. Petersen S, Aninat-Meyer M, Schlüns K, Gellert K, Dietel M, Petersen I. Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *Br J Cancer*, 2000, **82**, 65–73.
33. Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998, **31**, 163–173.
34. Moore DH, Pallavicini M, Cher ML, Gray JW. A *t*-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 1997, **28**, 183–190.

Research article

Open Access

Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma derived cell lines

Alfredo Hidalgo¹, Alberto Monroy², Rosa Ma Arana³, Lucía Taja⁴,
Guelaguetza Vázquez¹ and Mauricio Salcedo*¹

Address: ¹Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Mexico, ²Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer, FES Zaragoza, UNAM, Mexico, ³Servicio de Genética, Hospital General de México, SS, Mexico and ⁴División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, SS, Mexico

Email: Alfredo Hidalgo - alfhm@yahoo.com; Alberto Monroy - albertomon@yahoo.com; Rosa Ma Arana - aranat@prodigy.net.mx; Lucía Taja - ltaja_chayeb@yahoo.com; Guelaguetza Vázquez - guelav@yahoo.com; Mauricio Salcedo* - maosal89@yahoo.com

* Corresponding author

Published: 20 March 2003

Received: 20 January 2003

BMC Cancer 2003, 3:8

Accepted: 20 March 2003

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/3/8>

© 2003 Hidalgo et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article: verbatim copying and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original URL.

Abstract

Background: Uterine cervix carcinoma is the second most common female malignancy worldwide and a major health problem in Mexico, representing the primary cause of death among the Mexican female population. High risk human papillomavirus (HPV) infection is considered to be the most important risk factor for the development of this tumor and cervical carcinoma derived cell lines are very useful models for the study of viral carcinogenesis. Comparative Genomic Hybridization (CGH) experiments have detected a specific pattern of chromosomal imbalances during cervical cancer progression, indicating chromosomal regions that might contain genes that are important for cervical transformation.

Methods: We performed HPV detection and CGH analysis in order to initiate the genomic characterization of four recently established cervical carcinoma derived cell lines from Mexican patients.

Results: All the cell lines were HPV18 positive. The most prevalent imbalances in the cell lines were gains in chromosomes 1q23-q32, 3q11.2-q13.1, 3q22-q26.1, 5p15.1-p11.2, this alteration present as a high copy number amplification in three of the cell lines, 7p15-p13, 7q21, 7q31, 11q21, and 12q12, and losses in 2q35-qter, 4p16, 6q26-qter, 9q34 and 19q13.2-qter.

Conclusions: Analysis of our present findings and previously reported data suggest that gains at 1q31-q32 and 7p13-p14, as well as losses at 6q26-q27 are alterations that might be unique for HPV18 positive cases. These chromosomal regions, as well as regions with high copy number amplifications, coincide with known fragile sites and known HPV integration sites. The general pattern of chromosomal imbalances detected in the cells resembled that found in invasive cervical tumors, suggesting that the cells represent good models for the study of cervical carcinoma.

Background

Cervical carcinoma stands as the first cause of death among the Mexican female population with 14 deaths per 100,000 women with 15 years old or more, representing

34.2 % of all new female cancer cases reported [1]. High risk human papillomavirus (HPV) infection is considered to be the most important risk factor associated with the

Table 1: Chromosomal imbalances detected in hpv18 positive cell lines

Cell line	Tumor stage	DNA Losses	DNA Gains	Total
CALO	II-B	1pter-p32, 2q35-qter, 4pter-p15.2, 4q32-qter, 5q33-qter, 6q24-qter, 8pter-p22, 8q24.2-qter, 9q32-qter, 11q12, 12p13, 12q22-qter, 13q12, 15q11.2-q12, 16p, 16q22-qter, 17, 18q11, 19, 20, 21, 22. Total: 21	1p31-p12, 1q22-q31, 2p15, 2q21-q32, 3p22, 3q11.2-q26.3, 4q26-q31.2, 5p, 5q11.2-q23, 6q22, 7p15-p12, 7q21-q31, 9p23-p21, 11q14-q22, 12p11.2, 12q15-q21, 13q21-q31, 18q12. Total: 18	39
VIPA	II-A	1p32-pter, 2p24, 2q35-qter, 4p15.3-pter, 4q33-qter, 5q33-qter, 6q25-qter, 7p22, 7q33 qter, 8p21-pter, 9q32-qter, 10p13-pter, 10q24-qter, 11q12, 12p13, 12q22-qter, 14q31-qter, 16p, 16q13-qter, 17, 18q22, 19, 20p13, 20q, 21q22, 22. Total: 26	1p12-p22, 1q23-q32, 2q21-q32.3, 3p22, 3p13-p12, 3q13.1-q13.3, 3q22-q25, 4q13, 4q22-q31.3, 5p, 5q11.2-q12, 5q14-q23, 6p12-p21.1, 6q12-q16, 7p12-p21, 7q21-q31, 8q21.1-q22, 9p21-p22, 10q21, 11p13, 11q14-q22, 12p11.2, 12q14-q21, 13q 14-q31, 14q12-q13, 15q21. Total: 26	52
INBL	IV-A	2q34-qter, 4p, 4q32-qter, 6q24-qter, 8p22, 13q12, 18p21-pter, 19p13.2-pter. Total: 8	1q12-q41, 3q12-q26.3, 5p, 6p24-p22, 6p21.1-p11.1, 7p14-p11.1, 7q21-q31, 11p15, 11q21, 12q12, 15q22-q24. Total: 11	19
ROVA	IV-A	1p35-pter, 2p25, 2q35-qter, 3q29-qter, 4p16, 5q35, 6q26-qter, 7p22, 8p23, 8q24.1-qter, 9q33-qter, 10q26, 12p13, 12q24.1-qter, 16p, 16q22-qter, 17p12-pter, 17q23-qter, 18q22-qter, 19, 20q13.1-qter, 21q22, 22q. Total: 23	1p12-p31, 1q22-q32, 2p11.2-p16, 2q21-q33, 3p12-p22, 3q13.1-q26.3, 4p12-p15.2, 4q12-q31.3, 5p12-p15.1, 5q11.2-q31, 6p22-p23, 6p12-p, 6q12-q15, 6q22, 7p12-p15, 7q21-q31, 8p22, 8q13, 9p21-p23, 9q21, 11p14, 11q14-q24, 12p12, 12q12-q21, 13q14-q31, 14q11.2-q24, 15q15-q21, 15q24, 18q11.2-q12. Total: 28	51
Average		19.5	20.7	ANCA:40.2

All tumors were diagnosed as squamous cell carcinomas. ANCA: Average Number of Chromosomal Aberrations, obtained dividing the total number of observed alterations between the total number of cases.

development of this tumor, and is present in 99.7% of the invasive cervical tumors worldwide [2].

Comparative Genomic Hybridization (CGH) is a method employed in cancer genomics that allows the detection of DNA gains or losses at the genome level in a single hybridization experiment, indicating cytogenetic regions that might be involved in the transformation process. CGH has detected a specific pattern of chromosomal imbalances associated with particular stages of cervical transformation, and with different biological behaviors [3–10]. In this paper, we evaluated the presence of HPV DNA and analyzed the pattern of chromosomal imbalances using CGH in four cell lines established from tumor explants of Mexican patients. The establishment and research use of two of these cell lines has been previously reported [11,12]. Further genomic characterization of these lines will open new possibilities for understanding cervical carcinoma, since the coincidence between the chromosomal imbalances present in these cell lines and patterns found in cervical tumors indicate that they are good models for the study of cervical cancer.

Methods

The cell lines were established from stages IIA and IVA squamous cell cervical carcinoma explants from Mexican females (Table 1) at the National University of Mexico, as

previously described [11,12]. Cell lines were designated CALO, INBL, VIPA and ROVA.

HPV detection was done using the L1 consensus primers MY09/MY11. After denaturation at 94°C for 5 minutes, 100 ng of DNA were subjected to 40 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 2 min and 73°C for 3 min, with a final extension step of 7 min at 72°C. The amplicon was labeled using the Big Dye kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and sequenced with an ABI 373 automated sequencer. BLAST sequence comparison was done in order to know the HPV type.

All CGH procedures were performed using reagents and kits from Vysis Inc. (Downers Grove, IL), following the manufacturer's instructions. Cell line DNA was labeled using the CGH nick translation kit, and the hybridization mixture was prepared according to the CGH reagent kit, consisting of 200 ng of spectrum-green labeled cell line DNA, 100 ng of spectrum-red labeled normal male reference DNA and 20 µg of human Cot-1 DNA. Hybridization was performed over 3 days at 37°C on normal male metaphase spreads (Vysis, Downers Grove, IL).

Digital images were collected using the Smart Capture (Vysis) software with a charged coupled device camera mounted on an epifluorescence microscope. An average of 15 metaphases per case were analysed using the Vysis

CGH software using a >1.2 ratio threshold for detecting DNA gains and <0.8 for losses, these thresholds were chosen based on previous normal VS. normal hybridizations. Sex chromosomes and heterochromatic areas (centromeric and paracentromeric regions of chromosomes 1, 9, 16, p arms of acrocentric chromosomes) were excluded from the analysis. A "reverse painting" experiment was used as a control for the CGH results. CGH data from the cell lines is available at the NCI and NCBI Spectral Karyotyping (SKI) and CGH Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/skyweb.cgi>.

Results and Discussion

HPV DNA was detected in all the cell lines. Sequence analysis identified HPV18 in all the samples. All the cell lines presented chromosomal imbalances. A line summary ideogram of the chromosomal imbalances in the cell lines is presented in Figure 1. A complete description of the imbalances detected in each cell line is presented in Table 1. On the average, 19.5 DNA losses and 20.7 gains were detected in the samples, with an average number of chromosomal aberrations of 40.2 alterations per case, ranging from 52 alterations in VIPA to 19 alterations in INBL. The most prevalent imbalances were gains in chromosomes 1q23-q32, 3q11.2-q13.1, 3q22-q26.1, 5p15.1-p11.2. This alteration is present as a high copy number amplification in three of the cell lines, 7p15-p13, 7q21, 7q31, 11q21, and 12q12, and losses in 2q35-qter, 4p16, 6q26-qter, 9q34 and 19q13.2-qter. Comparison between chromosomal imbalances in these cell lines and those found in cervical tumors; indicate the presence of common genetic alterations, suggesting that they represent their tissue of origin. These common regions include gains in 3q22-q26.2 and 5p, and losses on 2q35-qter, 4q32-qter and 18q. Some of these alterations have been detected in early stages of cervical transformation and are conserved in advanced tumors or have been associated with the presence of metastases and with a worse clinical behavior [6,7,10], making the cells good models for the study of genes involved in the maintenance of the transformed phenotype. Compared with the imbalances previously found on HPV18 positive cases [9], there is coincidence for the DNA gains at 1q31-q32, 3q22-q26.3, 5p14 and 7p13-p14, as well as in DNA losses at 2q33-qter and 6q26-q27. Differences among the cell lines and data from invasive cervical tumors were also found. For example, we did not find deletions of 3p or 11q regions in the cell lines. This situation might be explained by the enrichment or selection of a particular cell clone during the cell line establishment.

A common observation in uterine cervix carcinomas is the integration of HPV DNA into the cellular genome. However, the consequences of this integration event are only poorly understood. Differences in the frequency of HPV18 and HPV16 integration have been detected, 72%

of the HPV16 tumors presented viral integration, while HPV18 positive tumors had viral integration in 100% of the cases [13,14]. This is a possible explanation for the observed HPV18 incidence in the studied cell lines, since the integration event might represent a growth advantage for the cell in culture. Analysis of our present findings and previously reported data suggest that gains at 1q31-q32 and 7p13-p14, as well as losses at 6q26-q27 are alterations that are unique for HPV18 positive cases. HPV integration at the 1q31-q32 has been found in nasal epithelial cells immortalized with HPV16 DNA and also contains the short tandem repeat region F13B [15]. The NEK7 (NI-MA (never in mitosis gene a)-related kinase 7, 1q31.3) gene is located in this region and plays an important role in the control of mitosis initiation [16]. The role of this gene in human cancer has not been explored. Regarding the 7p15-p13 region, a lymphocyte fragile site has been detected at 7p13, high copy number amplification of this region was also found by us in primary cervical carcinomas [9] and gain of 7p was also found in HPV transfected cells during the immortalization process [4]. The PE5L gene, (7p13-p14) presents a sequence homology with the HPV18 E5 gene, making this gene a possible target for recombination and viral integration [17]. However, alignment of the PE5L sequence against the November 2002 freeze of the Human Genome working draft, showed the best matching score on 7p11.2 (not shown). The public availability of viral-cellular fusion transcripts or DNA sequences, combined with data from the human genome, will certainly help to better define areas of viral integration for further investigation.

The lost cytogenetic region 6q26 comprises the fragile site FRA6E, the third most frequently observed common fragile site. Deletion of the 6q26-q27 region has been found in approximately 44% of all tumor types analyzed by CGH [18], and in cervical carcinoma loss of heterozygosity was found 39% of the cases [19]. An interesting gene located in this region is the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4), a major mediator of environmental stresses that activate the CSBP2 MAPK pathway, which, in turn, regulates the expression of TNF and several cytokines, and controls the initiation of the G2/M checkpoint after UV radiation [20].

We also found high copy number amplifications in regions 7q21, 7q31, 11q21 and 11q12. Region 7q21 contains the rare, folic acid type FRA7E fragile site and a cellular-HPV fusion transcript has been detected at this area, with no sequence match to a known gene [21]. 7q31 has been reported to be the site of a chromosomal breakpoint in cervical carcinoma cell lines [22] and contains the c-Met oncogene, whose over-expression has been correlated to the diameter of the primary tumor, deep cervical stromal invasion, presence of metastatic lymph node and

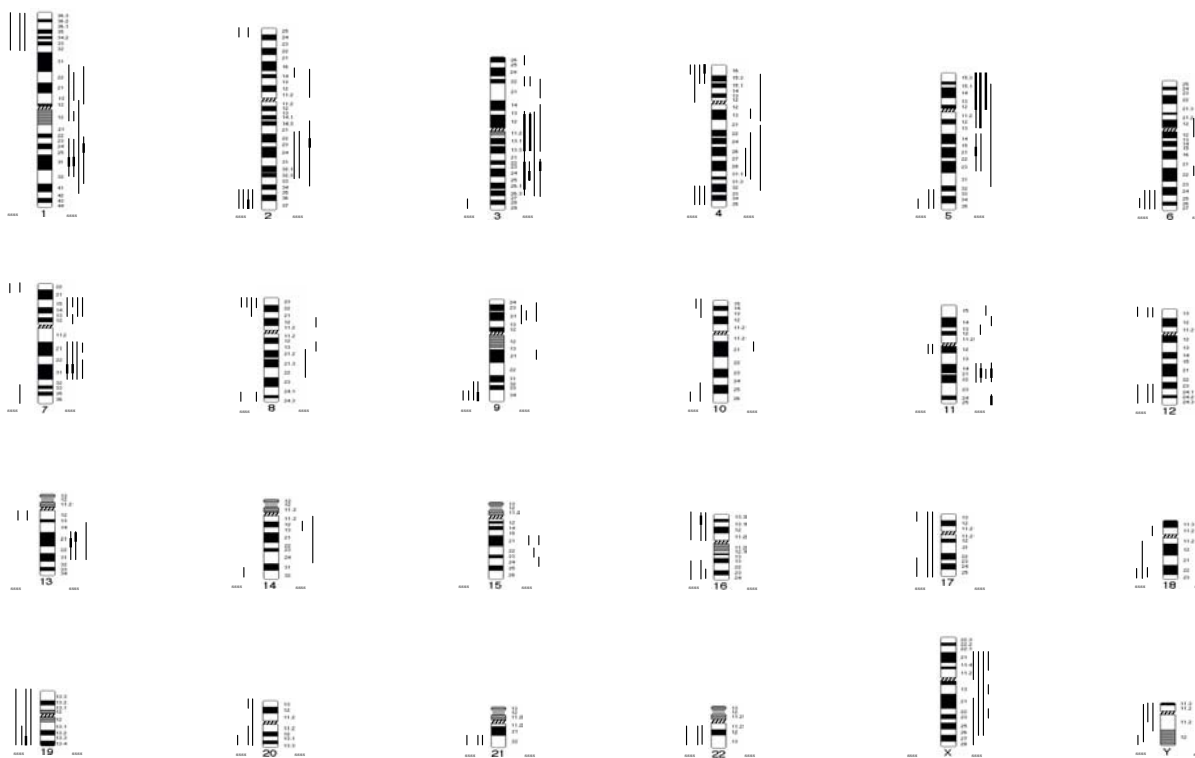


Figure 1

CGH ideograms of the genetic imbalances detected in the cell lines. The lines at the right of the chromosome ideogram represent DNA gains, lines at the left, DNA losses. Thick lines represent high copy number amplifications or multi copy deletions (ratio >1.4 or <0.6). The mark closest to the ideogram represents the cell lines CALO, followed by VIPA, INBL and ROVA.

number of metastatic lymph nodes [23]. The 11q21-q22 region was also found in our cell lines, this region has been found amplified in some cervical carcinoma cell lines and over-expression of the cIAP1 gene, an apoptosis inhibitor and possible target of the amplification, was related to a poorer overall survival and local recurrence-free survival in cervical carcinoma [24].

It is interesting to notice that almost all of the possible HPV18 related sites of chromosomal imbalance, as well as the regions with high copy number amplifications in our cell lines correspond to the location of fragile sites in the human genome. Since HPV integration preferentially seems to target these kind of fragile sites, it is possible that HPV18 is integrated into these altered chromosomal regions in our cell lines. Recently, a comprehensive charac-

terization of cervical cancer cell lines gave very useful information about specific chromosomal alterations, DNA gains, losses and clusters of chromosome breakpoints in cervical cancer cell lines and their relation to HPV presence and integration [24]. Currently, such a characterization of our newly established cell lines is being carried out.

Conclusions

High throughput genetic analysis often require vast amounts of tissue that sometimes is not available, making the cell lines the model of choice to overcome this problem. Here, we report the presence of HPV18 and the pattern of chromosomal imbalances detected in four newly established uterine cervix carcinoma derived cell lines. The pattern of genetic imbalances in these cell lines sug-

gest that they represent good models for cervical carcinoma and HPV18 infection, providing another useful cellular model for the discovery and functional analysis of genomic alterations involved in cervical cancer when this viral type is present.

List of abbreviations

CGH: Comparative Genomic Hybridization. HPV: Human Papilloma virus. SKI: Spectral karyotyping

Competing interests

None declared.

Authors contributions

AH: Carried out the CGH experiments and data analyses, writing and designing paper and figures. AM: Cell line establishment. RMA: CGH metaphase analyses. LT: Cell cultures and DNA extraction. GV: HPV typing. MS: Design and coordination of the study.

Acknowledgments

This work was partially funded by grants from the CONACyT (34686-M) and IMSS (FP-2001/043). AH, GV and LT are recipients of a CONACyT scholarship and AH and GV receive a DGEP-UNAM and IMSS scholarships.

References

- Mexican Ministry of Health **Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, Compendio de mortalidad y morbilidad**. Secretaría de Salud, México 1998.
- Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch X, Kummer A, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C and Muñoz N **Human Papilloma Virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide**. *J Pathol* 1999, **189**:12-19
- Heselmeyer K, Schröck E, Du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G and Ried T **Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:479-484
- Solinas-Toldo S, Dürst M and Lichter P **Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus transfected cells during progression toward immortality**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:3854-3859
- Kirchhoff M, Rose H, Laub B, Maahr J, Gerdes T, Lundsteen C, Bryndorf T, Kryger N, Christensen L, Aage S and Philip J **Comparative genomic hybridization reveals a recurrent pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma in situ of the cervix and advanced-stage cervical carcinoma**. *Genes Chrom Cancer* 1999, **24**:144-150
- Allen D, White D, Hutchins A, Scurry J, Tabrizi S, Garland S and Armes **Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer**. *Br J Cancer* 2000, **83**:1659-1663
- Dellas A, Torhorst J, Jiang F, Proffitt J, Schultheiss E, Hotzgreve W, Sauter G, Mihatsch M and Moch H **Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization**. *Cancer Res* 1999, **59**:3475-3479
- Kirchhoff M, Rose H, Petersen B, Maahr J, gerdes T, Philip J and Lundsteen C **Comparative genomic hybridization reveals non-random chromosomal aberrations in early pre-invasive cervical lesions**. *Cancer Genet Cytogenet* 2001, **129**:47-51
- Hidalgo A, Schewe C, Petersen S, Salcedo M, Gariglio P, Schlüns K, Dietel M and Petersen I **Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines**. *Eur J Cancer* 2000, **36**:542-548
- Umayahara K, Numa F, Suehiro Y, Sakata A, Nawata S, Ogata H, Suminami Y, Sakamoto M, Sasaki K and Kato H **Comparative Genomic hybridization detects genetic alterations during early stages of cervical cancer progression**. *Genes Chromosomes Cancer* 2002, **33**:98-102
- Caceres-Cortes J, Alvarado-Moreno J, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-García A, Rocha-Zabaleta L, Urdiales-Ramos J, Weiss-Steider B, Haman A, Hugo P, Brousseau R and Hoang T **Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias**. *Cancer Res* 2001, **61**:6281-6289
- Monroy-García A, Ortiz-Navarrete V, Mora-García M, Flores-Borja F, Diaz-Quiñones A, Isibasi-Araujo A, Trejo-Becerril C, Chacón-Salinas R, Hernández-Montes J, Granados Arreola J, de Leo C and Weiss-Steider B **Identification of peptides presented by HLA class I molecules on cervical cancer cells with HPV-18 infection**. *Immunol Lett* 1999, **67**:167-177
- Cullen A., Reid R., Campion M. and Lorincz A **Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia**. *J Virol* 1991, **65**:606-612
- Badaracco G, Venuti A, Sedati A and Marcante ML **HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness**. *J Med Virol* 2002, **67**:574-82
- Debiec-Rychter M, Zukowski K, Wang CY and Wen WN **Chromosomal characterizations of human nasal and nasopharyngeal cells immortalized by human papillomavirus type 16 DNA**. *Cancer Genet Cytogenet* 1991, **52**:51-61
- Minoguchi S, Minoguchi M and Yoshimura A **Differential control of the NIMA-related kinases, Nek6 and Nek7, by serum stimulation**. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **301**:899-906
- Geisen C, Delius H, Lichter P and Kahn T **A Transcribed human sequence related to the mouse HCl and the human papillomavirus type 18 E5 genes is located at chromosome 7p13-14**. *Hum Mol Genet* 1995, **4**:1337-1345
- Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M and Zhu Y **DNA copy number losses in human neoplasms**. *Am J Pathol* 1999, **155**:683-694
- Mazurenko N, Attaleb M, Gritsko T, Semjonova L, Pavlova L, Sakharova O and Kissel'jov F **High resolution mapping of chromosome 6 deletions in cervical cancer**. *Oncol Rep* 1999, **6**:859-863
- Takekawa M, Posas F and Saito H **A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways**. *EMBO J* 1997, **16**:4973-4982
- Mazurenko N, Ridder R, Klaes R, Vinokurova S, Schaefer U and Doberitz MK **Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions**. *Oncogene* 2002, **21**:419-426
- Thein A, Trkova M, Fox M and Parrington J **The application of comparative genomic hybridization to previously karyotyped cervical cancer cell lines**. *Cancer Genet Cytogenet* 2000, **116**:59-65
- Baykal C, Ayhan A, Al A, Yuce K and Ayhan A **Overexpression of the c-Met/HGF receptor and its prognostic significance in uterine cervix carcinomas**. *Gynecol Oncol* 2003, **88**:123-129
- Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamoto M, Hirohashi S and Inazawa J **Expression of clAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy**. *Cancer Res* 2002, **62**(17):4860-6

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/3/8/prepub>

RESEARCH ARTICLE

Chromosomal Imbalances in Brain Metastases of Solid Tumors

Iver Petersen¹, Alfredo Hidalgo¹, Simone Petersen¹, Karsten Schlüns¹, Christiane Schewe¹, Manuela Pacyna-Gengelbach¹, Almut Goeze¹, Blend Krebber¹, Thomas Knösel¹, Olaf Kaufmann¹, Janusz Szymas², Andreas von Deimling³

¹ Institute of Pathology, Charité - Campus Mitte, Berlin, FRG

² Institute of Pathology, University Hospital of Poznan, Poland

³ Institute of Neuropathology, Charité - Campus Virchow Klinikum, Berlin, FRG

Metastases account for approximately 50% of the malignant tumors in the brain. In order to identify structural alterations that are associated with tumor dissemination into the central nervous system we used Comparative Genomic Hybridization (CGH) to investigate 42 brain metastases and 3 primary tumors of 40 patients. The metastases originated from lung cancer (14 cases), melanomas (7), carcinomas of breast (5), colon (5), kidney (5), adrenal gland (1) and thyroid (1). In addition, tumors of initially unknown primaries were assessed in 3 cases. The highest incidence of DNA gains were observed for the chromosomal regions 1q23, 8q24, 17q24-q25, 20q13 (>80% of cases) followed by the gain on 7p12 (77%). DNA losses were slightly less frequent with 4q22, 4q26, 5q21, 9p21 being affected in at least 70% of the cases followed by deletions at 17p12, 4q32-q34, 10q21, 10q23-q24 and 18q21-q22 in 67.5% of cases. Two unusual narrow regional peaks were observed for the gain on 17q24-q25 and loss on 17p12. The incidence at individual loci can be viewed at our CGH online tumor database at <http://amba.charite.de/cgh/>. The metastases of each tumor type showed a recurrent pattern of changes. In those cases with primary tumor and metastases available, the CGH pattern exhibited a high degree of conformity. In conclusion, our data suggests that specific genetic lesions are associated with tumor dissemination into the nervous system and that CGH analy-

sis may be a useful supplementary tool for classification of metastases with unknown origin.

Introduction

Brain metastases constitute a major complication of neoplasia. By far the most frequent sites of the primary tumors are lung carcinomas in approximately 50% of cases followed by breast cancer, melanomas, carcinomas of the kidney and the colorectum (18). In 11% of patients the site of the primary lesion is unknown. Although histology and immunohistochemistry are powerful tools in the identification of these primaries a small percentage of cases remain unsolved.

Little is known about the biology of brain metastasis formation. Recently, a brain metastasis-associated ganglioside has been identified (5). Expression of the p21 (WAF1/Cip1) gene has been reported to be decreased in brain metastases of colon carcinomas compared to primary tumors. However, metastatic breast carcinomas showed a higher expression than primaries (24). Similarly the genetic mechanisms that determine the potential of certain tumors to develop brain metastases are largely unknown. Decreased expression of the nm23 gene and loss of heterozygosity on chromosome 15q and 21q11.1-q21.1 have been reported (6, 10, 27). A cytogenetic study on brain metastases of malignant melanoma revealed preferential aberrations on chromosome 11q and isochromosome 17q formation (15, 16) and amplification of the EGF receptor has been found in three out of 18 metastases (26).

Our study was designed to address the questions whether there are genetic alterations that are associated with metastasis formation in the brain. Knowledge of such characteristic features may assist in classifying metastases by their genetic alterations thus contributing to the identification of unknown primary tumors.

Corresponding author:

Iver Petersen, Institute of Pathology, University Hospital Charité, Schumannstrasse 20-21, D-10098 Berlin, FRG; Tel.: +49-30-2802 2611; Fax: +49-30-2802 3407; E-mail: iver.petersen@charite.de

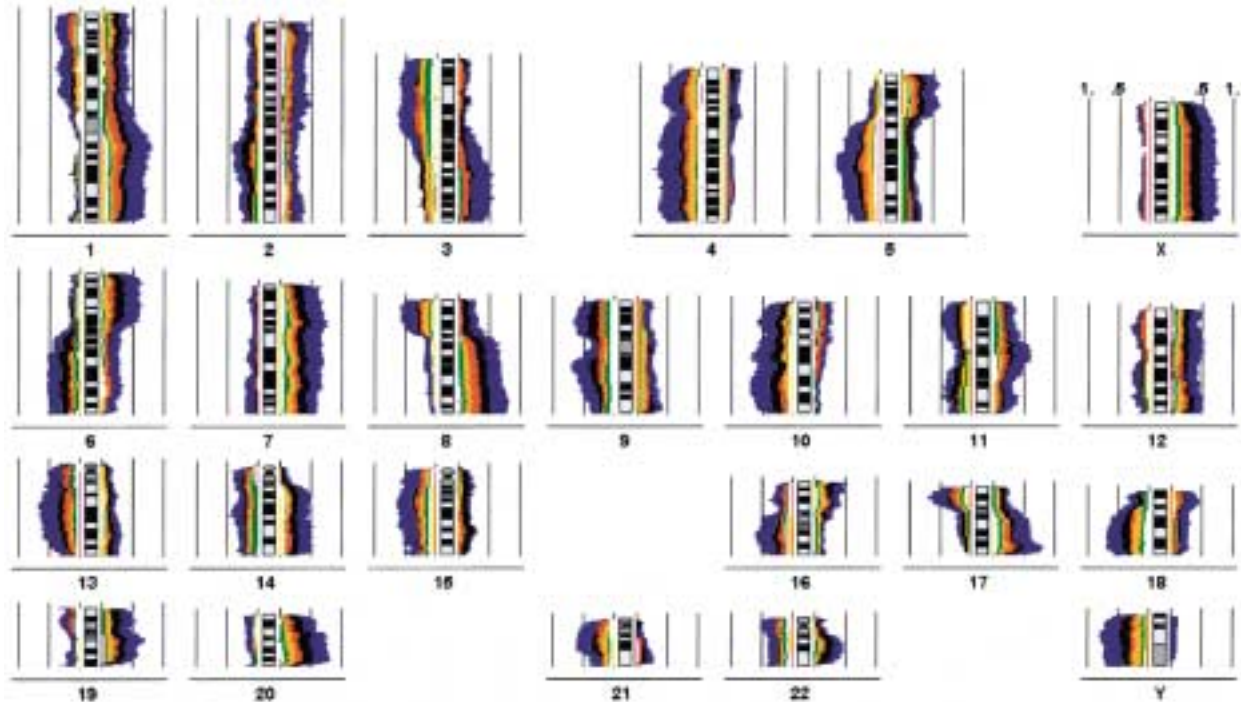


Figure 1. Super histogram of the chromosomal imbalances in 40 brain metastases. DNA losses are indicated by the incidence curve on the left side of the chromosome ideogram, DNA gains are shown on the right side. The .5 and 1. vertical lines represent the 50% and 100% incidences, respectively. Each tumor type is indicated by different colors. *blue*, lung carcinomas (n=14), *black*, melanomas (n=7), *red*, breast cancer (n=5), *orange*, colorectal carcinomas (n=5), *green*, kidney carcinomas (n=4), *white*, unknown primaries (n=3), *yellow*, thyroid carcinoma (n=1), *magenta*, adrenal gland carcinomas (n=1). A peak incidence is seen for the DNA gain on chromosome 17q24-q25.

Materials and methods

Tumor samples. In total, 42 brain metastases and 3 primary tumors of 40 patients were investigated by CGH. The metastases originated from patients with lung cancer (14 cases), melanomas (7), carcinomas of breast (5), colon (5), kidney (4), adrenal gland (1) and thyroid (1). In addition, tumors of initially unknown primaries were assessed in 3 cases. The tumor specimens were mainly obtained during neurosurgical operations at the Charité Hospital and the University Hospitals of Bonn and Poznan. In two cases tumor tissue from autopsies at the Institutes of Pathology of the Charité and the University Hospital of Kiel were investigated in which the primary tumors and two metastases were analyzed. In one additional case the primary tumor of the lung was analyzed from a patient who underwent lung lobectomy at the surgical department of the Charité. DNA was extracted from frozen tumor tissue except for two cases in which only formalin fixed paraffin embedded tissue was available.

Immunohistochemistry and HPV assessment.

Immunohistological stains were performed as previously described in the cases of unknown primary carcinomas for the markers cytokeratin 7, cytokeratin 20, TTF-1 (Thyroid Transcription Factor 1) and CEA (8). Similarly, the HPV analysis by PCR was done as recently published (7). After CGH analysis, the same DNA sample was used for HPV which was investigated in the majority of cases except for the 2 autoptic lung cancer cases, 2 colon carcinomas, 7 melanomas and the 3 metastases of unknown metastases. In 6 cases the HPV analysis was repeated using DNA from a paraffin block since the initial results were ambiguous.

CGH analysis. The protocols for CGH preparation have been described previously and are available on our web site at <http://amba.charite.de/cgh/>. Similarly, image acquisition and digital image analysis were performed as described. At least 10 metaphases/karyograms were analyzed per tumor sample with computation of CGH sum-karyograms and mean ratio profiles with confidence intervals (19, 23).

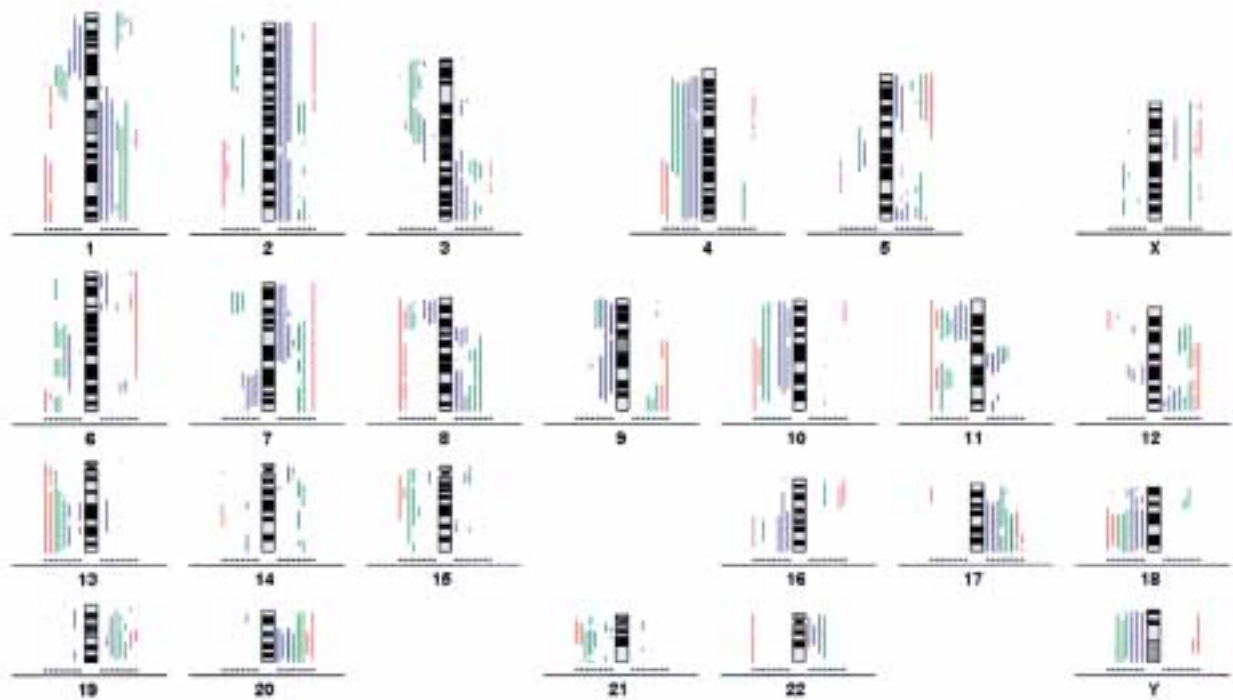


Figure 2. The CGH results of 3 primary tumors and their corresponding brain metastases in a graph representation. Lines on the left side of the chromosome ideogram correspond to deletions, lines on the right to DNA overrepresentations. The imbalances of single tumors can be identified by the indicated position. The tumor samples of the same patient are shown in distinct colors with the primary tumor in the position closest to the ideogram. In case 1 and 2, two metastases were analyzed. The clonal relationship between the primary tumor and their metastases is clearly visible by the high number of common aberrations.

Determination of chromosomal imbalances. DNA gains and losses were determined by statistical methods, i.e. deviations of the mean FITC:TRITC profiles from the normal ratio of 1.0 were tested for significance by a Student's t test (20). In this test we required at least a significance of 95% to score an alteration as a DNA gain or loss. After the statistical determination of the chromosomal imbalances of each tumor sample, a histogram of all cases was calculated (Figure 1). It included one brain metastasis per case and represents the incidence of DNA gains and losses of this tumor collective along each chromosome, showing gains on the right side of the ideogram and losses on the left of the ideogram, e.g. the maximum value of 100% is reached if all samples of the group carry a change at a specific chromosomal region. In the histogram of Figure 1 as well as in the line representation of Figure 2 only alterations with 99% significance in the Student's t test are shown. In addition, we calculated a histogram of all cases including those changes with 95% significance. The histograms and ratio profiles of individual tumors are also available at our web site at <http://amba.charite.de/cgh/>.

Pronounced DNA gains and losses were defined as

those alterations for which the ratio profiles exceeded the values of 1.5 and 0.5, respectively (21). They most likely represent high copy number amplifications or multi copy deletions. Numerical aberrations were determined by an algorithm of our custom made CGH software (23) using the alterations with 99% significance.

Results

Chromosomal imbalances of 40 brain metastases.

We observed the highest frequency of changes for the overrepresentations. The DNA gains on chromosome 8q24, 17q24-q25, 20q13 were each present in up to 82.5% of cases followed by the gains on 1q23 and 7p12 with an incidence of 80% and 77%, respectively. In particular, the band 17q24-q25 showed a peak in the incidence curve compared to the adjacent chromosome regions. Deletions were found less frequently with a maximum of 77.5% on chromosome 4q26 followed by losses on 4q22, 5q21, 9q21 with 70% and deletions at 17p12, 4q32-q34, 10q21, 10q23-q24 and 18q21-q22 in 67.5% of cases. In Figure 1 the chromosomal imbalances of 40 brain metastases are shown in a histogram which represents the DNA gains and losses as an inci-

	pronounced DNA gains ¹	pronounced DNA losses ²
Breast (n = 5)	1q21-q31 (ii), 1q31-q32 (iii), 1q44 (ii), 3q24-qter (ii), 8q21-qter (iii), 8q23-q24 (iv), 20p12-p13 (ii)	5q21-q22 (ii), 8p12-p23 (ii), 10q24-q25 (ii), 12p11-p12 (ii), 17p12-p13 (ii)
Colon (n = 5)	7q11.2 (ii), 8q13-q21.1 (ii), 8q21.3-qter (iv), 9q34 (ii), 20q11-qter (iii)	4p15.1 (ii), 8p12-pter (iii), 8p21 (iv), 18q12-qter (ii), 18q22 (iii)
Kidney (n = 4)	7q11.2-qter (ii)	
Lung (n = 14)	1q21-q24 (v), 3q23 (v), 3q27-q28 (vii), 5p12-p14 (iv), 7p21-p22 (v), 8q22-qter (iv), 17q25 (v)	4q26 (v), 4q32-q33 (v), 5q21 (iv)
Melanoma (n = 7)	7p15-pter (ii), 7p15-q11.2 (iii), 20p13 (ii), 20q11.2-qter (ii)	

¹ratio >1.5, ²ratio <0.5, only those alterations which occurred at least twice were listed with the number indicated in brackets

Table 1. Pronounced DNA imbalances in brain metastases.

dence curve along each chromosome. The same histogram is also available at our CGH online tumor database at <http://amba.charite.de/cgh/> where the incidences can be assessed interactively by opening the Infoscreen and pointing at specific chromosomal sites using the computer mouse.

HPV analysis. No genomic sequences of Human Papilloma Viruses were detectable by PCR in any of 24 investigated brain metastases.

Most prevalent changes in single tumor types. The alterations of the tumor groups are visualized by different colors in the histogram (Figure 1). For specific chromosomes, the imbalances of the different entities were partially overlapping. However, the tumors from the same primary site were characterized by a recurrent pattern of aberrations including pronounced DNA gains and losses (Table 1).

Breast cancer metastases had a mean of 39.6 aberrations per case, i.e. 20.2 gains and 19.4 losses. Lung metastases indicated a similarly complex spectrum of aberrations with a mean of 35.6 alterations per tumor with gains and losses almost equally distributed, i.e. 18.7 versus 16.9 thus causing problems particularly in differentiating metastases of these two primary sites. In this regard, the patterns of chromosomes 3 and 12 are important since lung cancer carried deletions on 3pter and very rarely 3p gains whereas breast carcinomas harbored deletions predominantly in the centromeric 3p regions which was often accompanied by gains on 3pter. Chromosome 12p showed deletions in breast cancer in contrast to 12p gains in lung cancer.

Melanomas carried a mean number of 28.6 alter-

ations per case, 16.0 gains and 12.6 losses. Most prevalent changes were gains on chromosome 6p, 7, 8q, 20, 22q, and losses on 6q, 9p and 10q. Pronounced DNA gains were seen most often at 7p15-q11.2 (Table 1).

Colon carcinomas carried a mean of 28.2 aberrations per case, i.e. 15.8 gains versus 12.4 losses. The typical alterations of metastatic colon cancer were deletions on 4p, 4q, 5q21, 8p, 18q and overrepresentations on 8q, 16p12, 20q. In particular, the CGH correlate of an 8q isochromosome with a pronounced deletion on 8p along with a pronounced gain on 8q was most often found in this tumor type. Similarly, 20q amplifications were a frequent finding (Table 1).

Kidney carcinomas harbored more deletions than DNA gains, 13.5 versus 12.3, respectively. The most typical change is the deletion of 3pter, however for differentiation purposes particularly the DNA gain of 5q and the deletions of 14q may be used.

The adrenal gland carcinoma harbored 19 alterations, i.e. 10 gains and 9 losses, and the thyroid carcinoma 27, i.e. 11 gains and 16 losses. Individual ratio profiles of these two tumors, the metastases of unknown primaries and the other cases are available at our online CGH tumor database at <http://amba.charite.de/cgh/>.

The comparison of primary tumors and their corresponding metastases. The chromosomal alterations of three primary lung carcinomas and 5 brain metastases are shown in Figure 2 as a line representation. In all cases, the clonal relationship between the tumors of individual patients were determined on grounds of the high number of overlapping alterations compared to the different ones. Particularly the biopsied patient represented by the red color showed an increase in size of

deletions on chromosomes 2q, 6q, 8, 10q, 11, 15q, and 18q during tumor progression to the metastatic stage (Figure 2).

Metastases of unknown primaries. We investigated three tumors that were diagnosed by the neuropathologist as metastases of unknown primary tumors. One case showed a papillary growth with large anaplastic tumor cells and the features of signet ring cells. CGH suggested a primary lung carcinoma, i.e. the analysis revealed a very complex aberration pattern with deletions on chromosome 3p along with an overrepresentation of 3q. The CGH findings were corroborated by immunohistochemistry which showed binding of TTF-1 (Thyroid Transcription Factor 1) and cytokeratin 7 in the tumor cells whereas no binding was observed for cytokeratin 20.

A second case had typical features of a colon carcinoma, e.g. deletions of 18q and a pronounced gain on 20q. Histology showing predominantly solid growth with focally tubular and cribriform differentiation, necrosis and little desmoplastic stroma supported the diagnosis. In addition, immunohistochemistry revealing a pronounced expression of CEA and cytokeratin 20 and lack of expression of TTF-1 and cytokeratin 7 were also consistent with colon carcinoma.

A third case showed morphological features that were suggestive of renal cell carcinoma with distinct cytoplasmic borders and clear cell appearance. In contrast, immunohistochemistry showed focal expression of TTF-1 suggesting lung carcinoma. The CGH pattern was inconclusive. The histopathology of the three cases is illustrated at our web site.

Discussion

Genetic markers for tumor dissemination into the nervous system. Metastasis formation is a complex process that involves the inactivation of tumor suppressor genes as well as the activation of proto-oncogenes. Tumor dissemination into brain as an example of organ specific metastasis formation may preferentially involve the acquisition of gain of function mutations, e.g. the expression of specific receptors that might mediate the attachment and infiltration of the circulating tumor cells into the nervous system. Therefore, it is interesting that the CGH analysis revealed distinct overrepresentations as imbalances with the highest incidence. Amplifications point to the activation of proto-oncogenes being the classical representatives of tumor associated genes which act by a gain of function. Although it is more difficult to detect DNA losses, we are convinced that the higher incidence of DNA gains represent no CGH arti-

fact since we used a quite sensitive method for the determination of chromosomal imbalances. In addition, we already investigated other tumor collectives in which we identified deletions as the most prevalent aberration type, e.g. primary small cell lung cancer as a tumor with early and widespread tumor dissemination carried more deletions on chromosomes 3p and 10q than any of the overrepresentations in brain metastases (19).

The CGH results indicated that gain of chromosome 17q24-q25 along with those on 8q24 and 20q13 followed by the 1q23 and 7p12 overrepresentations were the most frequent DNA imbalances. We feel that it might be of particular importance for tumor dissemination into the brain for several reasons. First, isochromosome 17q formation has been described in brain metastases of malignant melanoma (15, 16). Second, the 17q24-q25 overrepresentation showed a relatively narrow peak in the incidence curve compared to the gains on 1q23, 8q24 and 20q13. Second, we did not detect this change at a similar frequency in metastases of other organ sites (21, 25).

Additional indirect evidence for a possible association between chromosome 17q gain and brain metastases formation came from recent clinical studies on c-erbB2 positive breast carcinomas using the Herceptin anti-HER2/NEU antibody. One complication of those cancers which respond to the therapy by the antibody is the development of brain metastases (G. Schaller, personal communication). Overexpression of the HER2/NEU proto-oncogene is associated with the overrepresentation of the gene on chromosome 17q21. This might be accomplished by numerical gain of the entire chromosome, of the long arm 17q or by the amplification of a chromosomal subregion. Likely the initial amplicon may include the distal chromosome bands 17q24-q25. Thus it is tempting to hypothesize that the treatment selects for tumor cells that carry only the distal amplicon at 17q24-q25 while suppressing those with the 17q21 gain. The observation that overrepresentations of entire chromosomal arms might be condensed to smaller DNA amplicons during tumor progression is consistent with this hypothesis (21).

Putative candidate gene for the 17q24-q25 regions are the RAS-related RAC3 gene since it belongs to RHO gene family which has already been implicated in metastasis formation (4, 13). Since it is involved in signal transduction the serine/threonine kinase CSNK1D (casein kinase I delta) is also an interesting candidate (11) similar to the interleukin enhancer-binding factor (12).

Candidate gene for the 8q24 amplicon is c-myc

which has already been implicated in tumor progression (2). Also the 20q13 amplification has been already detected in advanced breast carcinomas and has led to the identification of the AIB1 candidate gene (1). Recently we found that the gain on 1q21-q25 is a typical finding in metastatic squamous cell carcinomas of the lung (21). It has already been associated with metastasis formation of kidney carcinomas (3). The DNA gains at 7p12 probably correspond to overexpression and amplification of EGFR gene at this locus (26).

The incidence of deletions at 15q15-q21 (62.5%) and 21q21 (60%) are fairly high and thus consistent with the findings of the allelotype studies in disseminated tumors including brain metastases (10, 27). From the frequency of the DNA losses, however, the loci on 4q, 5q, 9q, 17p, 10q and 18q seems to be more important. Interestingly, NM34-H5, a new homologue of the NM23 gene has been mapped to 5q23-q31 and constitutes a candidate for a putative tumor suppressor gene on this chromosome arm (17).

Differential diagnosis of brain metastases. Histology and immunohistochemistry are the two major methods in tumor classification. Histology with its large variety of conventional staining protocols already provides a pattern of morphological features that has proven to be specific for several tumor types. In addition, immunohistochemistry is capable to detect lineage specific marker proteins thereby supplementing the morphological tumor diagnosis. Markers for the differential diagnosis of solid tumors are in particular the cytokeratins which show a distinct expression pattern in different carcinoma types (14) as well as proteins with rather specific expression in certain tissue and tumor types, e.g. HMB45 in melanoma, Thyreoglobulin in the thyroid, estrogen receptor in breast and the recently identified TTF-1 in lung carcinomas and thyroid cancer (8).

Although both techniques are well established and reliable tools in tumor diagnosis they have certain limitations. Some tumors still do escape a final diagnosis. Most importantly, the detection of protein expression gives only limited insight on the genetic status of a tumor. It does not answer the questions whether two tumors are clonally related or what are the genetic mutations that has led to the specific protein expression.

Genetic analysis is already becoming a supplement for tumor classification. The detection of viral sequences should be particularly helpful in those cases in which two conditions are fulfilled. First, the viral infection is causally associated with tumor formation of the primary tumor and second the viral genome is inte-

grated into the tumor DNA. In this regard, hepatitis B virus and human papilloma virus are putative markers for liver cancer and cervical carcinomas, respectively. Due to its high prevalence, HPV might be particular useful marker for uterine cervix cancer (7). The fact that we failed to detect HPV sequence in brain metastases of other primary sites is consistent with this view. However, additional studies are necessary to investigate the sensitivity and specificity of HPV as a marker for disseminated cervix carcinoma.

In this study we demonstrate that CGH is capable to establish a clonal relationship between the tumors of the same patient. It may thus be used to prove that a metastasis is derived from a putative primary tumor that has been operated on prior to metastasis formation. Although other genetic markers like mutations of the TP53 gene might be used for this purpose (22), a single mutation might not be sufficient to establish a clonal relationship. CGH has the advantage that it gives an overview about the multiple chromosomal imbalances that are the hallmark of almost all solid tumors (9). Therefore, CGH is suitable for answering such questions.

We demonstrate that the recurrent aberration pattern of different tumor types may be used as a supplement for the identification of unknown primary tumors. Additional studies will have to show how reliable CGH is for this purpose compared to other methods. Since many rare tumors metastasizing to the nervous system have not yet been investigated, and the number of brain metastases examined for each tumor type is low, there still remains open questions. However, our study indicates that chromosomal imbalances detected by CGH may be divided into lesions associated with a morphological phenotype and lesions promoting tumor dissemination into the brain.

References

1. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277: 965-968
2. Brison O (1993) Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1155: 25-41
3. Gronwald J, Storkel S, Holtgreve-Grez H, Hadaczek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T (1997) Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res* 57: 481-487

4. Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N (1997) Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* 272: 20384-20388
5. Hamasaki H, Aoyagi M, Kasama T, Handa S, Hirakawa K, Taki T (1999) GT1b in human metastatic brain tumors: GT1b as a brain metastasis-associated ganglioside. *Biochim Biophys Acta* 1437:93-99
6. Hartsough MT, Steeg PS (1998) Nm23-H1: genetic alterations and expression patterns in tumor metastasis. *Am J Hum Genet* 63:6-10
7. Hidalgo A, Schewe C, Petersen S, Salcedo M, Gariglio P, Schlüns K, Dietel M, Petersen I (2000) Human Papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines. *European Journal of Cancer* 36: 542-548
8. Kaufmann O, Dietel M (2000) Thyroid transcription factor 1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to Surfactant proteins A and B. *Histopathology* 36: 8-16.
9. Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Mouni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152: 1107-1123
10. Kohno T, Kawanishi M, Matsuda S, Ichikawa H, Takada M, Ohki M, Yamamoto T, Yokota J (1998) Homozygous deletion and frequent allelic loss of the 21q11.1-q21.1 region including the ANA gene in human lung carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 21:236-243
11. Kusuda J, Hidari N, Hirai M, Hashimoto K (1996) Sequence analysis of the cDNA for the human casein kinase 1-delta (CSNK1D) gene and its chromosomal localization. *Genomics* 32: 140-143
12. Li C, Lulis AJ, Sparkes R, Nirula A, Gaynor R (1992) Characterization and chromosomal mapping of the gene encoding the cellular DNA binding protein ILF. *Genomics* 13: 665-671
13. Michiels F, Collard JG (1999) Rho-like GTPases: their role in cell adhesion and invasion. *Biochem Soc Symp* 65:125-146
14. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24
15. Morse HG, Gonzalez R, Moore GE, Robinson WA (1992) Preferential chromosome 11q and/or 17q aberrations in short-term cultures of metastatic melanoma in resections from human brain. *Cancer Genet Cytogenet* 64:118-126.
16. Morse HG, Moore GE, Ortiz LM, Gonzalez R, Robinson WA (1994) Malignant melanoma: from subcutaneous nodule to brain metastasis. *Cancer Genet Cytogenet* 72:16-23
17. Munier A, Feral C, Milon L, Pinon VPB, Gyapay G, Capeau J, Guellaen G, Lacombe ML (1998) A new human nm23 homologue (nm23-H5) specifically expressed in testis germinal cells. *FEBS Lett* 434: 289-294
18. Nelson JS, von Deimling A, Janzer RC (1997) Metastatic tumours. In: *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. Kleihues P, Cavenee WK (eds.) Chapter 16, pp. 200-202. International Agency for the Research on Cancer: Lyons, France
19. Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T, Dietel M (1997) Small cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 75: 79-86
20. Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, Langreck H, Gellert K, Reichel M, Just K, du Manoir S, Cremer T, Dietel M, Ried T (1997) Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 57: 2331-2335
21. Petersen S, Aninat-Meyer M, Schlüns K, Gellert K, Dietel M, Petersen I (2000) Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *Br J Cancer* 82: 65-73
22. Reichel MB, Ohgaki H, Petersen I, Kleihues P (1994) p53 mutations in primary human lung tumors and their metastases. *Mol Carcinogen* 9: 105-109
23. Roth K, Wolf G, Dietel M and Petersen I (1997) Image analysis for Comparative Genomic Hybridization based on a karyotyping program for Windows. *Anal Quant Cytol Histol* 19: 461-474
24. Ruan S, Fuller G, Levin V, Bruner JM, Zhang W. (1998) Detection of p21WAF1/Cip1 in brain metastases. *J Neurooncol* 37: 223-228
25. Schwendel A, Langreck H, Reichel M, Schröck E, Ried T, Dietel M, Petersen I (1997) Primary small cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 74: 86-93
26. Torp SH, Helseth E, Ryan L, Stolan S, Dalen A, Unsgaard G (1992) Expression of the epidermal growth factor receptor gene in human brain metastases. *APMIS* 100: 713-719
27. Wick W, Petersen I, Schnitzler R, Wolfarth B, Lenartz D, Bierhoff E, Hümmerich J, Stangl AP, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A (1996) Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 12: 973-978

Changes in retinoblastoma gene expression during cervical cancer progression

MAURICIO SALCEDO*, LUCÍA.TAJA***, DOLORES UTRERA*, PEDRO CHÁVEZ**, ALFREDO HIDALGO*, CARLOS PÉREZ*, LUIS BENÍTEZ*, CRISTINA CASTAÑEDA**, RICARDO DELGADO*** AND PATRICIO GARIGLIO**

*Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center SXXI-IMSS, Mexico;

Department of Genetics and Molecular Biology, Center for Research and Advanced Studies, CINVESTAV-IPN, Mexico; Basic Research Division, and *National Cancer Institute, Mexico

Received for publication 22 November 2000

Accepted for publication 11 June 2001

Summary. The role of tumour suppressor genes in the development of human cancers has been studied extensively. In viral carcinogenesis, the inactivation of suppressor proteins such as retinoblastoma (pRb) and p53, and cellular oncogenes overexpression, such as c-myc, has been the subject of a number of investigations. In uterine-cervix carcinomas, where high-risk human papillomavirus (HPV) plays an important role, pRb and p53 are inactivated by E7 and E6 viral oncoproteins, respectively. However, little is known about the *in situ* expression of some of these proteins in pre-malignant and malignant cervical tissues. On the other hand, it has also been demonstrated that c-myc is involved in cervical carcinogenesis, and that pRb participates in the control of c-myc gene expression. By using immunostaining techniques, we investigated pRb immunodetection pattern in normal tissues, squamous intraepithelial lesions (SILs) and invasive carcinomas from the uterine cervix. Our data show low pRb detection in both normal cervical tissue and invasive lesions, but a higher expression in SILs. C-Myc protein was observed in most of the cellular nuclei of the invasive lesions, while in SILs was low. These findings indicate a heterogeneous pRb immunostaining during the different stages of cervical carcinogenesis, and suggest that this staining pattern could be a common feature implicated in the pathogenesis of uterine-cervix carcinoma.

Keywords: retinoblastoma, uterine-cervix, neoplasia, invasive, HPV

Correspondence: Dr Mauricio Salcedo, Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México. Tel.: 00 5 627-6900 Ext. 4323; Fax: 00 5 761 0952; E-mail: maosal89@yahoo.com

Introduction

The retinoblastoma tumour suppressor gene (*rb*) encodes a nuclear phosphoprotein, termed p105Rb or pRb, which has been found, mutated or deleted in several types of human malignant tumours (Friend *et al.* 1987; Lee *et al.* 1987; Harbour *et al.* 1988; Varley *et al.* 1989; Horowitz *et al.* 1990; Furukawa *et al.* 1991). Introduction of pRb into tumour cells lacking the *rb* gene *in vitro* stops cell proliferation (Uzvolgyi *et al.* 1991; Huang *et al.* 1988), suggesting that pRb acts in normal cells to constrain growth and its loss in cancer cells allows for uncontrolled proliferation.

In epithelial cultured cells, hypophosphorylated forms of pRb predominate in G1 phase of the cell cycle (Hu *et al.* 1992; DiCaprio *et al.* 1992). As cells enter S phase, phosphorylated forms become more abundant and persist through S, G2 and M phases. When cells enter anaphase, pRb dephosphorylation begins, reaching its lowest phosphorylation level in G1, at which time a block in the progression of the cell cycle from G1 to S phase is evident (Ludlow *et al.* 1993). Dephosphorylated pRb appears to regulate cycle progression by inactivating several growth-promoting proteins, such as E2F-1 and c-Myc transcription factors (Shirodkar *et al.* 1992; Rustgi *et al.* 1992) as well as certain G1 phase cyclins (Resnitzky *et al.* 1992). When viral oncoproteins bind to dephosphorylated forms of pRb (Whyte *et al.* 1988; Dyson *et al.* 1989), they release cell proliferation factors (Chen *et al.* 1992).

Epidemiological and experimental studies have implicated high-risk human papillomavirus (HPV) genotypes 16 and 18 in the development of uterine-cervix carcinoma (Pfister 1987; zur Hausen 1991). The E6 and E7 oncoproteins encoded by HPV bind to p53 and pRb, respectively. E7 interacts with the dephosphorylated form of pRb (Dyson *et al.* 1989), thereby releasing growth-promoting factors such as E2F-1, cyclins, Cdk and probably Myc (Chen *et al.* 1992). It has also been proposed that HPV-16/E7 induces the degradation of pRb through the ubiquitin pathway (Boyer *et al.* 1996). This mechanism appears to be crucial for the development of cervical carcinoma in infected patients with oncogenic HPV strains. Even in the presence of HPV infection, other cellular oncogene alterations (Ocadiz *et al.* 1996; Gariglio *et al.* 1987) and overexpression (Gariglio *et al.* 1993) could also represent important steps in cervical carcinogenesis.

Loss of pRb function in different types of tumour cells have been determined by blotting techniques such as Southern, Northern or Western Blots (Friend *et al.* 1987; Lee *et al.* 1987; Harbour *et al.* 1988; Varley *et al.* 1989;

Horowitz *et al.* 1990; Furukawa *et al.* 1991). These methods, however, require the use of tissue extracts from tumour biopsies that include not only malignant cells but various proportions of normal cells such as fibroblasts, inflammatory cells and endothelial cells (Xu *et al.* 1991). Immunohistochemical techniques allow the detection of pRb expression in individual cells and specific cell populations in tissue sections (Benedict *et al.* 1990; Geradts *et al.* 1994). A low frequency of *rb* gene alterations has been found in cervical carcinoma by Southern blot (Choo & Chong 1993; Wrede *et al.* 1991) and so far few reports have been focused on the cell per cell immunohistochemical expression and localization of pRb in normal cervical epithelium (Cordon-Cardo & Richon 1994; Amortegui *et al.* 1995; Sano *et al.* 1998).

The main goal of this study was to make a description of retinoblastoma protein distribution in normal, squamous intraepithelial lesions (SILs) and invasive cervical cancer tissues harbouring high-risk HPV. We also analysed a possible correlation between the presence and location of this protein to prognosis. Our results show different intensity levels of pRb in SILs and invasive carcinomas. A low concentration of pRb was observed in normal uterine-cervix and invasive tumours. We also analysed c-Myc protein presence in cervical tissue, because it has been demonstrated that pRb is involved in c-myc oncogene expression (Hamel *et al.* 1992; Salcedo *et al.* 1995). We found that pRb-positive and pRb-negative malignant cells showed low and high positive reaction for c-Myc protein, respectively, supporting the idea that functional pRb, associated with E2F-1, inhibits c-myc gene expression (Hamel *et al.* 1992; Salcedo *et al.* 1995). The heterogeneous pRb detection found could reflect the great clonal diversity of cells present during cervical carcinogenesis.

Materials and methods

Patients and tissues

We studied biopsies from 21 patients admitted to the Gynecology and Obstetrics Hospital #4-IMSS and Oncology Unit, Mexico General Hospital, with squamous cell carcinomas, clinical stages I, II, III and IV (Table 1) and biopsies from 20 squamous intraepithelial lesions (SIL) (13 low grade and 7 high grade) from patients who were treated at the Clinic of Dysplasias of the National Cancer Institute (Ministry of Health, Mexico). All samples were high-risk HPV positive. Fifteen normal cervical fresh tissues from autopsies or surgical

specimens with uterine myomatosis of individuals with normal cervical cytology completed the samples. All tissues were fixed in methacarnoy fixative, dehydrated, paraffin-embedded, cut at 5- μ m thick sections and mounted in poly D-lysine coated slides.

Immunohistochemistry technique

After deparaffinization, tissue sections were preincubated in 3% hydrogen peroxide for 10 min, washed in running water and covered with 10% nonimmune-blocking swine serum for 30 min at room temperature. Tissues were then incubated with the primary antibody for 18 h at room temperature in a moist chamber. The primary antibodies used in this study were rabbit polyclonal anti-pRb C-15 (Santa Cruz Inc., CA, USA), which was raised against a 15 aminoacid peptide (aa. 914–928) of the carboxy terminal end domain of the human Rb protein (1:200) and recognizes both the unphosphorylated and phosphorylated forms of pRb, and the monoclonal antibody anti-Myc 1 (Oncogene Sciences Diagnostic, Uniondale, NY, USA) which recognizes a carboxy terminal peptide (aa. 408–439) of the Myc protein (1:100). Subsequently, the slides were washed with PBS buffer and

treated according to the instructions of the DAKO PAP kit (DAKO Co., Carpinteria, CA, USA). Briefly, the slides were incubated with the secondary IgG antibody (swine antirabbit 1:100 for pRb or goat antimouse 1:100 for Myc) for 30 min, washed in PBS, incubated with specific peroxidase antiperoxidase complexes (rabbit or mouse, respectively) for 30 min, washed again in PBS and treated with 0.06% Diaminobenzidine (DAB) in 3% hydrogen peroxide colour developer solution. The reaction was stopped by washing with distilled water and tissue sections were counterstained with haematoxylin. Specific staining for pRb or c-Myc was indicated by a brown colour.

Controls

Immunohistochemical controls were produced by substitution of the primary antibody with an irrelevant rabbit IgG polyclonal antibody. Other controls used for specificity of the pRb reaction were as follows: (1) the *rb*^{-/-}C33A cervical carcinoma cell line expressing a mutated protein showed low staining (Scheffner *et al.* 1991; Fig. 1a, Panel A). After transfection with *rb* cDNA this cell line gave a strong signal in some nuclei (Fig. 1b, Panel A). (2) Saos-2 cell line lacking pRb due to a

Table 1. Immunoreactivity for Prb in different uterine-cervix tissues

NORMAL*	HPV	SIL**	TISSUE		G	
			HPV	INVASIVE***		
1. (1)	16	11. I (0)	16	31. I (0)	16/18	P
2. (0)	16/18	12. I (2)	16	32. (1)	16	M
3. (0)	(-)	13. I (2)	16	33. (0)	16	M
4. (1)	16	14. I (1)	16/18	34. II (2)	16	P
5. (1)	(-)	15. I (0)	16/18	35. (0)	18	M
6. (1)	(-)	16. I (2)	18	36. (2)	16	M
7. (1)	(-)	17. I (2)	16/18	37. (2)	18	P
8. (0)	18	18. I (1)	16	38. (0)	31	M
9. (0)	(-)	19. I (2)	16	39. (0)	16	M
10. (0)	18	20. I (2)	16	40. (0)	16	M
11. (0)	(-)	21. I (2)	16	41. (0)	33	M
12. (1)	(-)	22. I (2)	18	42. (0)	16	M
13. (1)	(-)	23. I (2)	18	43. (2)	16	M
14. (0)	(-)	24. h (0)	16	44. (0)	16	M
15. (1)	(-)	25. h (2)	16	45. (2)	16	M
		26. h (2)	16	46. (1)	18	M
		27. h (2)	16	47. III (1)	16	M
		28. h (2)	16	48. (0)	16	M
		29. h (2)	16	49. (2)	18	M
		30. h (2)	18	50. IV (0)	16	M
				51. (2)	18	P

0 = less than 10%; 1 = 10–50% and 2 = more than 50% positive cells/tissue sample. The indicated value represents the most frequent finding among the positive cell population. I–IV: Carcinoma clinical stage. SIL: squamous intraepithelial lesion, I: low grade and h: high grade. HPV: HPV (-): HPV negative.

G: differentiation grade; P (poorly), M (moderately) or W (well) differentiated squamous carcinoma. Mean age, year (range): *44(35–53); **51(24–78) and ***48(26–71).

homozygous *rb* deletion (Shew *et al.* 1990; Fig. 1c, Panel A) and then transfected with *rb* cDNA presented a strong signal in some nuclei (Fig. 1d, Panel A).

The monoclonal antibody Ki-67 (1:50; DAKO Co.) was used as a marker of cellular proliferation (Fig. 1e, Panel A). This antibody reacts with cells at all stages of the cell cycle, but not with cells in G0 phase. The reaction with this antibody serves as an indicator of the growth fraction; that is the number of cells undergoing active division.

Interpretation and quantification

Cells were noted as positive for pRb when they showed nuclear immunoreactivity (brown precipitate). Cytoplasmic staining was disregarded. Only the neoplastic region of each tissue section was evaluated. Two slides were analysed for each sample. To assess the stained nuclei, the slides were reviewed at $\times 40$ magnification. The percentage of positive cells in each tissue section was estimated on a semi-quantitative scale where 0: less than 10%, 1: 10–50% and 2: more than 50% of the total tumoural area. After the examination of the slides by three independent observers, a global agreement was reached regarding the results.

Invasive lesions were classified as poorly (P), moderately (M) or well (W) differentiated squamous cell carcinomas using standard histopathological criteria. Mitotic figures were counted in 10 medium power fields (MPF; $\times 200$ magnification) in each section.

HPV typing

Paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded ethanols (100%, 90%, 70% and 30%) to distilled water, and were scraped into Eppendorff tubes. Specimens were treated with 100 μ L Proteinase K (100 μ g/mL), 10 mM Tris-HCl pH 7.2 for 2 h at 50 °C, then boiled for 5 min, cooled and centrifuged. Supernatants (20 μ L) were directly used for PCR reactions employing the L1C1/L1C2 oligonucleotides according to Yoshikawa *et al.* (1991a). One fourth of the PCR product was analysed for restriction fragment length polymorphism among HPVs (Yoshikawa *et al.* 1991a). In order to avoid cross-contamination the detection of HPV, DNA sequences were performed in two other laboratories in a blind study achieving similar results (Dr Berumen, Military Medical School, Mexico City and Dr Cossette Wheeler, NIH, USA). As negative controls we always used no DNA or DNA from C33A cells (cervical cells that do not contain HPV DNA), as well as DNA from lymphocytes obtained from healthy individuals.

Results

HPV detection

HPV-16 was the most common type found even in normal cervical tissue, 13.3%, SILs, 65%, and invasive lesions, 62%. HPV-18 was found in 13.3% of normal tissue, 20% SILs, and 23% invasive samples. Co-infection of HPV-16/18 was detected in 6.66% of normal tissue, 15% in SILs, and 4% in invasive specimens. One carcinoma had HPV-31 and another the 33 type (see Table 1).

pRb in normal uterine-cervix

Normal cervical squamous epithelium showed pRb nuclear immunoreactivity in parabasal cell layers. Cells in the upper (mature) and lower (basal) layers of the epithelium displayed low to undetectable levels of pRb, whereas cells in the middle layers showed strong nuclear staining for this suppressor protein (Fig. 1a, Panel B). Nuclear staining was detected either in HPV-16 positive or HPV negative normal cervixes. C-Myc immunostaining was seen mainly in the nuclei of the highly proliferative basal cell layer of the normal epithelium (Hanson *et al.* 1994) (not shown). Proliferative activity, measured by Ki-67 antigen staining, was observed approximately in 50% of the epithelial cells from basal and parabasal layers (data not shown).

pRb expression in squamous intraepithelial lesions

All the pre-cancerous cervical lesions (SIL) showed numerous pRb positive cells (Fig. 1c,d, Panel B; see Table 1). In most SILs, pRb staining was seen in the basal and parabasal layer of the epithelium. The percentage of pRb positive cells was higher in SIL than in normal cervical epithelium (compare Fig. 1a,b, Panel B). Three SIL samples showed an extremely low pRb reaction (less than 10% of positive cells); two samples were given a value of 1 (10–50% of positive cells) and 15 samples showed more than 50% of positive cells. As can be observed in Fig. 1(b), Panel B, basal cells present variable pRb concentration, but frequently higher than the low level observed in the normal epithelium basal layer (Fig. 1a,b, Panel B). For c-Myc protein, nuclear immunoreaction was observed in most of the dysplastic epithelial cells present in SIL. However, in some serial sections differences between c-Myc and pRb expression and location were observed (data not shown).

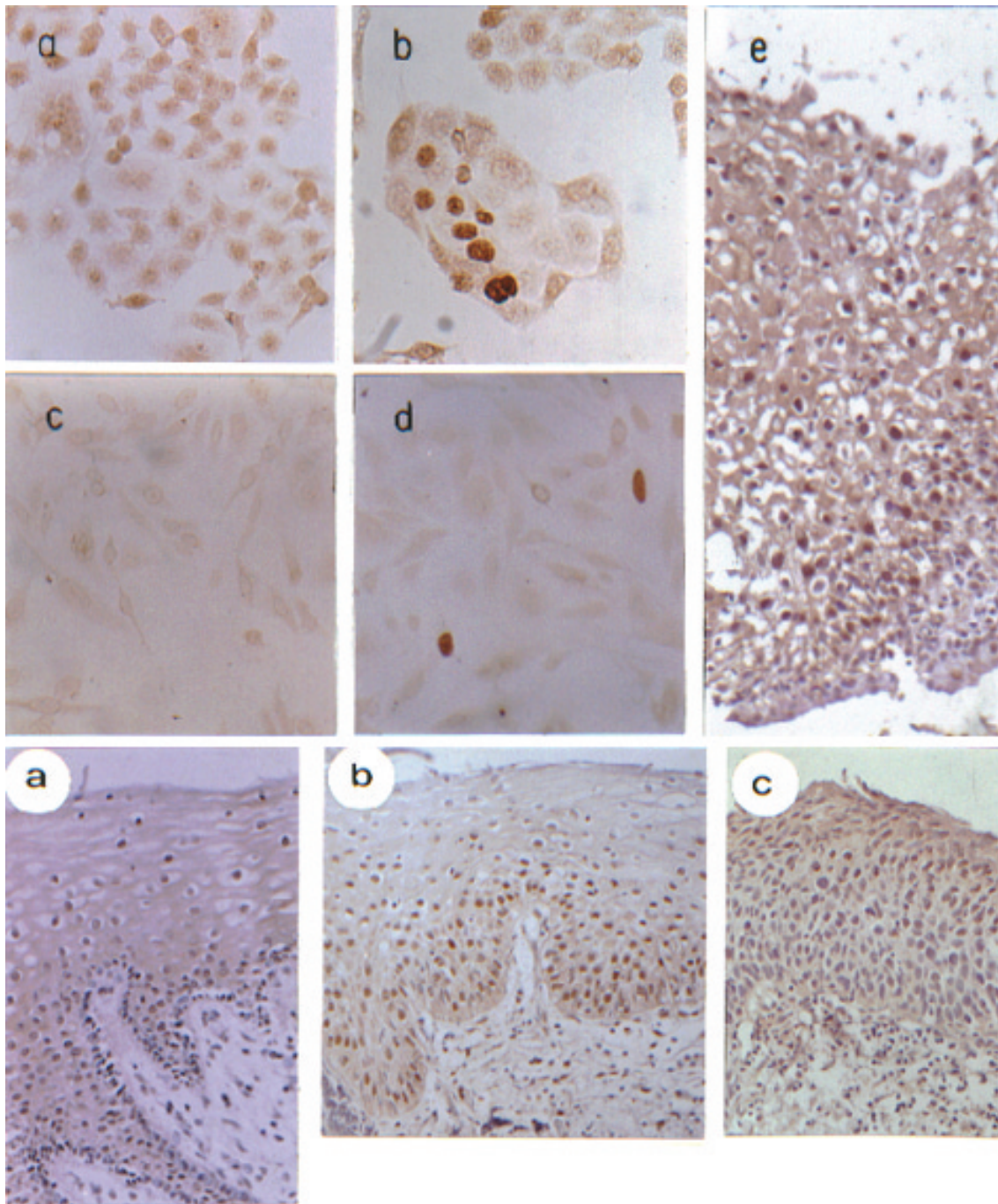


Figure 1. Immunohistochemical detection of pRb in normal human cervical tissues and squamous intraepithelial lesions. Immunohistochemical analysis of the *rb* gene product was performed employing Polyclonal anti-pRb C-15 (see Materials and methods). Paraffin-embedded tissue sections were used to detect the pRb protein by PAP technique; DAB was used as chromogen and samples were haematoxylin counterstained. Panel A. As control, pRb immunostaining of C33-A (a, b) or Saos-2 (c, d) cell lines were employed; (a) and (c) non transfected C33-A and Saos-2 cell lines; (b) and (d) *rb* transfected cells, respectively, X400; (e) low grade squamous intraepithelial lesions (SIL) Ki-67 immunostained, X200. The cells and tissues were haematoxylin counterstained. Panel B, normal tissue: (a) section showing a high percentage of cells with nuclear pRb staining, SIL: (b) nuclear staining predominantly in the lower (basal layer) and medium (suprabasal) part of the epithelium from low grade SIL (c) majority of cells presenting pRb staining in the upper third part of the epithelium from a high grade SIL. All haematoxylin counterstained specimens (X200 amplification) were orientated in such a way that the top represents the differentiated cell layer and the bottom the nondifferentiated basal cell layers.

pRb expression in invasive cervical carcinoma

In general, the intensity of reaction and the number of pRb positive cells in invasive uterine-cervix lesions were significantly lower than in SIL specimens but similar to normal samples. However, most of the positive invasive samples were classified as 2 (more than 50% of positive cells). Eleven invasive samples showed the lowest pRb immunoreactivity (see Table 1). A relation between pRb expression and clinical stage was not observed. The positive pRb immunostaining was quite heterogeneous; some samples showed negative pRb reaction in the majority of cells but slightly positive reaction in the cytoplasm (Fig. 2a), other samples contained intense nuclear staining (Fig. 2b,c) and few specimens showed nuclear and cytoplasmic immunostaining (Fig. 2d). In some specimens a weak nuclear immunoreaction was observed (Fig. 2e; indicated as 0 in Table 1). In a few samples, some positive cells formed clusters of variable size or were scattered throughout the section (Fig. 2f). Mitotic figures were found in 7/21 samples (Fig. 2c–e); among these, some presented frequent mitoses (20–30 mitotic figures per 10 LPF), and colleagues showed sporadic mitoses (2–5 mitotic figures detected also per 10 LPF). Approximately 10–20% of mitoses showed pRb immunoreactivity while the remaining were negative (Fig. 2e, see arrows). Most squamous carcinomas (Chen *et al.* 1995; Boyer *et al.* 1996) were classified as moderately differentiated (M), the remaining carcinomas were poorly differentiated (P). We observed in most of the poorly differentiated carcinomas a strong nuclear pRb immunoreaction, furthermore no relation between moderately differentiated carcinomas and pRb expression was observed.

In order to compare the presence of a protein that promotes cellular growth (Myc) with pRb, the pRb and Myc proteins were evaluated employing serial tissue sections from SILs (Fig. 3a,b) and invasive tumours (Fig. 3c,d).

As shown in Fig. 3, strong variations of immunoreaction intensity to c-Myc could be observed both in SIL (Fig. 3b) and in cervical carcinoma (Fig. 3d). Different immunostaining patterns were observed in the SIL and invasive samples; pRb negative/Myc slightly positive cells; pRb positive/Myc extremely low positive cells and pRb positive/Myc positive cells. This differential staining pattern of these proteins was confirmed employing double immunostaining technique in the samples (not shown). In general, proliferative activity was markedly increased in most tumour samples showing strong reactivity (70–90% of the cells), in contrast to SIL and normal tissues 50–70% and 40–50% of the cells, respectively (data not shown).

Discussion

Several studies in different normal or cancerous tissues, employing both protein and mRNA analysis, have indicated that rb gene is ubiquitously expressed (Friend *et al.* 1987; Harbour *et al.* 1988; Varley *et al.* 1989; Horowitz *et al.* 1990; Furukawa *et al.* 1991; Uzvolgyi *et al.* 1991; Cordon-Cardo & Richon 1994). However, these studies were unable to distinguish between different cell types within the tissues analysed. A few immunohistochemical studies on pRb in human cancer (Cance *et al.* 1990; Cordon-Cardo *et al.* 1992; Benedict *et al.* 1990), and in normal tissues, including the uterine-cervix, have been published, showing that pRb is expressed in mature and differentiated cells, in the basal third epithelium in 90% of normal/reactive atypia or in the scattered nuclei of normal cells in all cases investigated, respectively (Cordon-Cardo & Richon 1994; Amortehio *et al.* 1995; Sano *et al.* 1998). In the present work the percentage of pRb positive cells and cellular location in normal, SIL and invasive human uterine-cervix specimens was determined by immunohistochemical assays. As was previously found (Cordon-Cardo & Richon 1994; Sano *et al.* 1998), we observed that the majority of cells in the proliferating basal layer of the normal epithelium displayed low levels of pRb, whereas cells in the maturing suprabasal layers presented nuclear pRb staining, suggesting that pRb may inhibit proliferation of mature differentiating epithelial cells, rather than controlling cell-cycle progression of their dividing progenitors. In addition to previous reports (normal pRb expression in cervical carcinomas; Amortehio *et al.* 1995; Sano *et al.* 1998; Parker *et al.* 1997), we observed that pRb staining in invasive cervical lesions is frequently lower than in SIL, suggesting that rb gene downregulation could be involved in cervical carcinogenesis (Ludlow *et al.* 1993; Boyer *et al.* 1996; invasive carcinomas contained less than 10% of positive cells). Low expression of rb may also be related to pRb inactivation resulting from complex formation with high risk HPV E7 oncoprotein and its degradation (Whyte *et al.* 1988; Dyson *et al.* 1989; Boyer *et al.* 1996), downregulation mechanisms or rb gene mutations (deletions or point mutations). It is also possible that variable levels of E7 oncoprotein expression from cell to cell might contribute to the heterogeneity. Different types of human cancers have been associated with altered pRb expression patterns (Furukawa *et al.* 1991; Cance *et al.* 1990; Cordon-Cardo *et al.* 1992). Invasive cancers from early clinical stages frequently express high pRb levels (Varley *et al.* 1989; Xu *et al.* 1991a; Cordon-Cardo *et al.* 1992; Xu *et al.* 1991b; Yoshikawa *et al.* 1991b). However, late clinical stages of invasive cancers express low to undetectable

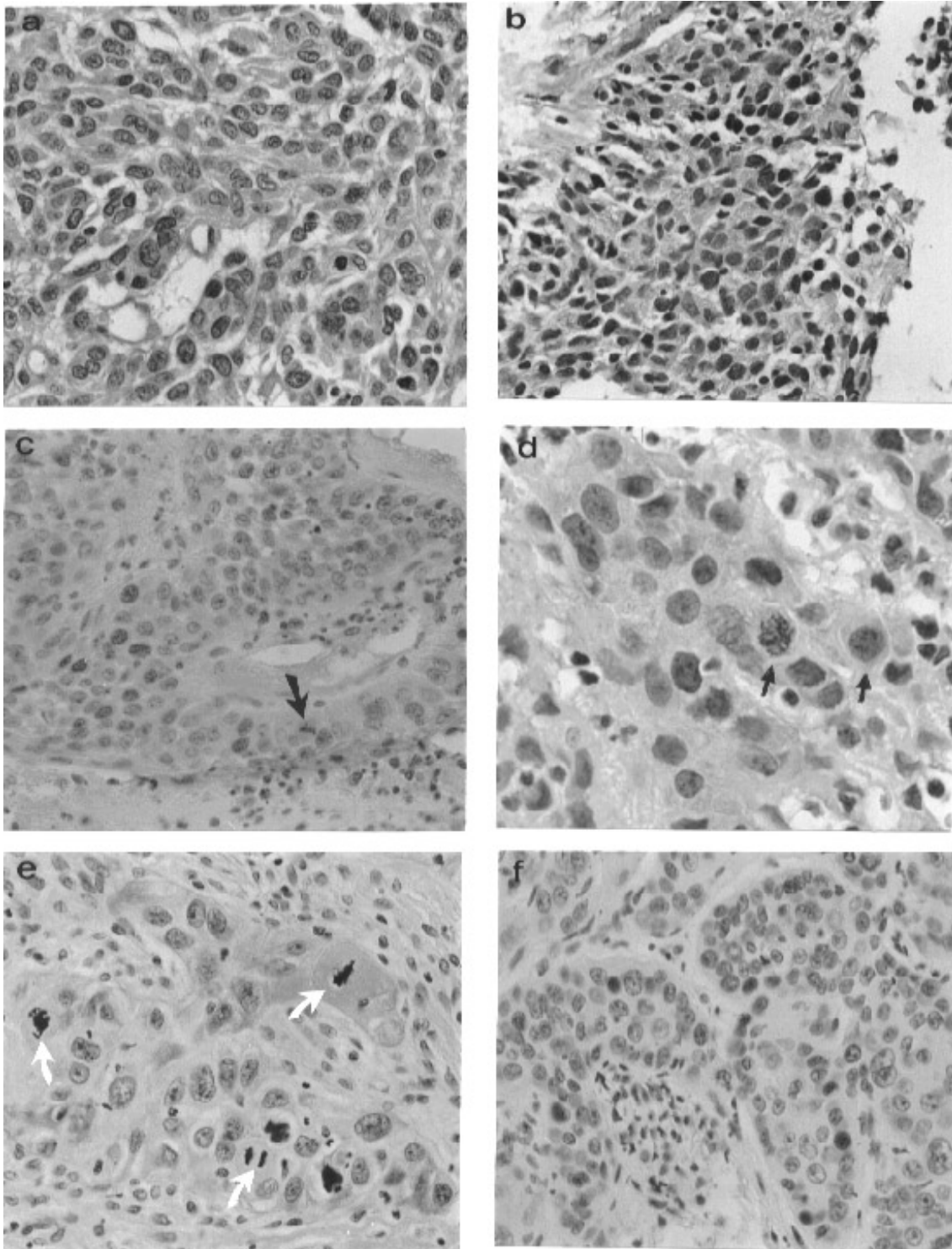


Figure 2. Immunodetection of pRb in invasive cervical carcinomas. Clinical stage I: (a) cytoplasmic pRb staining with a few positive nuclei, X400; (b) strong nuclear pRb immunoreaction, X400. Clinical stage II: (c) mostly nuclear pRb staining, X400; the arrow indicates a pRb positive staining mitosis; (d) nuclear staining, X800; the arrows show positive mitoses; (e) mitoses showing negative pRb staining (white arrows) in a cervical carcinoma presenting low pRb concentration, X400; (f) high intensity of pRb immunostaining in scattered nuclei, X400. All samples were haematoxylin counterstained.

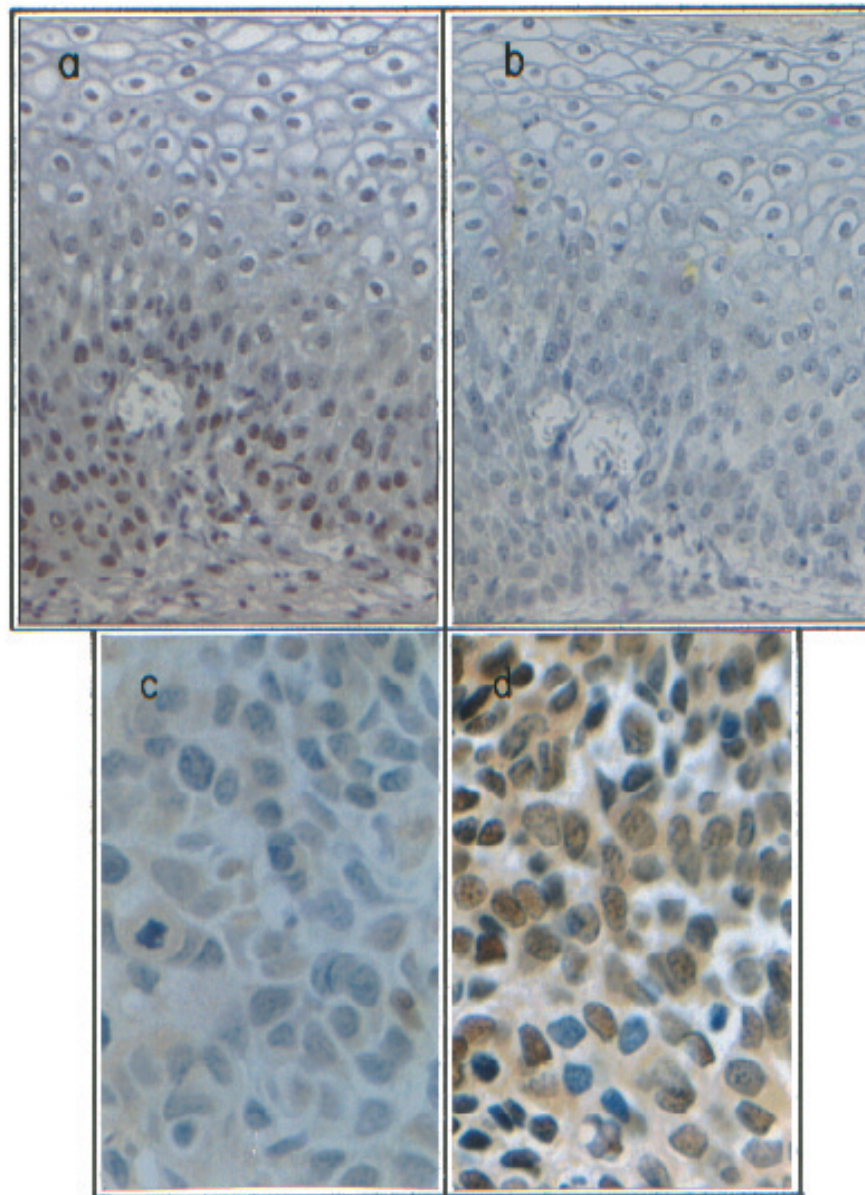


Figure 3. Differential immunodetection of pRb and c-Myc in human cervical specimens. Immunohistochemical analysis of pRb in a SIL, X160 (a) or in an invasive cervical carcinoma clinical stage II, X800 (c), showing different immunoreactivity. Immunodetection of Myc in SIL, X160 (b) and invasive cervical carcinoma, X800 (d), showing strong variations of Myc protein concentration. Brownish colour shows a positive immunoreaction. Tissue sections were haematoxylin counterstained.

levels of pRb (Cance *et al.* 1990; Xu *et al.* 1991a; Cordon-Cardo *et al.* 1992). Those authors have suggested that pRb negative tumours might be clinically more aggressive and with a poorer prognosis than those tumours containing a variable pRb expression (Harbour *et al.* 1988; Hanson *et al.* 1994; Benedict *et al.* 1990). Supporting this possibility, it has also been reported that rb gene expression inhibits tumour cell invasion *in vitro*

(Lij *et al.* 1996). In this scenario, we will expect similar results, that is that patients with invasive cervical tumours showing low levels of pRb will present a lower life expectancy than those with higher levels of this suppressor protein; however, we found that some patients with a very low number of pRb positive cells with low pRb levels are still alive. On the other hand, patients with high (cases 49 and 51) or low (cases 48 and 50) percentage of

pRb positive cells are dead. Thus, there must be no correlation between clinical stage or prognosis of cervical tumours and pRb detection. The number of specimens evaluated in this study is too small to allow statistically significant conclusions to be drawn.

Most cells in SILs and invasive tumours showed nuclear pRb detection but in five specimens pRb location was clearly cytoplasmic. Most published reports indicate nuclear pRb staining in a variety of tumours and normal tissues (Cordon-Cardo & Richon 1994; Cance *et al.* 1990; Cordon-Cardo *et al.* 1992; Benedict *et al.* 1990; Xu *et al.* 1991b; Zacksenhaus *et al.* 1993), considering cytoplasmic localization as an artifact (Benedict *et al.* 1990) or related to rb gene mutation (Zacksenhaus *et al.* 1993). Additional studies should be carried out to support these observations. In addition, some of the actively dividing cells (mitotic cells) showed cytoplasmic immunoreactivity with or without staining of the chromosomes, indicating that in the absence of nuclear envelope pRb diffuses to other cellular locations. Recently, it has been suggested that during cellular division, pRb may have a mitotic spindle function and/or represents part of a nuclear protein transport system (Thomas *et al.* 1996) which could partly explain positive pRb mitoses.

It has been reported that the c-Myc gene is positively regulated by the transcription factor E2F-1 (Gu *et al.* 1994; Amortegui *et al.* 1995; Dang *et al.* 1995; Hoang *et al.* 1995), suggesting that the interaction of pRb with E2F-1 downregulates c-myc expression (Hamel *et al.* 1992). In addition, Adhane *et al.* (1995) have shown that pRb negatively regulates Myc-mediated transcriptional control *in vivo*, through protein-protein interactions. Thus, pRb blocks both c-Myc transcription and Myc function as transcriptional factor and alterations of pRb expression or function could lead to c-Myc upregulation. We have recently determined in SILs a pRb suppressor effect on c-Myc expression *in vivo* (Salcedo *et al.* 1995). It has been extensively demonstrated the important role of c-Myc (overexpression and amplification) in the development of the uterine-cervix carcinomas (Ocadiz *et al.* 1987; Gariglio *et al.* 1987; Gariglio *et al.* 1993; Hidalgo *et al.* 2000; Solinas-Toldo *et al.* 1997). In the present work the results indicate that some regions in both SILs and cervical carcinoma specimens showed pRb negative/Myc positive cells or pRb positive/Myc slightly positive cells, with a few cells expressing both pRb and Myc, indicating that pRb-dependent c-Myc downregulation determined *in vitro* could also occur *in vivo*, suggesting that pRb must be functional in the SILs samples analysed. Genome instability due to low p53 levels by the continuous presence of HPV E6 oncoprotein (Rangel *et al.* 1994) could favour a variety of cellular gene

mutations important for tumour progression and partially responsible for the great heterogeneity of pRb detection observed within and among cervical tumours. For example, Benedict *et al.* (1990) suggest that during tumour progression the expression pattern of a group of genes implicated in this event, specifically pRb and p53, determined by immunohistochemistry staining, could be an important key to understand the spatio-temporal participation of these genes in tumour evolution.

Due to the multistep nature of cancer, this could suggest that in pRb negative carcinomas rb gene alterations might be related to neoplastic initiation. If reactivity were heterogeneous (mixture of positive and negative cells) a progressional role would be more likely (Benedict *et al.* 1990). In this context, our findings in the present work could suggest that in the majority of the cervical carcinomas, low levels or absence of pRb probably due to different molecular mechanism are involved in cancer progression. In conclusion, even though changes in pRb concentration in individual cells should be observed as they undergo G0/middle G1 phases of the cycle (Xu *et al.* 1991b), in those cells presenting rb gene alterations or HPV infection (different E7 oncoprotein concentrations), the pRb detection could be very low to undetectable as we found in cervical carcinoma samples.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia F383-M9304, 3385P-M9608, 4895-N (México), UNIDO (Trieste, Italy), PNUD and Aaron Saenz Association. We thank Dr D. Jenkins (University of Nottingham, UK) and Nikki Baird-Salcedo for critical review of this manuscript. We also acknowledge Ms. G. Mora, A. Marroquín, E. García, R. Ocadiz, O. López (Hospital General de Naucalpan, México) and Dr M. Bonilla (UNAM) for technical assistance. We thank Dr F. Cruz (Centro de Referencia Nacional de Displasias, Hospital General de México, S.S.) and Dr C. Aranda (Clínica de Displasia, Instituto Nacional de Perinatología, S.S.) for providing tissue samples. We would also like to thank Dr E. Garrido (CINVESTAV, México) for kindly providing the pCMV-Rb plasmid and Saos-2 cells.

References

- ADNANE J. & ROBBINS P.D. (1995) The retinoblastoma susceptibility gene product regulates myc-mediated transcription. *Oncogene* **10**, 381-387.

- AMORTEGUI A.J., MEYER M.P., ELBORNE V.L. & AMIN R.M. (1995) P53, retinoblastoma gene product, and cyclin protein expression in human papillomavirus DNA-positive cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Mod Pathol* **8**, 907–912.
- BEJERSBERGEN R.L., HIJMANS E.M., ZHU L. & BERNARDS R. (1994) Interaction of C-Myc with the pRb-related protein p107 results in inhibition of C-Myc-mediated transactivation. *EMBO J.* **13**, 4080–4086.
- BENEDICT W.F., XU H.J., HU S.X. & TAKAHASHI R. (1990) The role of the retinoblastoma gene in initiation and progression of human cancer. *J. Clin. Invest* **85**, 988–993.
- BOYER S.N., WAZER D.E. & BAND V. (1996) E7 protein of Human Papilloma Virus-16 induces degradation of Retinoblastoma protein through the Ubiquitin-Proteasome pathway. *Cancer Res.* **56**, 4620–4624.
- CANCE W.G., BRENNAN M.F., DUDAS M.E., HUANG C.M. & CORDON-CARDO C. (1990) Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1457–1462.
- CHEN P.-L., RILEY D.J. & LEE W.-H. (1995) The retinoblastoma protein as a fundamental mediator of growth and differentiation signals. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **5**, 79–95.
- CHOO K.B. & CHONG K.Y. (1993) Absence of mutation in the p53 and the retinoblastoma susceptibility genes in primary cervical carcinoma. *Virology* **193**, 1042–1046.
- CORDON-CARDO C. & WARTINGER D., PETRYLAK D. ET AL. (1992) Altered expression of the retinoblastoma gene product is prognostic indicator in bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 1251–1256.
- CORDON-CARDO C. & RICHON V.M. (1994) Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am. J. Pathol* **144**, 500–510.
- DANG C.V. & LEE L.A. (1995) Structure of the c-myc gene and its transcription. In: *C-Myc function in neoplasia. Medical Intelligence Unit*. Georgetown, TX: R.G. Landes Company pp. 73–84.
- DECAPRIO J.A., FURUKAWA Y., AJECHENBAUM F., GRIFFIN J.D. & LIVINGSTON D. (1992) The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **89**, 1795–1798.
- DYSON N., HOWLEY P.M., MÜNGER K. & HARLOW E. (1989) The human papillomavirus 16, E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934–937.
- FRIEND S.H., HOROWITZ J.M., GERBER M.R. ET AL. (1987) Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **84**, 9059–9063.
- FURUKAWA Y., DECAPRIO J.A., BELVIN M. & GRIFFIN J.D. (1991) Heterogeneous expression of the product of the RB gene in primary human leukemia cells. *Oncogene* **6**, 1343–1346.
- GARIGLIO P., OCADIZ R. & SAUCEDA R. (1987) Human papillomavirus DNA sequences and C-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells, Papillomavirus, CSH* **5**, 343–348.
- GARIGLIO P. & SALCEDO M. (1993) Molecular genetics of uterine cervix carcinoma. Involvement of C-myc oncogene. In: *XVII World Congress of Anatomic and Clin. Pathol.* (Ed: G. SANTOSCOY) pp. 295–300. Bologna, Italy: Monduzzi Editore.
- GERADTS J., HU S.X., LINCOLN C.E., BENEDICT W.F. & XU H.J. (1994) Aberrant RB gene expression in routinely processed, archival tumor tissues determined by three different anti-RB antibodies. *Int. J. Cancer* **58**, 161–167.
- GU W., BHATIA K., MAGRATH I.T., DANG C.V. & DALLA-FAVERA R. (1994) Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science* **264**, 251–254.
- HARBOUR J.W., LAI S.L., WHANG P.J., GAZDAR A.F., MINNA J.D. & KAYE F.J. (1988) Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* **241**, 353–357.
- HAMEL P., GILL R., PHILLIPS R. & GALLIE B. (1992) Transcriptional repression of the E2F-containing promoters E1aE, C-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene. *Mol Cell Biol.* **12**, 3431–3438.
- HANSON K.D., SHICHIRI M., FOLLANSBEE M.R. & SEDIVY J.M. (1994) Effect of C-myc expression on cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* **14**, 5748–5755.
- HIDALGO A., SCHEWE C., PETERSEN S. ET AL. (2000) Human papillomavirus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumour cell lines. *Eur J. Cancer* **36**, 542–548.
- HOANG A.T., LUTTERBACK B., LEWIS B.C. ET AL. (1995) A link between increased transforming activity of lymphoma-derived MYC mutant alleles, their defective regulation by p107, and altered phosphorylation of the C-Myc transactivation domain. *Mol Cell Biol.* **15**, 4031–4042.
- HOROWITZ J.M., PARK S.H., BOGENMANN E. ET AL. (1990) Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **87**, 2775–2779.
- HUANG H.J., YEE J.K., SHEW J.Y. ET AL. (1988) Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the Rb gene in human cancer cells. *Science* **242**, 1563–1566.
- HU Q., LEES J.A., BUCHKOVICH K.J. & HARLOW E. (1992) The retinoblastoma protein physically associates with the human cdc2 kinase. *Mol Cell Biol.* **12**, 971–980.
- LAIMINS L.A. (1993) The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infect. Agents Dis.* **2**, 74–86.
- LEE W.H., SHEW J.Y., HONG F.D. ET AL. (1987) The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* **329**, 642–645.
- LIJ HU S.X., PERNG G.S., ZHOU Y. ET AL. (1996) Expression of the retinoblastoma (RB) tumor suppressor gene inhibits tumor cell invasion in vitro. *Oncogene* **13**, 2397–2405.
- LUDLOW J.W., GLENDENING C.L., LIVINGSTON D.M. & DECAPRIO J.A. (1993) Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* **13**, 367–372.
- OCADIZ R., SAUCEDA R., CRUZ M., GRAEF A. & GARIGLIO P. (1987) High correlation between molecular alterations of the C-myc oncogene and uterine cervix carcinoma. *Cancer Res.* **47**, 4173–4177.
- PARKER M.F., ARROYO G.F., GERADTS J.B. ET AL. (1997) Molecular characterization of adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.* **64**, 242–251.
- PFISTER H. (1987) Human papillomavirus and genital cancer. *Adv. Cancer Res.* **48**, 113–147.
- RANGEL L.M., RAMIREZ M., TORROELLA M., PEDROZA A., IBARRA V. & GARIGLIO P. (1994) Multistep carcinogenesis and genital papillomavirus infection. Implications for diagnosis and vaccines. *Arch. Med. Res.* **25**, 265–272.
- RESNITZKY D. & REED S. (1995) Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3463–3469.

- RUSTGI A.K., DYSON N.J. & BERNARDS R. (1992) Amino-terminal domains of C-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* **353**, 541–544.
- SALCEDO M., GARRIDO E., TAJA L. & GARIGLIO P. (1995) The retinoblastoma gene product negatively regulates cellular or viral oncogene promoters in vivo. *Arch. Med. Res.* **26**, S157–S162.
- SANO T., OYAMA T., KASHIWABARA K., FUKUDA T. & NAKAJIMA T. (1998) Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol. Int.* **48**, 580–585.
- SCHIEFFNER M., MUNGER K., BYRNE J.C. & HOWLEY P. (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5523–5527.
- SHEW J.Y., LIN B.T., CHEN P.L., TSENG B.Y., YANG-FENG T.L. & LEE W.H. (1990) C-terminal truncation of the retinoblastoma gene product leads to functional inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **87**, 6–10.
- SHIRODKAR S., EWEN M., DECAPRIO J.A., MORGAN J., LIVINGSTON D.M. & CHITTENDEN T. (1992) The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle regulated manner. *Cell* **68**, 157–166.
- SOLINAS-TOLDO S., DÜRST M. & LICHTER P. (1997) Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3854–3859.
- THOMAS R., EDWARDS M. & MARKS R. (1996) Translocation of the retinoblastoma gene product during mitosis. *Exp Cell Res.* **223**, 227–232.
- UZVOLGYI E., CLASSON M., HENRIKSSON M. *ET AL.* (1991) Reintroduction of a normal retinoblastoma gene in osteosarcoma cells inhibits the replication associated function of SV40 large T antigen. *Cell Growth Differ.* **2**, 297–303.
- VARLEY J.M., ARMOUR J., SWALLOW J.E. *ET AL.* (1989) The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumors. *Oncogene* **4**, 725–729.
- WHYTE P., BUCHKOVICH K.J., HOROWITZ J.M. *ET AL.* (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A protein binds to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**, 124–129.
- WREDE D., TIDY J.A., CROOK T., LANE D. & VOUSDEN K.H. (1991) Expression of RB and p53 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* **4**, 171–175.
- XU H.J., HU S.X., CAGLE P.T., MOORE G.E. & BENEDICT W.F. (1991a) Absence of retinoblastoma-protein expression in primary non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* **51**, 2735–2739.
- XU H.J., HU S.X. & BENEDICT W.F. (1991b) Lack of nuclear RB protein staining in G0/middle G1 cells: correlation to changes in total RB protein level. *Oncogene* **6**, 1139–1146.
- YOSHIKAWA H., KAWANA T., KITAGAWA K., MIZUNO M., YOSHIKURA H. & IWAMOTO A. (1991a) Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J. Cancer Res.* **82**, 524–531.
- ISHIKAWA J., XU H.J., HU S.X. *ET AL.* (1991b) Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Res.* **51**, 5733–5743.
- ZACKSENHAUS E., BREMNER R., PHILLIPS R.A. & GALLIE B.L. (1993) A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. *Mol Cell Biol.* **13**, 4588–4599.
- ZUR HAUSEN H. (1991) Viruses in human cancers. *Science* **254**, 1167–1173.

SHORT REPORT

A simple method for the construction of small format tissue arrays

A Hidalgo, P Piña, G Guerrero, M Lazos, M Salcedo

J Clin Pathol 2003;56:144–146

Tissue arrays can evaluate molecular targets in high numbers of samples in parallel. Array construction presents technical difficulties and tissue arrayers are expensive, particularly for small and medium sized laboratories. This report describes a method for the construction of 36 sample arrays using widely available materials. A blunted 16 gauge needle for bone marrow aspiration was used to extract paraffin wax cylinders and manually define a 6 × 6 matrix on a blank paraffin wax block. Tissue cores from 36 paraffin wax embedded premalignant lesions and invasive cervical carcinomas were injected into the matrix using a 14 gauge needle. This tissue array was sectioned using a standard microtome and used for the immunodetection of CD44 variant 9 and interleukin 18 with satisfactory results. This method can be applied in any laboratory, without the need of specialised equipment, offering a good alternative for the wider application of tissue arrays.

Tissue arrays make possible the high throughput validation of novel tumoral markers.¹ The parallel analysis of large numbers of tissues under the same experimental conditions represents savings both in time and resources.² This technology offers a way to fill the gap between the discovery of new molecular markers, derived from high throughput genomic analysis, and their application in the clinical setting.³ Despite the flexibility and benefits of this method, its broader use has been hampered because of the technical difficulties of array construction and the costs of available arrays. Tissue microarrays are available from commercial and academic sources (<http://www.nhgri.nih.gov/DIR/CGB/TMA/TARP.html>), but the construction of custom arrays is still necessary, especially if the tissue of interest is not present in the available arrays. To allow a broader application of this technology, we developed an easy method for the construction of small format tissue arrays containing 36 samples. These arrays can be constructed using materials available in every hospital and do not require specialised equipment.

“Tissue microarrays are available from commercial and academic sources, but the construction of custom arrays is still necessary, especially if the tissue of interest is not present in the available arrays”

MATERIAL AND METHODS

Both 16 gauge (16G) and 14G bone marrow aspiration needles were blunted and sharpened using a grinding machine. The 16G needle was used to punch paraffin wax cylinders, which were 3 mm in height and 2 mm in diameter, defining a 6 × 6 cylinder matrix on a 2.5 × 2.5 cm paraffin wax block. The 14G needle was used to obtain tissue cylinders from 36 paraffin wax embedded tissues, which were injected into the blank paraffin wax block. We used tissues derived from preinvasive

lesions and invasive cervical carcinomas for array construction. Tissues were obtained from the histopathological archives of the pathology departments, Hospital General de México, S.S. and Hospital de la Mujer, S.S. Once the array was completed, a small amount of hot liquid paraffin wax was poured over the array surface and the tissue cylinders were levelled with the block using a glass slide. To blend together the paraffin wax from the blank block and the tissue cylinders, the array was incubated on the slide at 60° C for 15 minutes. After incubation, the array was chilled on ice and 5 µm sections were obtained using a rotatory microtome. Array sections were mounted on sylanised slides and incubated overnight at 40°C. Immunohistochemical analysis was performed using antibodies against interleukin 18 (IL-18; 1/200 dilution; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA) and CD44 variant 9 (CD44V9; 1/1000 dilution; US Biological, Swampscott, Massachusetts, USA), using the Dako Envision system (Dako, Carpinteria, California, USA), according to the manufacturer's instructions. Antigen retrieval was done using the Vector antigen retrieval solution (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) in a standard microwave oven for 10 minutes at power level 1.

RESULTS

The smaller diameter (16G) of the needle used to punch the blank paraffin wax block allowed the bigger tissue cores (14G) to fit exactly into the blank. Because of this, core injection has to be done carefully to avoid the possible breakage of the tissue cylinder. The combination of this tight fitting, the use of hot liquid paraffin wax, and incubation in the oven resulted in a solid, homogeneous paraffin wax surface, thereby avoiding possible tissue loss during array construction or sectioning. A 6 × 6 sample matrix (fig 1A) was the most appropriate for the size of the blank block that we used, but the number of arrayed tissues could possibly be increased, depending on the type of blank block used. The array sectioning was the most difficult step of the process. The use of new disposable blades and cooling the array on ice improved the sectioning process. Tissue spots were lost, especially during block orientation and positioning, but once the array was oriented with the blade, the average number of losses was two to three tissue spots every six to 10 sections. Depending on the height of the original donor tissue, we were able to get 40 to 60 complete array sections from each tumour array. However, these numbers might be an underestimate because the original tissue blocks used for array construction were quite old and have been sectioned many times before.

We successfully performed IL-18 and CD44V9 immunodetection without substantial tissue cylinder loss during antigen retrieval or washes. Figure 1 shows the different tissues after immunohistochemistry.

Abbreviations: CD44V9, CD44 variant 9; G, gauge; IL, interleukin

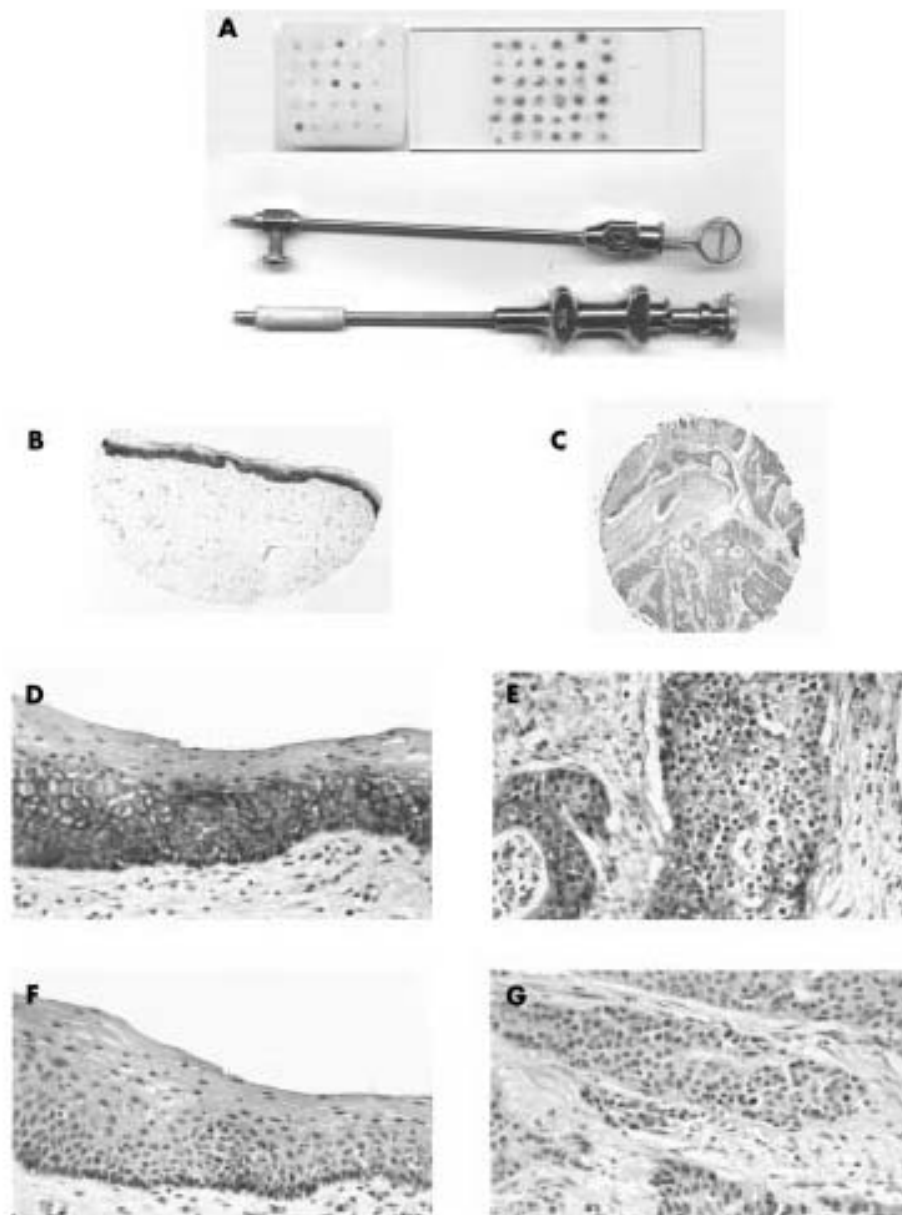


Figure 1 Small format tissue array construction. (A) The equipment needed for array construction: the 16 gauge and 14 gauge needles, the array block, and a haematoxylin and eosin stained array section. CD44 variant 9 immunostaining on (B) a cervical premalignant lesion and (C) an invasive cervical carcinoma cylinder. (D, E) Enlarged areas from (B) and (C), respectively. Interleukin 18 immunostaining in (F) a premalignant lesion and (G) an invasive tumour.

DISCUSSION

Manual tissue array construction using the method described here is a cheap and easy alternative for small laboratories. The 2 mm diameter of the tissue cylinders maintained recognisable histological features of the arrayed tissues, and offered more tissue surface to evaluate immunostaining. This increased cylinder size also makes the correct sampling of premalignant cervical lesions easier and more accurate. Normally, tissue microarray sections are obtained using an adhesive tape that prevents the array sections from breaking apart. However, the tape system needs several accessories, and its cost is quite high. Manual microtome sectioning is also used with tissue microarrays, but this demands that the histotechnologist sectioning the array should be very experienced. Once complete sections of our array were obtained, it was necessary to cut as many sections as possible, because proper orientation of the array with the microtome blade might result in important loss of tissue spots. A very similar approach for manual tissue array construction

has been described previously.⁴ That method used a standard R A Lamb processing cassette as a 34 hole template and needles with different diameters for punching. However, the paper did not fully describe the complete array construction method, the number of tissue spots lost during sectioning, or the number of sections that can be obtained from the array.⁴ The use of the cassette as a template allows an even and ordered distribution of the cores in the array, but it obviously limits the number of arrayed samples. This situation does not arise with the method that we describe.

"The 2 mm diameter of the tissue cylinders maintained recognisable histological features of the arrayed tissues, and offered more tissue surface to evaluate immunostaining"

Even though the arrays that we describe contain a small number of samples compared with other tissue microarrays,

Take home messages

- We have developed a method that offers an economical alternative for the construction of small format tissue arrays (36 samples)
- This method can be used to validate emerging molecular markers in small or medium sized laboratories

which can contain up to 600 samples, they are still a good alternative when time and money need to be conserved, if a tissue arrayer is not available, or if a limited number of samples needs to be tested.

In summary, the method described here offers an economical alternative for the construction of small format tissue arrays, which can be used to validate emerging molecular markers in small or medium sized laboratories.

Authors' affiliations

A Hidalgo, P Piña, M Salcedo, Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, México DF, 06720

G Guerrero, Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de la Mujer, S.S., Mexico 11340

M Lazos, Departamento de Patología, Hospital General de México, S.S., Mexico 06726

Correspondence to: Dr M Salcedo, Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Coordinación de Investigación en Salud, Hospital de Oncología, Centro Médico Siglo XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México DF, 06720; alfhm@yahoo.com; maosal89@yahoo.com

Accepted for publication 4 October 2002

REFERENCES

- 1 **Kononen J**, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al*. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;**4**:844–7.
- 2 **Kallioniemi O**, Wagner U, Kononen J, *et al*. Tissue microarray technology for high throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001;**10**:657–62.
- 3 **Rimm D**, Camp R, Charette L, *et al*. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp Mol Pathol* 2001;**70**:255–64.
- 4 **Gillett C**, Springall R, Barnes D, *et al*. Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J Pathol* 2000;**192**:549–53.

What's in the next issue

Future content

See which articles have just been accepted for publication and preview the table of contents for the next issue a month before it is published

www.jclinpath.com

**Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in
uterine cervix carcinoma tumors and cell lines**

Running title: Microarray CGH in cervical carcinoma

Hidalgo A¹, Baudis M², Petersen I³, Piña P¹, Vázquez-Ortiz G¹, Hernández D⁴, González J⁵, Lazos M⁶, López R¹, Pérez C¹, García J⁷, Vázquez K¹, Alatorre B¹, Salcedo M¹

1 Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, México.

2 Division of Pediatric Haematology/Oncology, University of Florida, Gainesville, USA.

3 Institute of Pathology, University Hospital Charité, Berlin, Germany

4 Sección de epidemiología, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, México.

5 Clínica de Displasias, Hospital de Gineco-obstetrica No. 4, Luis Castelazo Ayala-IMSS

6 Departamento de Patología, Facultad de Medicina UNAM-Hospital General de México, SS, México.

7 Laboratorio de Biología Teórica, Departamento de Investigación, Universidad La Salle, México.

Corresponding author: Dr. Mauricio Salcedo
Laboratorio de Oncología Genómica
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas
Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS
Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México DF. 06720.
Tel: 52/55/56276900, Fax: 52/55/57610952
e-mail: alfhm@yahoo.com , maosal89@yahoo.com

Journal Category: Cancer Genetics

Keywords: cervical carcinoma, comparative genomic hybridization, microarrays, human papilloma virus.

Abbreviations:

CGH: Comparative Genomic Hybridization, UCC: Uterine cervix carcinoma, HPV: Human papilloma virus, DAPI: 4,6-diamino-2-phenylindole.

ABSTRACT

Chromosomal Comparative Genomic Hybridization (CGH) has been applied to all stages of cervical carcinoma progression, defining a specific pattern of chromosomal imbalances in this tumor. However, given its limited spatial resolution, metaphase CGH has offered only general information regarding the possible genetic targets of DNA copy number changes. In order to further define specific DNA copy number changes in cervical cancer, we analyzed 12 cervical carcinoma-derived samples by metaphase CGH, and combined these results with our previously published data to build a database of 40 samples to analyze the chromosomal imbalances in this collective. Another set of 20 cervical samples (3 pre-malignant lesions, 10 invasive tumors, and 7 cell lines), were analyzed using the GenoSensor microarray CGH system to define particular genetic targets that suffer copy number changes. The metaphase CGH experiments showed a consistent pattern of chromosomal alterations that was further detailed by the use of microarray CGH. The most common DNA gains detected by array CGH were located at the RBP1-RBP2 (3q21-q22) genes, the sub-telomeric clone C84C11/T3 (5ptel), the marker D5S23 (5p15.2) and the DAB2 gene (5p13) in 50% of the samples. The most common losses were found at the FHIT gene (3p14.2) in 40% of the samples, followed by EIF4E (4q24) and the clones D9S325 (9qtel) and AR (Xq11-q12) in 35% of the samples. Our results confirm the presence of a specific pattern of chromosomal imbalances in cervical carcinoma and define specific targets that are suffering DNA copy number changes in this neoplasm.

INTRODUCTION

Uterine cervix carcinoma (UCC) represents the second cause of cancer related death among the female population worldwide. The fact that more than 99% of all the cervical invasive tumors are positive for infection with high risk human papillomavirus (HPV) suggests that this is one of the most important factors for the development of this neoplasm (1, 2). High risk HPVs can induce cellular transformation by several mechanisms; the viral oncoproteins E6 and E7 can interact with cellular proteins involved in important cellular functions, such as tumor suppression, apoptosis, cell cycle control, genomic instability, transcriptional regulation and immune evasion (3).

The induction of genomic instability by HPV seems to be particularly important for the establishment and development of an invasive tumor (4, 5) since this increased genomic plasticity would generate cellular clones with enhanced transforming and invasive potential (6)

Previously, chromosomal comparative hybridization (CGH) has been applied on all the stages of cervical carcinoma progression (4, 7-19), detecting specific patterns of chromosomal imbalances that arise early during the development of cervical carcinoma. A model has been proposed where the gain of chromosome 3q is considered as the genetic alteration that defines the transition from a pre-malignant lesion to an invasive carcinoma (4). Also, some of these imbalances have been related to specific clinical behaviors, such as the presence of lymph node metastases (9). However, given the spatial resolution of CGH (20), little is known about the identity of specific genes that might be the targets of regional chromosomal imbalances. The recently introduced techniques of matrix-CGH or microarray CGH addresses this problem through the use of defined genomic DNA fragments arrayed onto a solid surface (21-23), thereby achieving a resolution of copy number imbalances up to the single gene level.

In order to refine the patterns of chromosomal imbalances present in cervical carcinoma, and trying to identify specific genes that might be targets of copy number changes in this tumor, we have applied metaphase CGH on 16 cervical carcinoma samples. Based on these results and on our previously published results on cervical carcinoma (18, 19) we constructed a CGH database of chromosomal

imbalances in 40 cases. Finally, we used microarray CGH on three pre-malignant lesions, 10 invasive UCC and seven UCC derived cell lines to detect DNA copy number changes on the single gene level.

MATERIALS AND METHODS

Cervical tissues. All described procedures have been evaluated and approved by the local committee of ethics of the Mexican Institute of Social Security and all samples were taken after informed consent from the patients. The pre-malignant lesions and the invasive tumors were collected by colposcopy-directed biopsies at the Gynecology Department of the Hospital General de México, Mexico City. The biopsies were divided in three sections. The central part was used for genomic DNA extraction using the Wizard Genomic kit (Promega, Madison, WI, USA), and the extremes were fixed with 70% ethanol overnight and paraffin embedded. Hematoxylin-eosin stained sections from these biopsies were analyzed in order to confirm the presence of at least 70% tumoral cells in the samples.

Cell lines. The cell lines included CasKi, SiHa, both positive for HPV16, and HeLa (HPV18). CaLo, ViBo (established from stage IIB invasive tumors), INBL and RoVa (stage IVA) are HPV18 positive cell lines and were established from tumor explants at the laboratory of Cell differentiation and Cancer of the National University of Mexico (24). The metaphase CGH profiles of CaLo, ViBo, INBL and RoVa have been published recently (19).

HPV detection and typing. HPV detection was carried out by PCR using the consensus primers MY09 and MY11 for the L1 region of the viral genome. After a 5 min. denaturation at 94° C, 100 ng of DNA were subjected to 35 amplification cycles with the following parameters: 94° C for 1 min., 55° C for 2 min. and 73° C for 3 min., with a final extension step of 7 min. at 72° C. The amplicon was labeled using the Big Dye sequencing kit and sequenced on an ABI371 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA at the Instruments Core of our Institute). BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sequence comparison was used in order to define the viral type.

Chromosome CGH. All CGH procedures were performed using reagents and kits from Vysis Inc. (Downers Grove, IL), following the manufacturer's instructions. DNA was labeled using the CGH nick translation kit, and the hybridization mixture was prepared according to the CGH reagent kit, consisting of 200 ng of spectrum-green labeled tumor DNA, 100 ng of spectrum-red labeled normal male reference DNA and 20 µg of human Cot-1 DNA. Hybridization was performed over 3 days at 37°C on normal male metaphase spreads (Vysis, Downers Grove, IL).

Digital images were collected using the Smart Capture (Vysis) software with a charged coupled device camera mounted on an epifluorescence microscope. An average of 15 metaphases per case were analysed using the Vysis CGH software using a >1.2 ratio threshold for detecting DNA gains and <0.8 for losses. These thresholds were chosen based on previous normal vs. normal hybridizations. Sex chromosomes and heterochromatic areas (centromeric and paracentromeric regions of chromosomes 1, 9, 16, p arms of acrocentric chromosomes) were excluded from the analysis. A "reverse painting" experiment was used as a control for the CGH results.

Database construction and analysis. The database of chromosomal imbalances in 40 cervical carcinoma-derived tissues contained the results obtained in these work on 12 cervical carcinoma cases and previously published data: four new cervical carcinoma derived cell lines (19) and the chromosomal imbalances detected in 12 CC cell lines and 12 primary tumors (18). The data derived from the cell lines is available at the NCI and NCBI Spectral Karyotyping (SKY) and CGH Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/>), the data from reference 14 is available at: www.amba.charite.de/cgh. The whole dataset, including the array CGH results is available at: (www.progenetix.net: complete path to follow). The database described the chromosomal imbalances detected in each case using the international system of cytogenetic nomenclature (ISCN) and was analyzed using the ISCN2matrix software developed for the PROGENETIX project (25) in order to generate a band specific matrix with a 862 band resolution suitable for data mining experiments. The software also generates a histogram showing an incidence curve of the chromosomal alterations along the genome.

Microarray CGH. Microarray CGH was performed using the GenoSensor Array 300 system, following the manufacturer's instructions (ABBOT-Vysis, Downers Grove, IL, USA). Each array contains 861 spots, representing 287 chromosomal regions that are commonly altered in human cancer, such as telomeres, regions involved in microdeletions, oncogenes and tumor suppressor genes. Briefly, 100 ng of genomic DNA were labeled by a random primer reaction during two hrs. Tumor DNA was labeled with Cy3 and the normal female reference DNA with Cy5. After the labeling reaction, the

probes were digested with DNase at 15° C for one hr., followed by two ethanol-purifications; finally throbe size was checked by gel electrophoresis. The hybridization mixture consisted of 2.5 µl of each of the DNAs differentially labeled plus 25 µl of hybridization buffer provided in the kit. This mixture was denatured at 80° C for 10 min. at 80° C, followed by incubation at 37° C for one hr. Five microliters of this probe was applied onto the spotted area of the array under a coverslip and hybridized in a humid chamber containing 50% formamide (FA)/2XSSC at 37° C for 72 hrs. After hybridization, the arrays were washed 3X in 50%FA/2XSSC at 40° C for 10 min/wash, followed by four 5 min. washes in 1XSSC at room temperature. Finally, the arrays were briefly rinsed in distilled water, mounted and counterstained in the dark for 45 min. with DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole).

Image capture and analysis. Array analysis was performed immediately after counterstaining using the GenoSensor scanner and software. This system generates a “genomic analysis report”, indicating which chromosome regions in the array are involved in copy number changes, as well as a spreadsheet containing the data generated by a single experiment. In order to compare all the experiments, a database was created using the normalized, bias corrected, tumor/normal ratio value of each experiment, since each spot in the array is present in triplicates, the median of the three spots was calculated and its \log_2 transformed value was used for further analysis. A fluorescence ratio >1.25 ($\log_2 = 0.32$) was considered as a DNA gain, while DNA losses were scored when the ration was <0.75 ($\log_2 = -0.41$). A ratio >2 ($\log_2 = 1$) was considered as a high copy number amplification.

Hierarchical clustering analysis and K means clustering were performed on this data using the Cluster program, visualization of the copy number dendrograms was carried out using the Treeview software by Michael Eisen (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). The CIT software (Cluster Identification Tool, version 0.9.2 beta, http://ihome.cuhk.edu.hk/~b400559/arraysoft_mining_specific.html) was used to find the significantly different genes in the samples with a high number of alterations.

RESULTS

HPV detection and typing. One of the premalignant lesions was positive for HPV16 infection; one for HPV31 and the other for HPV58. In the invasive tumors, seven were positive for HPV16 and in three cases, we were not able to detect HPV sequences with the oligonucleotides we used for PCR

amplification. As expected, CasKi and SiHa were positive for HPV16, while HeLa, INBL, CaLo, ViVo and RoVa were positive for HPV18.

Chromosome CGH. The histogram showing the chromosomal imbalances detected in 12 cervical carcinoma-derived tissues is shown 1. The most common alterations in this set of samples were DNA gains at 3q with a consensus region at 3q24 (75% of the samples), followed by 4q24-q25 gained in 58.3% of the cases. For the DNA losses, the most commonly deleted regions were detected at 17q24-q25, and 4p16 in 58.3% of the cases, followed by losses at 1p36, 16p13, 19p13, 22q13-q34 and 10q26, present in 50% of the samples.

Database construction and analysis. The CGH histogram of the 40 cases included in the database is presented in figure 2. The most common DNA gains in this group of samples were detected at chromosome arm 3q, particularly at 3q23 and 3q26.1 in 60% of the samples, followed by 3q22 and q26.2, gained in 57.5% of the samples. DNA gains were also detected at 5p12 (50%) and 5p11-p14 (47.5%). In the cases of the DNA losses, the most common deletion was found at 2q37, in 52.5% of the samples, followed by 4p16 in 50% of the cases.

Microarray CGH. All our samples, except one pre-malignant lesion, presented alterations, ranking from 1/287 (alterations/total targets in the array) in another pre-malignant lesion, to 175/287 alterations in the cell line RoVa. The number of amplifications almost doubled the deletions (571 VS 298) and the average number of copy number alterations (ANCA=total number of alterations in the sample collective/total number of cases) was 43.45 per case.

One of the pre-malignant lesion did not show any alteration, while amplifications at *MSH2-KCNK12* (2p22.3-2p22.1), *TCL1A* (14q32.1) and *TOP1* (20q12) were found in other premalignant-lesion and *DMBT1* (10q25.3), *ERBB2* (17q12) and 4qTEL11 (4qtel) amplification was found in the remaining sample from this group.

In the invasive tumors and the cell lines, the most common amplifications (10/17 samples, 58.8%) were found at the clones *RBP1-RBP2* (retinol binding protein 1 and 2, 3q21-q22), present as a high copy number amplification (HCNA) in two samples; *Tp63* (3q27-q29, 2 HCNA), *DAB2* (disabled

homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (*Drosophila*), 5p13, HCNA 2 samples), D5S23 (5p15.2, HCNA 4 cases) and C84C11/T3 (5ptel, HCNA 5 samples).

Amplifications at *EGFR* (Epidermal growth factor receptor, 7p12.3-p12.1, 4 HCNA), D5S2064 (5p15.2, 2 HCNA), were detected in 9/17 (52.9%) of the invasive samples, followed by amplification of *INS* (Insulin, 11ptel) in 8/17 (47%) of the samples.

The most common deletion was found at the clone corresponding to the *FHIT* (Fragile histidine triad) gene (3p14.2), present in 8/17 (47%), followed by deletions at D8S504 (8p23.3), *CTDP1-SHGC-145820* (18qtel), *KIT* (4q11-q12), D1S427-*FAF1* (1p32.3), D9S325 (9qtel), *EIF4E* (eukaryotic translation initiation factor 4E, 4q24), *RB1* (13q14), and DXS7132 (Xq12) present in 5/17 (29.4%) of the samples. A histogram presenting the DNA copy number alterations present in the samples analyzed by array CGH is presented in figure 3.

Hierarchical clustering grouped the samples according to their total number of alterations. The most separated branch of the dendrogram grouped the samples with an ANCA of 98, the other branch was divided into three clusters, that included the premalignant lesions in one branch, which has the least number of alterations (ANCA = 3), other branch included tumors and cell lines with an ANCA of 39 and another branch included tumors and cell lines with an average of 23.1 aberrations. Regarding the clustering of the cytogenetic regions printed on the array, five groups were detected, 1) regions that are amplified in the samples with an ANCA of 3-31, but are deleted in the samples with an ANCA of 98, 2) preferentially deleted in all samples, 3) preferentially amplified in all samples, 4) preferential amplification in the samples with high number of alterations and 5) regions deleted in the samples with an ANCA up to 39, but amplified in the samples with more alterations.

DISCUSSION

In order to define genetic loci with copy number alterations in cervical carcinoma, we analyzed this type of tumor using metaphase and microarray comparative genomic hybridization. Previous studies using chromosome CGH have delimited a specific pattern of chromosomal imbalances in this neoplasia, a situation that is reflected in the CGH results in the database described in this paper. However, there is little knowledge regarding the identity of particular genes that might be the targets for these copy number changes, making microarray CGH an attractive method in order to define these particular gene targets.

From the CGH analysis it is clear that the pattern of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma is characterized by specific DNA copy numbers, namely gain of 1, 3q and 5p, as well as losses at 2q, 3p and 4. There was a good coincidence between the alterations detected by CGH and array CGH. Although the array that we used did not cover the entire genome, we were able to detect alterations at particular genes and genetic markers that might be related to the carcinogenic process in the cervical epithelium.

The limited number of pre-malignant lesions analyzed does not allowed us to detect any particular region that might be related with this particular stage during cervical cancer progression. However, an interesting candidate gene amplified in one pre-malignant sample and in 5 invasive tumors was *MSH2-KCNK12* (2p22.3-2p22.1). This gene is the human homolog of the *E. coli* mismatch repair gene mutS, and has been found mutated in hereditary nonpolyposis colon cancer. A more intense *MSH2* expression has been described in cervical intraepithelial neoplasias and invasive cervical carcinomas than in non-neoplastic cervical lesions, and altered expression of this gene has been proposed as an important event during cervical carcinogenesis (26, 27). Interestingly, the invasive samples showing *MSH2* amplification presented with a high number of alterations (<40), suggesting a direct connection between increased copy number of this gene and chromosomal instability in invasive cervical carcinomas.

One of the most important genetic events during cervical carcinoma progression is the gain of 3q. This alteration has been detected in early stages of cervical transformation and in cooperation with other

imbalances, seems to play an important role in tumor development. Microarray analysis identified among the most prevalent alterations in cervical tumors and cell lines the amplification of the *RBP1-RBP2* (Retinol binding protein 1 and 2) and *Tp63* (58.8% of the samples) genes, located at 3q21-q22 and 3q27-q29, respectively. *RBP1* is the protein involved in the transport of retinol from its liver storage sites to the peripheral tissues. Vitamin A plays an important role in a variety of cellular events related to proliferation and epithelial tissue differentiation. *RBP1* down-regulation and promoter hypermethylation have been detected in breast, ovarian, colorectal and other tumor types, but no promoter methylation was detected in HeLa (28). Radioimmunoassay and immunohistochemistry have detected a significantly higher amount of the RBP protein in squamous cervical tumors, compared to their normal counterpart (29). *Tp63* is a homolog of the p53 tumor suppressor gene. Its protein is target for inactivation by the E6 HPV oncoprotein and plays a primordial role in the development of squamo-stratified epithelia. *Tp63* is highly expressed in the basal stratum of these epithelia with diminished expression in the differentiated strata, suggesting that the presence of this protein preserves the self-renewal capacity of the epithelial stem cells after an asymmetric division, in which one of the daughter cell must conserve its epithelial stem-cell properties and the other daughter cell is committed to the differentiation process (30). Expression of this protein in human cervical tissues has been detected in the basal and parabasal layers of the ectocervical squamous epithelium, and it is not present in the differentiated layers. In pre-malignant lesions and invasive squamous tumors, a strong *p63* expression has been described (31, 32). Expression of this protein has also been associated with poor survival and locoregional failure after radiation and chemotherapy (33). Expression of the epidermal growth factor receptor (*EGFR*, 7p12.3-p12.1), which was found amplified in 52.9% of the invasive tumors that we analyzed, was found to be a prognostic predictor of extrapelvic failure after treatment, and both molecules were found to be potent molecular risk factors in patients with FIGO stage IIB SCC of the uterine cervix, who had received radiotherapy and concurrent chemotherapy (33).

DAB2 on 5p13 was amplified in 58.8% of the invasive cases. The *DAB2* gene has been identified as a potent tumor suppressor gene in prostate and ovarian carcinoma (34), and loss of expression of this

gene has been associated with the transition of ovarian epithelial cells to premalignant states (35). *DAB2* has been implicated in cell positioning control and seems to mediate the requirement for basement membrane attachment of epithelial cells (36). To our knowledge, there are no available reports analyzing the expression of this gene in the uterine cervix or in cervical carcinoma. Recent reports have demonstrated a role of *DAB2* in the regulation of the Wnt signaling pathway (37), and the copy number changes of this gene observed by microarray CGH, might be related with the up-regulation of several genes involved in the Wnt pathway that our group has recently observed using cDNA arrays (Vázquez G, unpublished observations).

Regarding DNA losses, the *FHIT* (fragile histidine triad, 3p14.2) gene suffered losses in 47% of the cases. Aberrant expression of this gene has been well documented in cervical carcinoma and has been related to lymph node metastasis, parametrial invasion, and vaginal involvement in invasive tumors (38). An association between *FHIT* gene abnormalities and infection with particular HPV types has been suggested, since 87% of the cases with absent *FHIT* expression were positive for HPV16 infection (39). Furthermore, abnormal expression of this gene has been found in significantly younger patients than those with normal expression, suggesting that abnormalities in the regulation of this gene might be accelerating carcinogenesis in cooperation with HPV (40). These observations might be related to the preferential integration of HPV into fragile sites, particularly FRA3B, where *FHIT* is located (41).

The clone containing the marker D1S427 and the gene *FAF1* (1p32.3), was deleted in 29.4% of the samples. The *FAF1* gene codes for a protein that binds to FAS and can initiate or enhance FAS mediated apoptosis. To our knowledge, there are no studies on the role of *FAF1* in cervical carcinogenesis, but its loss might be related to the observed resistance to apoptosis in HPV16 positive cells, that has been attributed to an inability of these cells to form a functional death-inducing signal complex (DISC) (42).

The *KIT* gene (4q11-q12), which was found deleted in 29.4% of the invasive samples, including the cell line CALO, was not altered in the cell line INBL, however, both of these cell lines have been

shown to express functional KIT receptors that might be playing a role in the cell density-dependent growth of these cells (19).

Hierarchical clustering and K means clustering allowed us to identify groups of loci that showed a similar pattern of gain or loss among the samples and particularly, pointed out the presence of genes whose gain or loss is related with the total number of imbalances present in a particular sample. This was confirmed through the use of the CIT software, which detected clones that behaved significantly different ($P < 0.5$) in the samples with a high number of alterations (ANCA = 98), compared to the rest of the samples. From this analysis it is not possible to state that these genes have an active role in the accumulation of chromosomal imbalances or if their alteration is simply a result of a higher instability. However, some of the defining genes of this group have been related with cervical cancer progression. Examples are *JAG1* (20p12.1), whose protein together with other members of the Notch signaling pathway has been found up-regulated in cervical tumors (43), or *PTEN* (10q23.3), of which biallelic disruptions have been related to cervical carcinogenesis progression and treatment outcome (44, 45). This group also includes genes that have been implicated in other types of cancer; e.g. *MAP2K5* (mitogen-activated protein kinase kinase 5, 15q23), whose over-expression was related to cell proliferation and invasion in metastatic prostate tumors (46), or *RFC2* (7q11.23), the ATP binding subunit of the replication factor C, which plays an important role during repair of DNA breaks (46).

Alterations in the telomeric region of chromosome 2q, a region where LOH analysis has potentially mapped tumor suppressor genes that are important for cervical carcinoma progression (15), were detected in 41.7% of the twelve new cases and in 52.5% of the 40 cases in the database. However, in the array analysis, the clones mapping to this region were only deleted in a small percentage of the samples. This might be explained by the previously mentioned incomplete genomic coverage, with the presumptive target genes of DNA loss in this region not included on the array. Detection of the *TERC* gene amplification has been recently proposed as a potential marker for the evaluation of cervical carcinoma progression (47); however, we detected amplification of the clone representing this gene in less than 10% of the samples analyzed by CGH arrays. FISH analysis in the Heselmayer *et al.* paper, detected a higher prevalence of nuclei with a diploid pattern than those with a tetraploid pattern, even

in the high grade lesions. Furthermore, the percentage of nuclei with more than 2 copies of 3q, including the tetraploid cells ranged between 3.3 to 50% of the CIN3 (cervical intraepithelial neoplasia grade 3). Dellas *et. al.* (9) used *in situ* hybridization to analyze the prevalence of 3q amplifications in cervical cancer tissue arrays, detecting low level amplifications in most of the tumors studied. These results suggest that these low copy number gains might not be adequately detected by chromosome or even array CGH, due to the contamination with normal cells and/or the presence of a high number of diploid or tetraploid cells in the sample.

In conclusion, the combination of several platforms such as metaphase and microarray CGH and different bioinformatics data mining methods, allowed the detection of particular genes located in regions with common DNA copy number changes in cervical carcinoma. It also shows how this kind of combination might be applied to the study of copy number changes during carcinogenesis. Further studies using CGH arrays with a higher resolution will certainly be useful for the detection of gene specific targets of copy number changes that are relevant for the genesis and progression of cervical carcinoma.

Acknowledgements

This work was partially funded through the 7114 and 34686 grants from the Mexican Council of Science and technology (CONACyT) and the Mexican Institute for Social Security (IMSS-FOFOI FP-2001-2003). HA, VOG, PC, LR were recipients of scholarships from the CONACyT, IMSS and DGEP-UNAM. The authors do not have any conflict of interests to declare.

REFERENCES

1. Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch X, Kummer A, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Muñoz N. Human Papilloma Virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19.
- 2.- Bosch X, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002; 89:183-190.
- 3.- Münger K, Howley P. Human papillomavirus immortalization and transforming functions. *Virus Res* 2002; 89:213-228.
- 4.- Ried T, Hesselmeier K, Blegen H, Schröck E, Auer G. Genomic changes defining the genesis, progression and malignancy in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25:195-204.
- 5.- Pihan G, Wallace J, Zhou Y, Doxsey S. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 2003; 63:1398-1404.
- 6.- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 1999; 9:M57-M60.
- 7.- Hesselmeier K, Schröck E, Du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:479-484.
- 8.- Hesselmeier K, Macville M, Schröck E, Blegen H, Hellström A, Shah K, Auer G, Ried T. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chrom Cancer* 1997; 19:233-240.
- 9.- Deltas A, Torhorst J, Jiang F, Proffit J, Schultheiss E, Holzgreve W, Sauter G, Mihatsch M, Moch H. Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma stage IB detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1999; 59: 3475-3479
- 10.- Kirchoff M, Rose H, Petersen B, Maahr J, Gerdes T, Lundsteen C, Bryndorf T, Kryger-Baggesen N, Christensen L, Engelholm S, Philip J. Comparative genomic hybridization reveals a recurrent

pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma in situ of the cervix and in advanced-stage cervical carcinoma. *Genes Chrom Cancer* 1999; 24:144-150.

11.- Allen D, White D, Hutchins A, Scurry J, Tabrizi S, Garland S, Armes J. Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer* 2000; 83:1659-1663.

12.- Kirchhoff M, Rose H, Petersen B, Maahr J, Gerdes T, Philip J, Lundsteen C. Comparative genomic hybridization reveals non-random chromosomal aberrations in early preinvasive cervical lesions. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 129:47-51.

13.- Umayahara K, Numa F, Suehiro Y, Sakata A, Nawata S, Ogata H, Suminami Y, Sakamoto M, Sasaki K, Kato H. Comparative Genomic Hybridization detects genetic alterations during early stages of cervical cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33:98-102.

14.- Harris CP, Lu XY, Narayan G, Singh B, Murty VV, Rao PH. Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36:233-241.

15.- Narayan G, Pulido HA, Koul S, Lu XY, Harris CP, Yeh YA, Vargas H, Posso H, Terry MB, Gissmann L, Schneider A, Mansukhani M, et. al. Genetic analysis identifies putative tumor suppressor sites at 2q35-q36.1 and 2q36.3-q37.1 involved in cervical cancer progression. *Oncogene* 2003; 22:3489-3499.

16.- Rao PH, Arias-Pulido H, Lu XY, Harris CP, Vargas H, Zhang FF, Narayan G, Schneider A, Terry MB, Murty VV. Chromosomal amplifications, 3q gain and deletions of 2q33-q37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma. *BMC Cancer* 2004; 4:5.

17.- Solinas-Toldo S, Dürst M, Lichter P. Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus transfected cells during progression toward immortality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3854-3859.

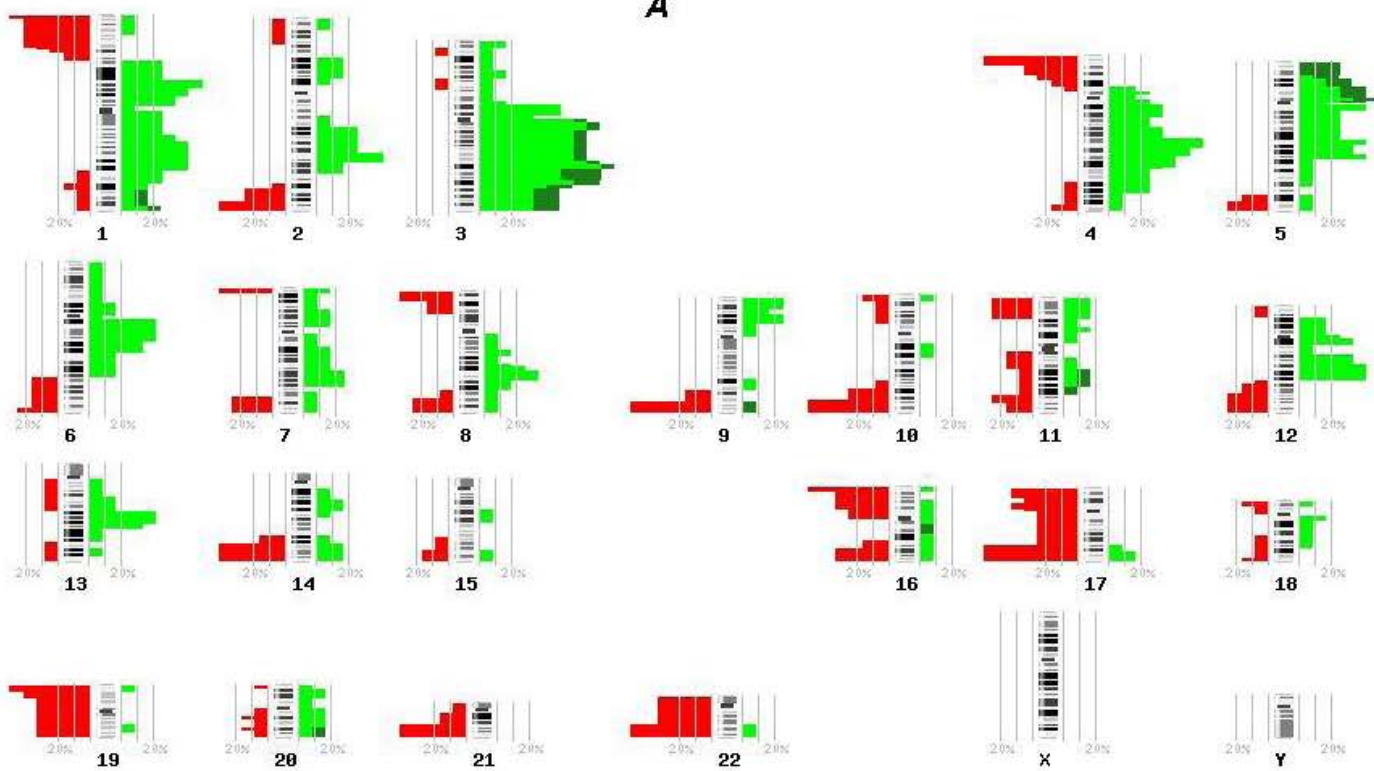
18.- Hidalgo A, Schewe C, Petersen S, Salcedo M, Gariglio P, Schlüns K, Dietel M, Petersen I. Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines. *Eur J Cancer* 2000; 36:542-548.

- 19.- Hidalgo A, Monroy A, Arana R, Taja L, Vázquez G, Salcedo M. Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma derived cell lines. *BMC Cancer* 2003; 3-8.
- 20.- Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; 37:348-357.
- 21.- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20:399-407.
- 22.- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, et. al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20:207-211.
- 23.- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 1999; 23:41-46.
- 24.- Caceres-Cortes J, Alvarado-Moreno J, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A, Rocha-Zabaleta L, Urdiales-Ramos J, Weiss-Steider B, Haman A, Hugo P, Brousseau R, Hoang T. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res* 2001; 61:6281-6289.
- 25.- Baudis M, Cleary ML. Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics* 2001; 17:1228-1229.
- 26.- Giarnieri E, Mancini R, Pisani T, Alderisio M, Vecchione A. Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2000; 6:3600-3606.
- 27.- Kwasniewska A, Gozdicka-Jozefiak A, Postawski K, Miturski R. Evaluation of DNA mismatch repair system in cervical dysplasias and invasive carcinomas related to HPV infection. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002; 23:231-235.

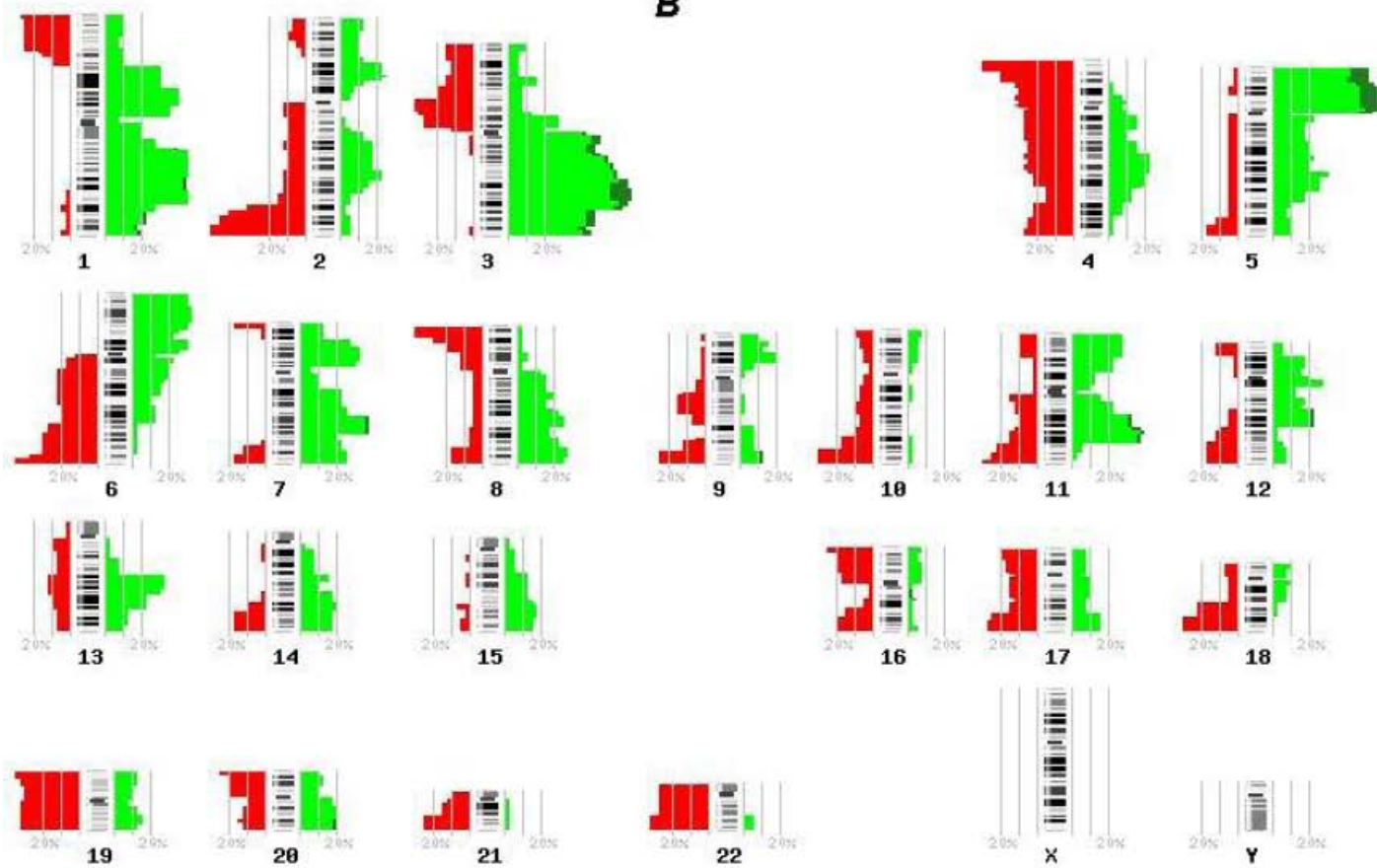
- 28.- Esteller M, Guo M, Moreno V, Peinado M, Capella G, Galm O, Baylin S, Herman J. Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer Res* 2002; 62:5902-5905.
- 29.- Wahlberg P, Fex G, Biorklund A, Trope C, Willen R. Quantitation and localization of cellular retinol-binding protein in squamous-cell carcinomas of the cervix uteri and of the oral cavity. *Int J Cancer* 1988; 41:771-776.
- 30.- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999; 398:714-718.
- 31.- Quade BJ, Yang A, Wang Y, Sun D, Park J, Sheets EE, Cviko A, Federschneider JM, Peters R, McKeon FD, Crum CP. Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2001; 80:24-29.
- 32.- Wang T, Chen B, Yang Y, Chen H, Wang Y, Cviko A, Quade B, Sun D, Yang A, Mckeon F, Crum C. Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: A study of 250 cases. *Human Pathol* 2001; 32:479-486.
- 33.- Cho NH, Kim YB, Park TK, Kim GE, Park K, Song KJ. P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 2003; 91:346-353.
- 34.- Chen H, Toyooka S, Gazdar AF, Hsieh JT. Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB2IP) in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem*, 278:3121-3130, 2003.
- 35.- Yang DH, Smith ER, Cohen C, Wu H, Patriotis C, Godwin AK, Hamilton TC, Xu XX. Molecular events associated with dysplastic morphologic transformation and initiation of ovarian tumorigenicity. *Cancer* 2002; 94:2380-2392.
- 36.- Sheng Z, Sun W, Smith E, Cohen C, Sheng Z, Xu XX. Restoration of positioning control following Disabled-2 expression in ovarian and breast tumor cells. *Oncogene* 2000; 19:4847-4854.
- 37.- Hocevar BA, Mou F, Rennolds JL, Morris SM, Cooper JA, Howe PH. Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). *EMBO J* 2003; 22:3084-3094.

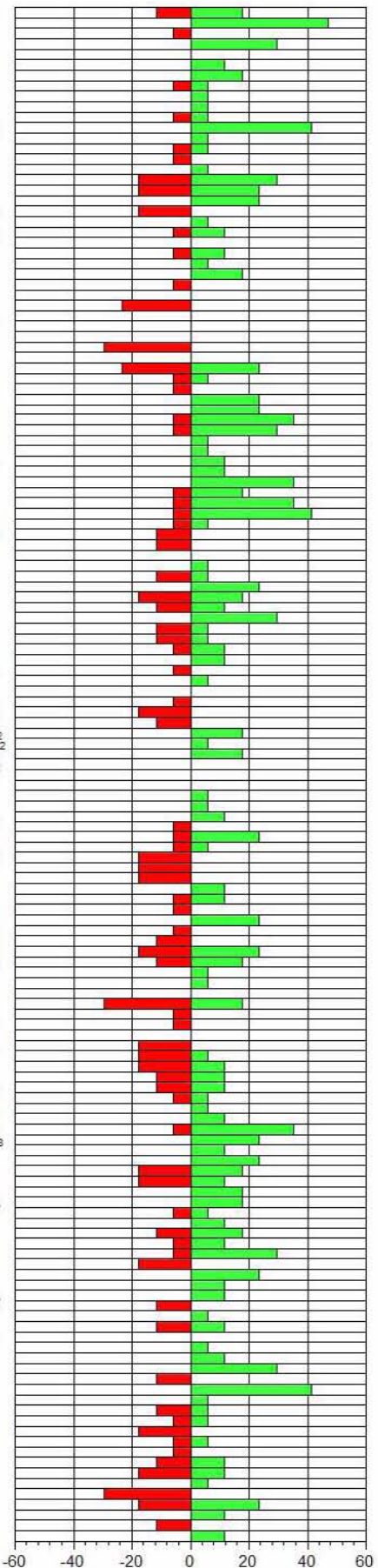
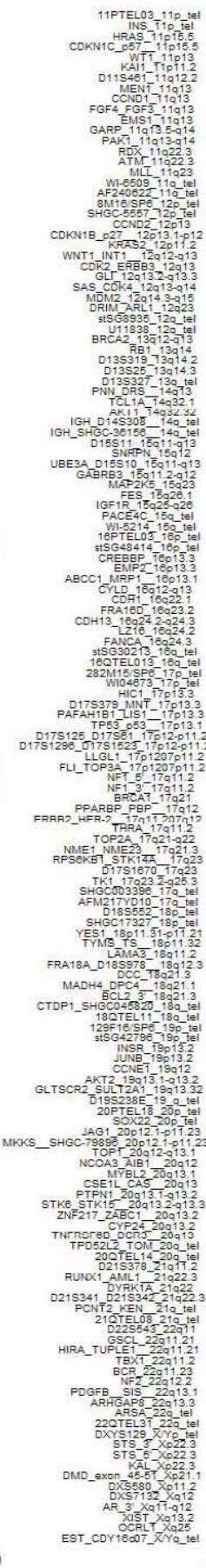
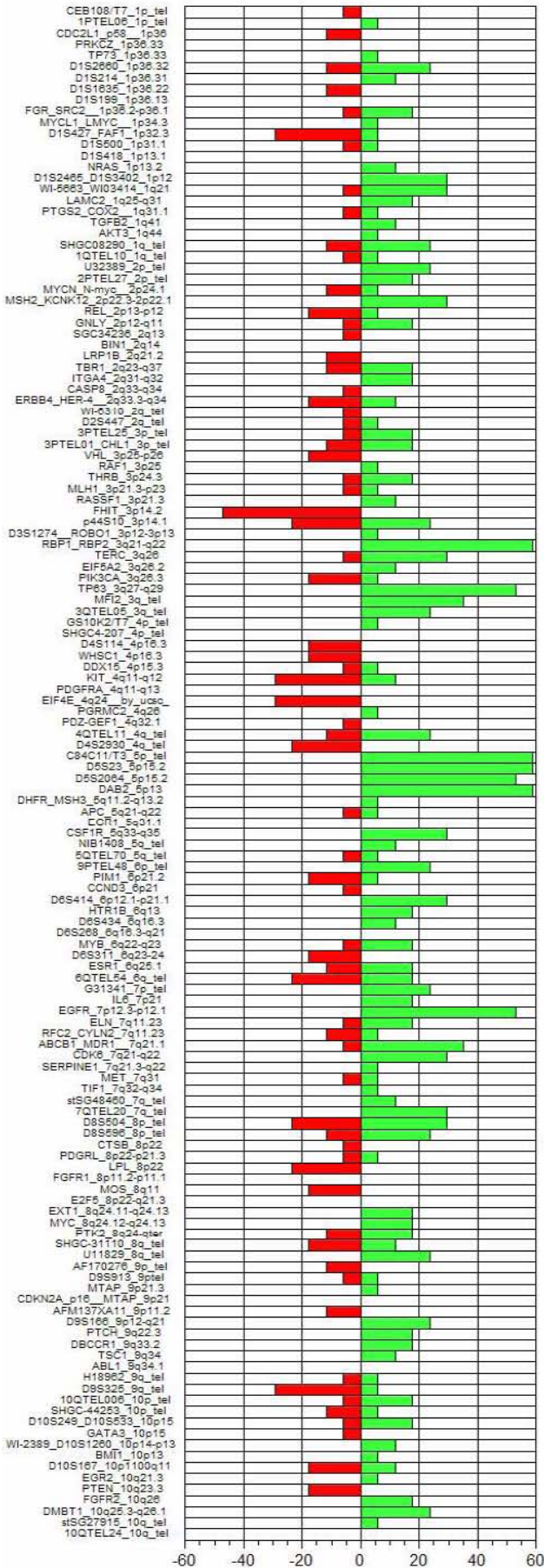
- 38.- Huang LW, Chao SL, Chen TJ. Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecol Oncol* 2003; 90:331-337.
- 39.- Butler D, Collins C, Mabruk M, Leader MB, Kay EW. Loss of Fhit expression as a potential marker of malignant progression in preinvasive squamous cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 86:144-149.
- 40.- Takizawa S, Nakagawa S, Nakagawa K, Yasugi T, Fujii T, Kugu K, Yano T, Yoshikawa H, Taketani Y. Abnormal Fhit expression is an independent poor prognostic factor for cervical cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:1213-1216.
- 41.- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 2003; 22:1225-1237.
- 42.- Aguilar-Lemarroy A, Kirchhoff S, Whitaker N, Gariglio P, zur Hausen H, Krammer PH, Rosl F. Differential sensitivity of human papillomavirus type 16(+) and type 18(+) cervical carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis. *Int J Cancer* 2001; 93:823-831.
- 43.- Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A, Leiman J, Ward D, Ish-Horowitz D, Artavanis-Tsakonas S. Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* 1999; 154:785-794.
- 44.- Kurose K, Zhou XP, Araki T, Eng C. Biallelic inactivating mutations and an occult germline mutation of PTEN in primary cervical carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29:166-172.
- 45.- Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol* 2001; 18:493-497.
- 46.- Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, Thilak L, Robson CN, Neal DE, Leung HY. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 2003; 22:1381-1389.
- 47.- Heselmeyer K, Janz V, Castle PE, Chaudhri N, White N, Wilber K, Morrison LE, Auer G, Burroughs FH, Sherman ME, Ried T. Detection of genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in cytologic specimens as a genetic test for the diagnosis of cervical dysplasia. *Am J Pathol* 2003; 163:1405-1416.

A



B





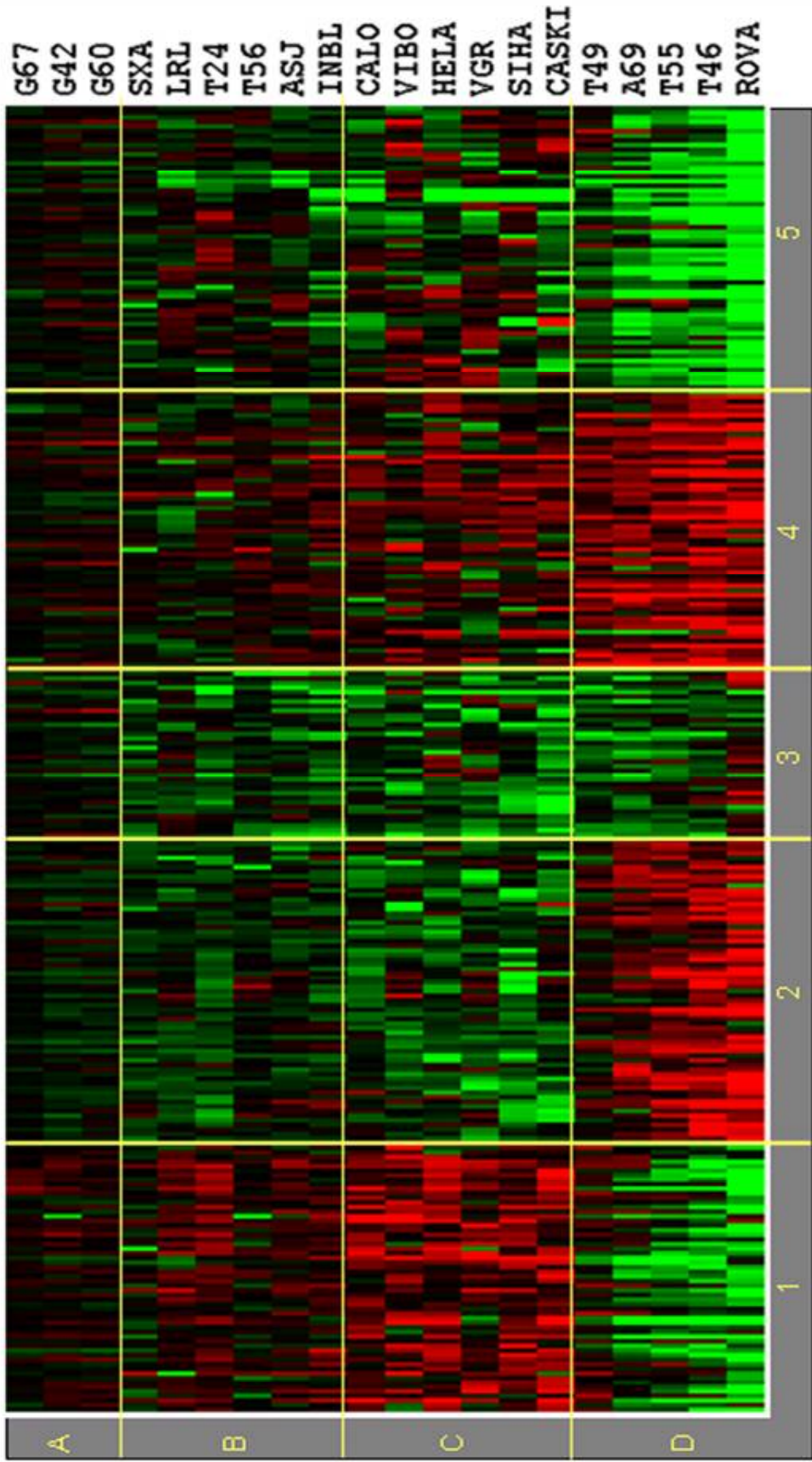


Figure legends

Figure 1. CGH histograms showing the chromosomal imbalances detected in 12 cervical carcinoma derived samples (A) and the alterations detected in the database containing 40 cervical carcinoma derived samples (B). The incidence line at the left of the ideogram represents DNA losses, the line at the right DNA gains.

Figure 2. Histogram showing the incidence of alterations in each of the targets printed on the CGH array. The incidence value is shown at the bottom of the figure; negative values indicate DNA losses, positive values DNA gains.

Figure 3. K-means clustering showing the existence of four groups of samples, based on their average number of chromosomal alterations (ANCA) (groups A-D), and the presence of five groups according to the behavior of the clones printed on the array in the different samples.



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Estrategias de análisis global. Hacia el manejo genético de las neoplasias

Alfredo Hidalgo,* Mauricio Salcedo*

* Laboratorio de Genética Molecular del Cáncer. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Global analysis strategies.

In direction to genetic management of neoplastic diseases

ABSTRACT

Biomedical research in oncological diseases, particularly focused on the study and understanding of the molecular mechanisms involved in cellular transformation, is opening new possibilities for the development of new and more efficient strategies for diagnosis and treatment. The generation and practical application of the results derived from molecular genetic studies in cancer, has evolved in parallel with the development of technological tools that allow us to get a global vision of diverse cellular processes, both in the normal and pathological states. This combination of basic research and technological application, has created methodologies that allow us to analyze the three principal levels of Molecular Genetics, the Genome (DNA, archive of the genetic information), the Transcriptome (RNA, expression of the genetic information), and finally, the Proteome (proteins, functional aspect of the genetic information). The vast amount of information obtained due to these advancements has begun to modify our fundamental vision about oncological diseases, and together with the traditional analytic tools, they hold the promise of changing the ways we classify, detect, diagnose and treat cancer. In this review, we present some of this methods for global genetic analysis, involving the three levels of genetic organization: the genome, with the Human Genome Project, comparative genomic hybridization and chromosome painting; the Transcriptome, with Serial analysis of Gene Expression and DNA microarrays; and the proteome, with bidimensional protein electrophoresis and antibody-microarrays. In each case, together with a brief description of the method, we also present the impact of every one of them on the study and management of neoplastic diseases.

Key words: Neoplasia. Genomic. Genome. Transcriptome. Proteome. CGH. SKY. Microarrays. SAGE.

RESUMEN

La investigación biomédica en las enfermedades oncológicas, particularmente enfocada al estudio y entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la transformación celular, está permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento más eficaces. La obtención y aplicación práctica de los resultados derivados del estudio de la genética molecular del cáncer, ha avanzado paralelamente con el desarrollo de herramientas tecnológicas que permiten obtener una visión global de diversos procesos celulares, tanto en condiciones normales como en los procesos patológicos. Esta combinación de investigación y aplicación tecnológica, ha creado metodologías que en estos momentos nos permiten analizar en su conjunto los tres principales niveles de la Genética Molecular: el genoma (DNA, archivo de la información genética), el transcriptoma (RNA, expresión de la información genética) y finalmente el proteoma (proteínas, aspecto funcional de la información genética). La información obtenida gracias a estos avances ha empezado a modificar nuestra visión fundamental sobre las enfermedades oncológicas; y sumándose a las herramientas de análisis tradicional, prometen modificar de manera importante la forma en que clasificamos, detectamos, diagnosticamos y tratamos a las diversas neoplasias. En esta revisión se presentan algunas de estas metodologías de análisis global, que involucran los tres niveles de organización genética: el genoma, con el proyecto genoma humano, la hibridación genómica comparativa y el pintado cromosómico, el transcriptoma, con el análisis en serie de expresión génica y microarreglos de DNA y el proteoma, con el análisis bidimensional de proteínas y los microarreglos de anticuerpos. En cada caso, además de una breve descripción de cada uno de los métodos, se expone el impacto de ellos en el estudio y manejo de las enfermedades neoplásicas.

Palabras clave: Neoplasia. Genómica. Genoma. Transcriptoma. Proteoma. CGH. SKY. Microarreglos. SAGE.

El estudio de la biología básica de las enfermedades oncológicas, constituye un punto fundamental para entender los mecanismos de aparición y desarrollo de los tumores. El desarrollo del cáncer representa una compleja serie de interacciones entre factores ambientales, la respuesta inmunológica y las características genéticas de cada individuo. Debido a su etiología multifactorial, la carcinogénesis representa un gran reto para la investigación biomédica. Hace menos de una década se inició el desarrollo de metodologías que permiten obtener una visión más amplia de los fenómenos implicados en la génesis y progresión de un tumor. Durante mucho tiempo el análisis genético de las neoplasias se vio enfocado al estudio de un grupo relativamente pequeño de genes: los protooncogenes, oncogenes y genes supresores de tumor. Indudablemente estos estudios arrojaron invaluable información acerca de la biología de la célula, sin embargo el estudio de genes aislados, la búsqueda de mutaciones puntuales o aun la pérdida o ganancia total de genes o cromosomas completos, representa solamente una fracción del panorama general de las alteraciones genéticas que se dan en una célula neoplásica. Por otro lado, gran parte de estos estudios se enfocaron únicamente a las alteraciones presentes a nivel del DNA de la célula, olvidando que la genética no involucra exclusivamente el medio en el cual está contenida la información hereditaria, sino también la forma en cómo esta información genética se expresa.¹ Esta visión de la genética del cáncer, no se debió a una falta de interés por las moléculas con las cuales la célula expresa su información, el RNA mensajero y las proteínas sino más bien, a la falta de herramientas que permitieran una valoración cuantitativa de cambios sutiles en la expresión. Aunque las técnicas como el Northern,² Western blot³ e inmunocitoquímica⁴ se utilizan desde hace más de dos décadas, su aplicación en diversos tumores se vio detenida por la dificultad que representa trabajar con RNA y proteínas de buena calidad y en cantidad suficiente. La limitada sensibilidad de estas metodologías, sumada a la inestabilidad química de algunas moléculas, no permite que se detecten dichas macromoléculas cuando se encuentran en bajo número de copias en la célula. El desarrollo de metodologías de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁵ para el estudio de secuencias específicas de DNA; la PCR acoplada a retrotranscripción para estudios de expresión génica,⁶ la hibridación *in situ*,⁷ el desarrollo de anticuerpos más específicos y nuevos métodos de amplificación de señal,⁸ disminuyen de manera importante los requerimientos de material biológico

a procesar, otorgándonos ahora una mayor sensibilidad y especificidad. Sin embargo, aun en los experimentos más sofisticados, el número de genes transcritos o proteínas que pueden analizarse simultáneamente es limitado. Los datos generados por los proyectos de secuenciación del genoma humano, dados a conocer recientemente, indican que a diferencia de cálculos previos, el número estimado de genes codificadores de proteínas en el genoma es de aproximadamente 31,000 en el caso del proyecto público y de 38,000 en el caso del proyecto privado,^{9,10} presentándose estas diferencias debido al tipo de análisis llevado a cabo por cada uno de los grupos. Estos genes podrán producir al menos entre 66,000¹¹ a 90,000¹² transcritos, ya que debido a la presencia de mecanismos tales como el corte y empalme (*splicing*) alternativo o al uso de diferentes sitios de poliadenilación un solo gen puede dar lugar a diversos transcritos.¹¹ Además de los RNAs producidos por los genes codificantes de proteínas, existen también RNAs no codificantes, que cumplirán funciones regulatorias en diversos procesos, por ejemplo, los RNAs de transferencia o los del aparato de corte y empalme. En su conjunto, el número total de moléculas de RNA presentes en una célula es de aproximadamente 300,000, lo que constituye el transcriptoma.¹³ Los RNAs codificantes se traducirán a proteínas en el citoplasma, produciendo al menos 90,000 proteínas básicas diferentes, las cuales, debido a mecanismos de modificación como la glicosilación o fosforilación pueden aumentar su número hasta 10⁶ tipos diferentes, lo que constituye el proteoma de la célula¹⁴ (Figura 1). De lo anterior resul-

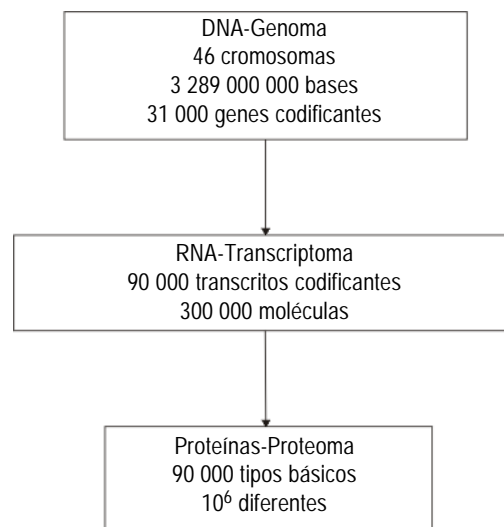


Figura 1.

ta claro el hecho de que la observación aislada de una alteración en el DNA, la detección de un solo transcrito o de una proteína, en realidad nos dice muy poco acerca de la célula y nos da una visión muy limitada de la compleja red de interacciones presentes en ella. En referencia al cáncer, la actual clasificación histopatológica de los tumores considera a más de 500 histotipos diferentes, en muchos casos la falta de un panorama global de su estructura genética, nos ha llevado a incluir en un mismo grupo a tumores que comparten características morfológicas similares, pero que presentan cursos clínicos o respuestas al tratamiento completamente diferentes y que deben sus diferencias a su complemento genético particular. Por lo anterior, el desarrollo de metodologías de análisis global en el cáncer se convierte en una prioridad. A continuación se abordan algunos conceptos sobre las metodologías que tienen como finalidad el estudio genético global de cada uno de los tres niveles de información en la célula normal y en la transformada.

EL LIBRO DE LOS GENES: PROYECTO GENOMA HUMANO

El Proyecto Genoma Humano constituye sin duda el esfuerzo de análisis genético más ambicioso realizado hasta la fecha. Este proyecto fue iniciado formalmente en 1990, bajo la dirección de los Institutos Nacionales de Salud y el Departamento de Energía de los Estados Unidos, con la colaboración de diver-

sos centros de secuenciación en países como Inglaterra, Francia, Japón, Alemania y China. Posteriormente, en 1998, una compañía privada (Celera Genomics), anuncia su intención de secuenciar el genoma humano en un período de tres años, esto inició lo que para muchos fue una carrera entre el proyecto financiado con fondos públicos y el proyecto privado por obtener la secuencia de las aproximadamente 3 000 000 000 de bases del genoma. A principios del año 2000 se dieron a conocer los primeros "borradores" de la secuencia del genoma humano por ambos grupos, publicándose el análisis de cada grupo por separado en febrero del 2001.^{9,10} Este logro no hubiera sido posible sin la utilización de nuevos métodos de secuenciación y el uso de secuenciadores automatizados basados en electroforesis capilar, que permitieron una producción de secuencia de 60 000 bases por minuto en el caso del proyecto público y de 27 271 853 lecturas de secuencia durante nueve meses continuos para el caso del proyecto privado. Cada grupo utilizó metodologías diferentes para llegar al mismo punto. Por un lado, el proyecto público basó su estrategia en la obtención de fragmentos pequeños de DNA, su clonación en cromosomas bacterianos artificiales (BACs), su localización precisa utilizando marcadores genéticos en los cromosomas y finalmente la obtención de su secuencia. La iniciativa privada se basó en la fragmentación aleatoria del genoma, la clonación de los fragmentos y su secuenciación al azar (*shot-gun sequencing*)¹⁵ (Figura 2). Es difícil determinar cuál de

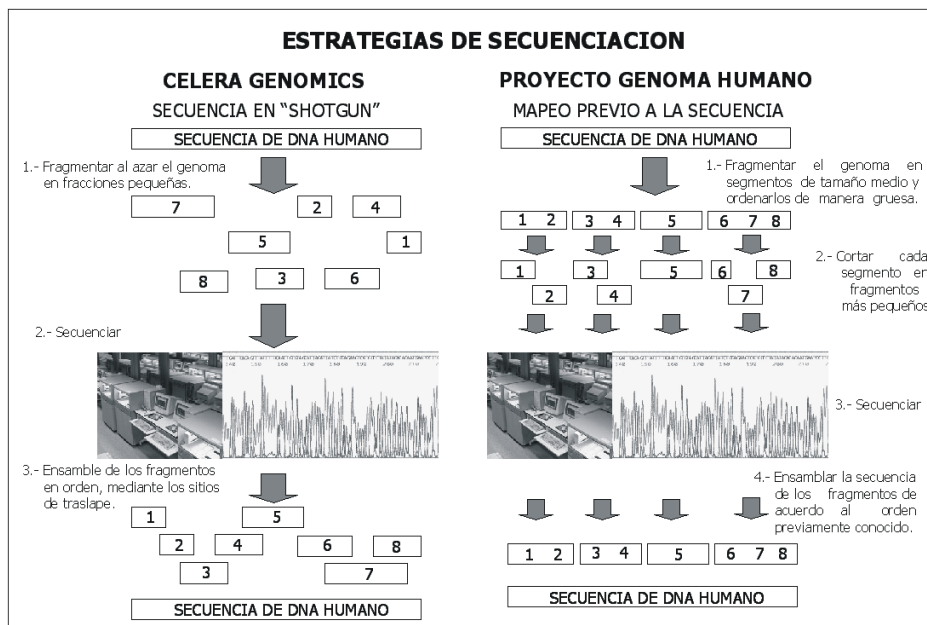


Figura 2. Estrategias de secuenciación del genoma utilizadas por el proyecto público y el privado.

los métodos resulta mejor, el enfoque del mapeo previo asegura que la secuencia final, una vez ordenada y revisada represente fielmente el orden del DNA en el cromosoma. Además, esta aproximación permite separar la tarea en varios proyectos menores, tales como la secuenciación de cada uno de los cromosomas. Poco después de su creación, el proyecto público pasó de ser un esfuerzo limitado a ciertos grupos en Estados Unidos, a convertirse en un consorcio mundial donde cada país involucrado tomaba la responsabilidad de clonar, mapear y secuenciar diferentes cromosomas, como lo demostró la publicación de la secuencia de los cromosomas 21 y 22.^{16,17} Por otro lado, el proyecto privado presentó la ventaja de ser mucho más rápido para la obtención de los resultados, sin embargo, al ser fragmentado al azar el DNA, no se puede dividir en proyectos menores, dejando la responsabilidad total en un solo grupo. Además, debido a que son fragmentos aleatorios, una vez obtenida la secuencia, resulta complicado conocer el orden en que se encuentran éstos, dependiendo así del uso de supercomputadoras para llevar a cabo el ordenado final de los fragmentos.¹⁰ Otra diferencia está en la forma en que se manejará la información derivada de cada uno de los proyectos. En el proyecto público los resultados están accesibles a toda persona en las 24 horas siguientes después de haberse obtenido, depositándolos en bases de datos públicas vía internet. En contraste, el proyecto de Celera busca hacer uso comercial de la secuencia mediante la suscripción a sus bases de datos, que incluyen diversas herramientas de análisis informático. De hecho, el proyecto de Celera aprovechó la disponibilidad de las bases de datos generadas por el proyecto público para confirmar y cotejar sus propios resultados en las fases finales del ensamble de su borrador. Aunque la secuencia final de la totalidad del genoma será obtenida para el año 2003, estos borradores nos brindan una visión muy profunda acerca de la organización genética del ser humano y en general de los genomas de los vertebrados, indicando por vez primera características importantes, tales como el número de genes codificantes de proteínas presentes en el genoma humano, entre 31,000 y 39,000. Aunque estos números no son finales, se espera que no se vean incrementados de manera importante, lo que resulta una sorpresa para muchos investigadores que suponían que la complejidad del ser humano se reflejaría en un número superior de genes. Comparaciones con otros organismos son ahora posibles, por ejemplo el gusano nemátodo *C. elegans* posee 18,000 genes y la planta *A. thaliana* 26,000, lo que indica que esta complejidad no provie-

ne del número total de genes, sino de la forma en que éstos son expresados, existiendo un mayor número de posibilidades de corte y empalme alternativo y una organización más compleja de diversos motivos proteínicos en los genes humanos. Estas mismas comparaciones nos permiten definir cuáles son los grupos de genes específicos para vertebrados, como lo son genes involucrados en la inmunidad adquirida, el desarrollo, estructura y función neural, vías de señalización intercelular e intracelular durante el desarrollo y la homeostasis, y la muerte celular programada. El principal campo del conocimiento que se está beneficiando de esta información es sin duda el de las ciencias biomédicas, en las cuales ha surgido un nuevo campo de estudio derivado del cuerpo de conocimientos, tecnologías y contribuciones del proyecto genoma: la Genómica, es decir, el análisis genético a gran escala.¹⁸ Entre las principales aplicaciones de la Genómica se puede mencionar el descubrimiento de nuevos genes ligados a enfermedades, lo que traerá como consecuencia pruebas de diagnóstico genético más confiables, teniendo como ventaja sobre los métodos de detección tradicionales el hecho de poder identificar sujetos portadores de alteraciones aun cuando no presentan un cuadro clínico. Ejemplos de lo anterior lo constituyen la detección de mutaciones en el oncogén *RET* en neoplasias endocrinas,¹⁹ el gen *HPC2* en cáncer de próstata o los genes *BRCA1* y *2* en mama.²⁰ Al menos 30 genes ligados a enfermedades han sido localizados gracias a la disponibilidad pública del borrador del Genoma.⁹ Otra de las contribuciones de este esfuerzo lo constituye la detección y mapeo de polimorfismos dentro de la población humana, siendo los más importantes los polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism* o SNPs), de los cuales se han mapeado más de 1.42 millones en el esfuerzo público y 3 millones en Celera.^{10,21} Estos polimorfismos indican que la diferencia entre cualesquiera seres humanos de cualquier origen étnico o geográfico, difieren en solamente el 0.1% de su información genética,²¹ encontrándose estas diferencias más marcadas en diversas regiones del genoma, siendo la más variada la región del complejo mayor de histocompatibilidad.^{10,21} Los SNPs al parecer determinan en cierta forma nuestra predisposición particular a las enfermedades y a cómo reaccionaremos individualmente a los tratamientos, ejemplos de esto los tenemos en ciertas variaciones de un solo nucleótido en el gen *APOE*, que predisponen a padecer de enfermedad de Alzheimer, o en la pérdida de una sola base en el receptor *CCR5*, lo que lleva a una resistencia natural a la infección por

VIIH.²² De esta forma, la información derivada del proyecto genoma abre las puertas para el desarrollo de nuevos mecanismos terapéuticos, desde la sustitución de genes alterados mediante terapia génica hasta el desarrollo de medicamentos diseñados tomando en cuenta el complemento genético de cada paciente mediante la farmacogenética, tomando en cuenta el complemento particular de SNPs en cada individuo.²³ Finalmente, estos conocimientos abren nuevas líneas de investigación para el futuro, ya que aún tenemos que determinar cuál es la función de los genes secuenciados, cuál es su papel en los procesos celulares normales y cómo se alteran en las patologías. Cuando se termine la secuencia completa del genoma, apenas conoceremos el texto del código genético, pero todavía no estaremos en posibilidad de saber cuál es la función de ese texto ni cuál es el mensaje general del libro codificado en nuestros cromosomas.²⁴ No hay que olvidar que todos los avances descritos y todas las posibilidades que abre el Proyecto Genoma en los campos de la Investigación Biomédica y en la práctica médica, tienen una alta carga de tipo social, ético y legal que también tiene que ser tomado en cuenta. Desde su inicio, el proyecto destinó recursos y esfuerzo para la creación de un comité que valorara las implicaciones éticas, legales y sociales derivadas de la secuencia del genoma (Comité ELSI), que promovió la discusión pública de estos temas y ayudó a proponer y llevar al Congreso estadounidense propuestas de ley para evitar la discriminación por causas genéticas y asegurar la pri-

vacidad genética de los individuos;²⁵ por otro lado, en 1997, en la 29 sesión general de la UNESCO se propuso y aceptó de forma unánime la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y Derechos Humanos, la cual declara en su primer artículo: “En el genoma humano subyace la unidad fundamental de todos los miembros de la familia humana, así como el reconocimiento de su dignidad y diversidad inherente. En un sentido simbólico, constituye la herencia de la humanidad”.²⁶

EL ARTE DE LA PINTURA EN LA GENÉTICA, EL PINTADO CROMOSÓMICO

Un sueño largamente acariciado por la citogenética lo constituye la identificación de cada par cromosómico en una metafase con colores diferentes. El desarrollo del pintado cromosómico hace realidad este objetivo. Esta herramienta fue desarrollada en 1988 de manera independiente por dos grupos. Ambos usaron bibliotecas genómicas construidas a partir de cromosomas únicos, purificados mediante citometría de flujo o por microdissección para la construcción de sondas cromosoma específicas^{27,28} (Figura 3). Uno de los problemas principales fue el número de fluorocromos disponibles, es decir, no se tenían 24 fluorocromos diferentes, uno para cada par de cromosomas. Esto fue resuelto mediante el desarrollo de diferentes métodos de marcaje: en el primero de ellos el del tipo combinatorio, dos fluorocromos diferentes se usan para identificar dos cromosomas distintos y la mez-

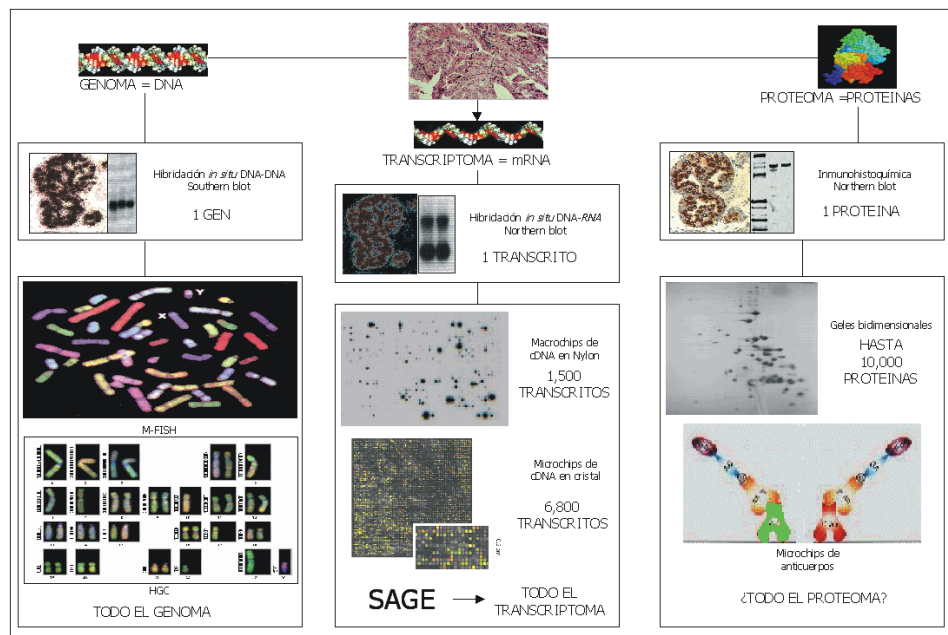


Figura 3. Metodologías de análisis genético global. Su éxito depende de una buena preservación del tejido y de la conservación y purificación adecuada de las macromoléculas.

cla de ambos se usa para identificar un tercer cromosoma;²⁹ el marcaje proporcional se basa en que usando dos fluorocromos, se detectan dos cromosomas específicos, y para identificar a otros, ambos se van mezclando en diferentes proporciones dando como resultado una gama de colores. Este último tipo de marcaje aumenta de manera muy importante el número de blancos identificables, los cuales están limitados únicamente por la capacidad de detección de color del sistema que se utiliza para capturar las imágenes.³⁰ Para lograr finalmente una cariotipificación basada en el color, se han desarrollado dos métodos, uno basado en el uso de filtros ópticos fluorocromo específicos, llamado M FISH,³¹ en donde se capturan imágenes de la misma metafase con filtros específicos para cada color y posteriormente las imágenes obtenidas se empalman en una sola; el otro método está basado en el análisis espectral de color y se denomina cariotipificador espectral o SKY (del inglés *spectral karyotyping*), en el cual se utiliza un sistema que detecta el color real emitido por cada una de las sondas utilizadas.³² Con estas tecnologías, se hace posible la detección de aberraciones estructurales y numéricas de los cromosomas, especialmente aquellas que involucren intercambio de material genético de un cromosoma a otro. Debido a su gran versatilidad, esta herramienta puede aplicarse en diversas disciplinas, como la biología de la radiación,³³ evolución,³⁴ topografía nuclear y control de la expresión genética.³⁵ El pintado cromosómico ha tenido una de sus aplicaciones más importantes en el campo de la citogenética clínica.³⁶ La detección de las alteraciones cromosómicas en muestras clínicas se realiza hasta la fecha usando técnicas de bandeado convencionales, siendo uno de los principales retos determinar el origen de cromosomas marcadores, problema que se soluciona al poder observar el origen de cada marcador con un color particular. Sin embargo, por su costo o por razones metodológicas, no es factible utilizar el pintado en todos los casos, así que la indicación para su uso es tener una idea previa de cuáles pueden ser los cromosomas involucrados y entonces desarrollar el pintado para los cromosomas de interés. El poder del pintado de cromosomas queda demostrado en diversos estudios en los cuales ha sido posible detectar alteraciones cromosómicas estructurales en muestras clínicas que por análisis convencionales se habían pasado por alto o que habían presentado un cariotipo aparentemente normal.^{37,38}

El estudio citogenético del cáncer presenta diversas dificultades. La obtención de cariotipos para el análisis citogenético de los tumores sólidos presenta com-

plicaciones particulares. Debido al bajo índice mitótico de las células tumorales y al gran número y complejidad de las alteraciones cromosómicas observadas, muchas veces resulta imposible el determinar cuál es el origen de los cromosomas marcadores usando técnicas convencionales.³⁹ En estos casos, el problema puede ser resuelto mediante el pintado de cromosomas. Un ejemplo reciente, es el estudio cromosómico molecular de la línea celular HeLa, derivada de un adenocarcinoma del cérvix uterino. Estas células han sido utilizadas como modelo en una gran cantidad de estudios acerca de las bases moleculares del cáncer. Las células HeLa contienen aproximadamente 20 copias integradas del Virus de Papiloma Humano tipo 18 (VPH18) en diversos sitios cromosómicos y su estudio ha permitido conocer el papel de los oncogenes virales E6 y E7 en la carcinogénesis cervical. En dicho trabajo se combinaron metodologías como la hibridación *in situ* fluorescente (HSF) con sondas únicas, la hibridación genómica comparativa y el pintado de cromosomas para obtener un cariotipo más refinado de la línea celular, encontrándose una gran cantidad de rearrreglos cromosómicos, y determinándose el origen de todos los cromosomas marcadores. Usando sondas únicas para el oncogén c-myc, localizado normalmente en 8q24 y para el VPH18, fue posible determinar que el oncogén está amplificado y que existen amplicones tanto en su sitio de localización normal como en otros cromosomas, incluyendo algunos de los marcadores. Lo más interesante resultó ser que las señales de los amplicones de c-myc siempre se localizaron con la señal que indica sitios de integración de VPH18. Estos resultados indican que VPH18 se integra cerca del locus de c-myc, provocando su amplificación y posterior dispersión del amplicón a otros cromosomas.⁴⁰ En el caso de neoplasias hematológicas, en un estudio de 15 casos clínicos, el pintado de cromosomas demostró que la interpretación del cariotipo pudo ser mejorada, completada o refinada en todos los casos.⁴¹ Aunque el pintado de cromosomas representa un gran avance para el estudio citogenético de los tumores sólidos, tiene el inconveniente de que es necesario obtener metafases tumorales a partir de cultivos primarios, lo cual implica diversas dificultades. Sin embargo, otra técnica solucionaría este problema.

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA: DETECCIÓN DE DESBALANCES CROMOSÓMICOS

La Hibridación Genómica Comparativa (HGC) se desarrolló en 1992 y es una técnica que nos permite

localizar aquellas regiones cromosómicas que sufren deleciones (pérdidas) o amplificaciones (ganancias) en los tumores, sin necesidad de establecer cultivos celulares y utilizando como fuente de análisis únicamente DNA purificado del tejido tumoral.⁴² Este método tiene su fundamento en el marcaje diferencial del DNA tumoral y un DNA normal utilizando fluoresceína (verde) y rodamina (rojo), respectivamente. Posteriormente ambos DNAs son mezclados en cantidades iguales e hibridados sobre metafases de un sujeto cariotípicamente normal. Ambos genomas diferencialmente marcados, competirán por hibridar con sus respectivas secuencias homólogas sobre los cromosomas normales. En el caso del genoma normal, sólo existen dos copias de cada cromosoma, mientras que en el genoma tumoral diversos cromosomas o regiones de DNA habrán modificado su número, pudiendo aumentar o disminuir su número de copias. En el caso de las regiones amplificadas habrá una mayor cantidad de DNA tumoral marcado con verde que DNA normal marcado con rojo, por lo que esa región cromosómica en particular se observará verde en la metafase normal, sucediendo lo contrario en el caso de las deleciones, las cuales se observarán rojas en la metafase. De esta forma, en un solo experimento de hibridación, es posible obtener un mapa genómico completo que nos indica mediante la variación en las intensidades de color, las regiones cromosómicas que sufren pérdidas o ganancias de DNA (Figura 3). Desde su creación esta metodología ha sido aplicada al estudio de un gran número de neoplasias, arrojando resultados interesantes en cuanto al proceso de carcinogénesis. Una revisión reciente de los resultados de HGC sugieren la posibilidad de poder clasificar a los tumores sobre la base de sus patrones de alteraciones cromosómicas, ya que cada tumor estudiado posee un patrón único en este sentido.^{43,44} Por otro lado, se ha observado que aunque cada tipo tumoral posee patrones específicos, todos ellos comparten un grupo de alteraciones comunes, lo que habla de que para que aparezca el cáncer, independientemente de su sitio de origen, es necesario que se altere un grupo definido de regiones cromosómicas.^{43,44} En este contexto, nuestro laboratorio, en colaboración con el grupo de HGC del Hospital Universitario Charité, en Berlín, ha aplicado con éxito la metodología al estudio del carcinoma cervicouterino, analizando tumores invasores del cérvix y detectando un patrón de alteraciones cromosómicas que se correlaciona con la presencia del VPH18, coincidiendo las regiones más comúnmente alteradas con sitios de integración de este tipo viral.⁴⁵ Otro modelo en el que hemos traba-

jado, es el análisis de metástasis cerebrales de diversos tipos de tumores sólidos, donde encontramos que independientemente del lugar de origen del tumor primario, todas las metástasis cerebrales comparten un grupo de alteraciones cromosómicas comunes, señalando aquellas regiones genéticas en donde deben estar ubicados genes cuyos productos permitan a la célula tumoral establecerse en el sistema nervioso central. Asimismo, en este estudio se incluyeron metástasis cerebrales de origen desconocido, con la finalidad de evaluar la capacidad de la técnica, en conjunto con el análisis histopatológico y el uso de marcadores inmunocitoquímicos, para determinar el origen del tumor primario, siendo exitosa la determinación en dos de tres casos.⁴⁶ Protocolos detallados, fundamentos metodológicos más amplios, imágenes, resultados y una base de datos de alteraciones cromosómicas en diversos tumores, incluidos los antes mencionados, pueden encontrarse en la página: <http://amba.charite.de/cgh/>.

METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA

En lo que se refiere al análisis de la expresión génica, se han desarrollado metodologías que por su alta capacidad analítica y su sensibilidad, están revolucionando el campo de la investigación biomédica. Por las características inherentes de cada una de ellas, se pueden clasificar en dos tipos: las de sistema abierto y las de sistema cerrado. Con las técnicas de sistema abierto, además de obtener información acerca de los cambios en los patrones de expresión, se tiene la posibilidad de detectar y analizar genes nuevos, este es el caso del Análisis en Serie de Expresión Génica. En los sistemas cerrados, como los microarreglos de DNA (chip), el análisis de expresión se lleva a cabo únicamente para los genes que se encuentran inmovilizados en la matriz del arreglo, sea ésta cristal o membrana (Figura 3), dejando fuera la posibilidad de descubrir nuevos genes que pudieran estar expresando en la muestra del estudio. La elección del tipo de sistema adecuado para un experimento en particular resulta de gran importancia y dependerá de las necesidades del investigador y de la pregunta que busque responder. En general, lo más conveniente es utilizar en un primer paso una metodología abierta, como el análisis en serie de la expresión génica, para detectar aquellos genes que estén realmente involucrados en el proceso de interés, y posteriormente colocar éstos en un soporte de sistema cerrado, como los arreglos de cDNA, que nos per-

mitirán una más rápida caracterización de un mayor número de muestras.⁴⁷

ANÁLISIS EN SERIE DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (SAGE)

Desarrollada en 1995, permite obtener el patrón de expresión génica de la célula de una forma cuantitativa y global. La técnica de SAGE constituye una poderosa herramienta para la obtención de patrones de expresión, permitiendo el análisis de la expresión de cientos de transcritos de manera simultánea, sin necesidad de tener un conocimiento previo acerca de la secuencia de los mismos.⁴⁸ Este método se basa en el siguiente cálculo estadístico: asumiendo una distribución al azar de los nucleótidos en el genoma, una secuencia de nueve pares de bases podrá identificar a 262,144 transcritos diferentes. Se estima que el genoma humano contiene de 31,000 a 38,000 genes, así estas secuencias de nueve pb o “tags” resultarán más que suficientes para identificar cada uno de los transcritos producidos por todo el genoma. El aislamiento de estos “tags” de transcritos únicos, que provienen de regiones definidas del RNAm, así como la rápida identificación de sus secuencias mediante comparación en las bases de datos, da como resultado un método ideal para la evaluación de la totalidad de los transcritos expresados en una célula de una manera eficiente y cuantitativa.⁴⁹

El gran potencial de SAGE se ve reflejado en un estudio recientemente publicado, en el cual se anali-

zan todas de las librerías de SAGE existentes hasta el momento, abarcando un total de 3.5 millones de transcritos derivados de 19 tejidos, tanto sanos como tumorales. Por ejemplo, se encontró que en un tipo celular determinado se pueden expresar hasta 43,500 genes diferentes, esta cifra difiere del número de genes encontrados por el proyecto genoma, lo que puede deberse a que aún no se han caracterizado todos los genes presentes en el borrador de la secuencia, a que aún exista una cantidad considerable de genes en las áreas que faltan por secuenciar o porque SAGE detecte como transcritos de diferentes genes a tags que provengan de transcritos de un mismo gen, pero que hayan sido sujetos a corte y empalme alternativo. Asimismo, se detectaron cerca de 1,000 transcritos que se expresaban en todos los tejidos estudiados, los cuales representan el “transcriptoma mínimo”, es decir, aquellos genes de la economía celular cuya expresión es necesaria para mantener la maquinaria molecular mínima. Por el contrario, sólo un número limitado de transcritos se encontraron expresados exclusivamente en un tejido, éstos representan el grupo de genes que deben estar expresados para mantener el fenotipo específico y las características particulares de cada tipo celular. En lo que se refiere a los transcritos que modifican su patrón de expresión en los tejidos neoplásicos, únicamente se detectaron 40 transcritos que elevan su expresión en relación con su tejido normal de origen, indicando su posible papel en la tumorigénesis y señalándolos como marcadores biológicos útiles o

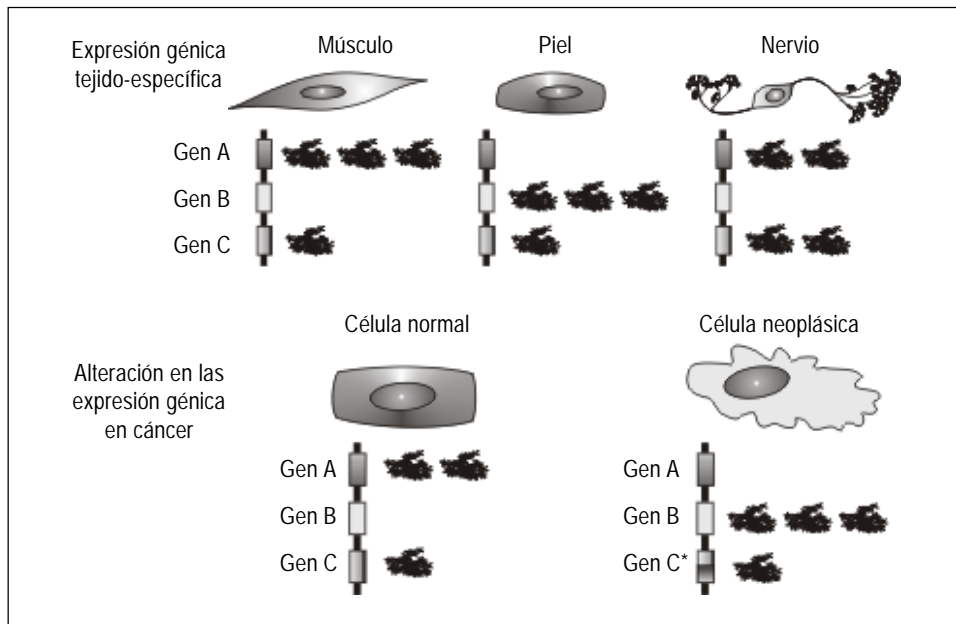


Figura 4. Aunque todas las células del organismo poseen el mismo DNA, el control en la expresión de diferentes genes es lo que le da su identidad a cada una. En el cáncer, además de existir alteraciones a nivel del DNA (mutaciones puntuales, translocaciones cromosómicas, etc.), se presentan también cambios en el patrón de expresión genética, perdiéndose de esta forma la identidad celular (Figura modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap>).

como blancos para estrategias terapéuticas. El primer análisis completo del transcriptoma de una célula humana lo constituye el caso de las líneas celulares de carcinoma de colon y recto, en las cuales se analizaron 1.004,509 transcritos derivados de lo que parecerían 56,153 genes únicos, con las reservas discutidas previamente en cuanto al número total de genes en el genoma humano, en un total de 22 diferentes librerías de SAGE.^{13,50} SAGE se ha utilizado hasta la fecha para caracterizar transcripcionalmente diferentes tipos de tejidos tanto normales como tumorales,⁵¹ incluyendo neoplasias gastrointestinales,⁵¹ cáncer de mama,⁴⁷ cáncer de pulmón,⁵² análisis de genes activados por la proteína p53,⁵³ análisis de apoptosis o muerte celular programada,⁵⁴ cáncer de páncreas,⁵⁵ tumores cerebrales y cerebro fetal.⁵⁶ De esta forma, la aplicación de esta metodología en diversos linajes celulares permitirá delinear las características transcripcionales de cada uno de ellos, aportando información invaluable para el estudio de las funciones básicas de cada tipo celular y de sus modificaciones durante los procesos patológicos (Figura 4).

MICROARREGLOS DE DNA: GENES EN UN CHIP

El fundamento básico del desarrollo de los arreglos de DNA se remonta al desarrollo del Southern blot.⁵⁷ La introducción reciente de métodos robotizados, la miniaturización y el uso de soportes no porosos, tales como el cristal, hicieron posible el desarrollo en 1995 de los microarreglos de DNA, en los cuales pueden depositarse hasta 10,000 diferentes moléculas de DNA, cada uno representando un gen diferente⁵⁸ (Figura 3). Existen dos tipos de microarreglos. En el caso de los microarreglos de DNAC, se depositan gotas de una solución con secuencias de genes expresados conocidos sobre un portaobjetos usando un brazo robótico, cada gota representando un gen particular. Para comparar la abundancia relativa de cada uno de estos genes en dos muestras determinadas, por ejemplo, RNAm de una célula normal y una neoplásica, las dos muestras se marcan utilizando fluorocromos diferentes. Posteriormente ambas muestras se mezclan y se utilizan como sonda de hibridación sobre los DNAC del microarreglo. Finalmente, un "scanner" con láser, ilumina los puntos y determina la intensidad de los fluorocromos sobre cada uno de ellos, presentando así la abundancia relativa de esa secuencia en ambas muestras.⁵⁹ Los microarreglos de oligonucleótidos sintéticos de alta densidad se basan en la síntesis

química sobre un cristal de silicio, de una secuencia de 25 pares de bases de DNA correspondiente a algún gen conocido. Esta síntesis se lleva a cabo utilizando métodos derivados de la construcción de procesadores informáticos, para poder crear secuencias específicas en puntos definidos del microarreglo.⁶⁰ En la actualidad ya se venden de forma comercial microarreglos que contienen aproximadamente 300,000 secuencias, representando 8, 102 genes diferentes depositadas sobre un cristal de 1.28 x 1.28 cm, y existen prototipos experimentales que pueden incluir hasta 1 millón de secuencias por arreglo. Modificaciones a la técnica prometen desarrollar microarreglos hasta con 100 millones de sondas diferentes en una superficie de 2 X 2 cm, lo que cubriría en un solo arreglo la totalidad del genoma humano.⁶¹ En este tipo de arreglos, el RNAm de la muestra se marca con fluorescencia, y posteriormente se utiliza como sonda de hibridación sobre el arreglo. De esta forma, a diferencia de los arreglos de DNAC, en los chips de oligonucleótidos se evalúa la concentración de ese mensajero en una sola población, obteniéndose el perfil de expresión génica en una situación biológica determinada.⁶² Los chips de oligonucleótidos son más versátiles en cuanto a sus aplicaciones, ya que además de monitorear patrones de expresión, sirven para genotipificar y detectar polimorfismos, tanto en humanos⁶³ como en agentes patógenos como el VIH⁶⁴ y *Mycobacterium*⁶⁵ o para secuenciar y detectar mutaciones de importancia clínica.^{66,68} Debido a su alto costo comercial y a las dificultades técnicas implícitas, esta metodología no llega aún a tener una utilización masiva, por lo que el impacto de los microarreglos en el estudio de las enfermedades humanas apenas empieza a observarse.^{69,71} Sin embargo, en los trabajos experimentales que utilizan microarreglos queda plenamente demostrado el potencial de esta metodología para el análisis genético global. Los microarreglos se han aplicado para investigar diversos fenómenos biológicos, tales como la valoración de la expresión de genes en el timo,⁷² identificación de genes involucrados en procesos metabólicos específicos,⁷³ control genético de la división celular⁷⁴ desarrollo embrionario,⁷⁵ genes de resistencia de citomegalovirus,⁷⁶ desarrollo del sistema nervioso central,⁷⁷ validación de drogas con potencial terapéutico,⁷⁸ etc. El desarrollo y progresión del cáncer, así como la reversión del fenotipo tumorigénico en condiciones experimentales están determinados por cambios complejos en los patrones de expresión génica, lo que hace de los chips una herramienta fundamental para su estudio.⁷⁹ Por ejemplo, utilizando una línea celular de melanoma que deja de ser tumorigéni-

ca al introducirse una copia del cromosoma 6, se identificaron genes localizados en este cromosoma que están involucrados en mantener el fenotipo tumorigénico.⁷⁹ Asimismo, usando chips de oligonucleótidos, se han determinado mutaciones en el gen *BRCA 1*, demostrando el potencial de los chips con fines de diagnóstico genético.⁸⁰ Por otro lado, el análisis de expresión genética en individuos con leucemia aguda o con linfoma de células B, demostró el potencial del método para llevar a cabo una clasificación molecular del cáncer sobre la base de sus patrones de expresión.⁸¹ Esta nueva herramienta de clasificación se ha utilizado para analizar diversos modelos, tales como la diferenciación de células hematopoyéticas,⁸² tejidos normales y tumorales de colon,⁸³ mama,⁸⁴ así como también para el estudio de la farmacología genética del cáncer.^{85,86} Dos trabajos recientes demuestran la potencialidad de los microarreglos como herramientas para estudiar la genética molecular global del cáncer. Uno de ellos plantea y demuestra que la variabilidad clínica observada en el tratamiento de los linfomas de células B se debe a la heterogeneidad genética presente en estos tumores.⁸⁷ En el otro trabajo se logró identificar el primer “retrato molecular” del cáncer de mama. Se compararon tumores primarios contra metástasis, muestras del mismo tumor antes y después del tratamiento y tejidos normales, pudiéndose diferenciar entre cada uno de ellos sobre la base de su patrón de expresión. Del mismo modo, el “retrato molecular” permite identificar los tumores que tuvieron una buena respuesta al tratamiento. Así, aunque cada tumor presenta características genéticas que lo hacen único, queda claro que tumores con características clínicas o biológicas similares, comparten patrones de expresión génica parecidos.⁸⁸ En colaboración con el Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, nuestro grupo está diseñando otro tipo de chips para la detección de mutaciones puntuales, el sistema Genesensor de doble hibridación contigua, para la búsqueda de mutaciones en el oncogén *RET*, involucrado en síndromes neoplásicos endocrinos. En este sistema se depositan sobre el portaobjetos secuencias de oligonucleótidos que contienen tanto la secuencia normal, como sitios conocidos de mutación en una región del gen de interés, y se utiliza como sonda fragmentos de esa región genética amplifica por PCR a partir del tejido tumoral, las cuales se hibridarán únicamente sobre los oligonucleótidos que tengan una complementariedad total, detectando de esta forma las mutaciones presentes en la muestra. Este sistema abre las puertas para llevar a cabo un diagnóstico molecular preclí-

co para estos síndromes de una forma sencilla y rápida (Maldonado R, y col., enviado para publicación).

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS: LA PROTEÓMICA

El funcionamiento de la célula depende de una gran cantidad de mecanismos controlados por enzimas que están codificadas en el DNA, y que se expresan en RNAm y proteínas. Sin embargo en muchos casos el esquema no es tan sencillo, no existe una relación lineal entre los genes codificados en el DNA, los niveles de RNAm expresados y el complemento proteínico celular, el proteoma. Éste constituye la parte efectora de la información genética y es lo que finalmente le da el fenotipo característico a cada célula. Un ejemplo claro de la importancia de las proteínas, lo constituye el hecho de que casi todas las drogas existentes se dirigen contra ellas, modificando o modulando su acción en etapas específicas de diversos procesos metabólicos. El detectar una secuencia codificante en el DNA no necesariamente implica la existencia de una proteína,⁸⁹ es más, la cantidad de RNAm de un transcrito específico puede no estar relacionado con la cantidad de esa proteína en la célula.⁹⁰ Por otro lado, la localización de las proteínas dentro de la célula no puede ser determinada a partir de la secuencia del DNA, tampoco pueden ser valorados los mecanismos de modificación postraduccionales, tales como las glicosilaciones, fosforilaciones, etc. Otras características fundamentales de la actividad proteínica, como la activación por proteólisis, su tiempo de vida media o su tasa de degradación, sólo pueden conocerse a través de estudios directos sobre la proteína de interés. Con esta finalidad, se desarrollaron los métodos de análisis de alto rendimiento para el estudio del complemento proteínico de la célula, dando lugar al nacimiento de la proteómica. Las herramientas tecnológicas necesarias para un análisis proteómico profundo aún se encuentran en un nivel rudimentario si las comparamos con las herramientas para el estudio del genoma. Sin embargo, gracias a avances tecnológicos recientes se ha empezado a estudiar la posibilidad de iniciar en un futuro un proyecto del proteoma humano.¹⁴

GELES BIDIMENSIONALES DE PROTEÍNAS

El método tradicional para el análisis de todas las proteínas expresadas en una célula lo constituye el uso de geles bidimensionales de poliacrilamida, desarrollado a fines de los 70.⁹¹ En la primera separación, o dimensión, se separan las proteínas sobre la base de su punto isoeléctrico, es decir al pH donde su car-

ga eléctrica es nula, en la segunda dimensión, se separan sobre la base de su masa y peso molecular. De esta forma se obtienen una serie de manchas que representan la totalidad de las proteínas expresadas. Sin embargo, aun los mejores geles únicamente pueden resolver un máximo de 10 000 proteínas (Figura 3), por lo que resulta necesario utilizar métodos más eficientes para su análisis.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI)

Para aumentar la resolución en estudios de proteómica, en 1993 se empieza a utilizar la espectrometría de masas.⁹² Una vez separada la proteína de interés en un gel de doble dimensión, ésta se eluye y se digiere con una proteasa secuencia específica, como la tripsina. Posteriormente, los péptidos generados se analizan en el espectrómetro, donde se genera una gráfica de sus masas, las cuales son después comparadas con las de péptidos teóricos generados por computadora en las bases de datos de proteínas, y si existe coincidencia en el patrón de masas teórico y el obtenido por el espectrómetro, se conoce así la identidad de la proteína analizada. De la misma forma, las modificaciones químicas que requieren algunas proteínas para llevar a cabo su función biológica pueden ser detectados usando espectrometría, aunque esta tarea resulta bastante más complicada.⁹³

ARREGLOS DE PROTEÍNAS

La complejidad química de las proteínas es superior en varios órdenes de magnitud a la del DNA, por lo que el análisis del proteoma mediante la utilización de chips resulta extremadamente complicado. Actualmente, se están desarrollando chips con anticuerpos para diferentes proteínas anclados a la superficie de cristal. Posteriormente las proteínas de una muestra se marcan con fluorescencia y se hacen reaccionar con el chip. Los anticuerpos reconocerán a sus antígenos y la cuantificación se lleva a cabo de manera similar a los chips de DNAC.⁹⁴ Aunque esta aproximación tiene potencial para una aplicación a gran escala, el reto principal lo constituye el desarrollar anticuerpos para cada una de la multitud de moléculas que constituyen el proteoma. Una aplicación más práctica de este concepto lo constituye el diseño de chips usando anticuerpos específicos para enfermedades determinadas, teniendo así una aplicación directa en el diagnóstico⁹⁵ (Figura 3). Resulta lógico que debido a su reciente desarrollo, la proteómica tenga aún pocos ejemplos de su aplicación al estudio

de las enfermedades, a continuación presentamos algunos de ellos. Usando metodologías como la espectrometría y el diseño de péptidos, recientemente se desarrolló un sistema que evalúa la actividad de las cisteinproteasas durante la progresión del cáncer de piel.⁹⁶ Por otro lado, gracias al desarrollo de una microplaca que permite valorar la actividad de los cuatro grupos más importantes de proteasas se ha logrado conocer el papel de éstas en la progresión del cáncer de colon, desde el epitelio normal hasta la formación de metástasis.⁹⁷ Estos ejemplos resultan importantes debido a que valoran la actividad enzimática real en una muestra, es decir, la funcionalidad de las proteínas, cosa que resulta imposible analizando el DNA o el RNAm. Asimismo, se están aplicando estudios de proteómica para caracterizar las proteínas expresadas en carcinoma hepático,⁹⁸ neoplasias urológicas,⁹⁹ etc.

CONCLUSIONES

La combinación de las técnicas tradicionales con las metodologías de análisis global, trae como consecuencia un mejor entendimiento de las enfermedades oncológicas, abriendo las puertas al desarrollo de nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos. La factibilidad de obtener un perfil molecular de muestras clínicas de tejido es ahora una realidad.¹⁰⁰ El cúmulo de información derivado de estos análisis, debe ser estructurado de manera que traiga beneficios al mayor número de investigadores.¹⁰¹ En este sentido, el proyecto de la anatomía del genoma de la célula neoplásica constituye el mayor esfuerzo llevado a cabo a la fecha para comprender los mecanismos moleculares de la carcinogénesis.¹⁰² Cabe mencionar que para llevar a cabo este esfuerzo, es necesario contar con una fuerte interacción entre los departamentos de investigación y la clínica, sobre todo con el departamento de patología, ya que la disponibilidad de tejidos perfectamente diagnosticados y preservados para los estudios moleculares resulta clave para el éxito del análisis. La colaboración de la Investigación y la Patología en la creación de un banco de tejidos para su análisis molecular constituye uno de los primeros pasos para lograr este objetivo.¹⁰³

Resulta complicado tratar de englobar las metodologías que están revolucionando la investigación biomédica y sobre las cuales se han escrito incontables artículos. A medida que estos métodos están al alcance de un mayor número de investigadores, la necesidad de conocer sus fundamentos será cada vez más apremiante. Esperamos que esta revisión haya cumplido la tarea de brindar una mayor información

acerca de los conceptos más recientes en cuanto a las metodologías de análisis global y de sus posibles aplicaciones y repercusiones en el estudio de las enfermedades humanas, principalmente en el estudio de la oncología y patología molecular.

GLOSARIO

BAC: Cromosoma bacteriano artificial, estructura de DNA construida mediante ingeniería genética que posee las características de un cromosoma bacteriano, lo que le permite ser copiado y propagado durante la división de la bacteria que lo contiene. En él se inserta la secuencia de DNA de interés que nos interesa propagar.

DNAc: DNA complementario, resulta cuando un RNAm es transformado a DNA mediante la retrotranscripción.

CGH: (*Comparative Genomic Hybridization*), hibridación genómica comparativa.

Corte y empalme: "splicing", es el proceso que remueve las secuencias que no codifican proteína (intrones) de los RNAm recién sintetizados, dejando únicamente las secuencias codificantes (exones). Cuando se remueven también exones, se habla de un "splicing" alternativo, mecanismo por el cual se pueden formar diferentes variantes de una proteína.

Genes supresores: genes comúnmente involucrados en los procesos de control del ciclo celular, se consideran los "frenos" de la proliferación. Su alteración trae como consecuencia la pérdida del control de procesos como la reparación del DNA. Su acción es de tipo recesivo. PE: p53, Rb.

Genoma: La totalidad de la secuencia de DNA de un organismo.

Genómica: Estudio de las características genéticas globales de una célula u organismo, la medicina genómica tomará en cuenta las características particulares de cada individuo para diseñar estrategias de diagnóstico y tratamiento específicas para cada paciente.

Hibridación in situ: Técnica por la cual es posible detectar ácidos nucleicos sobre cortes histológicos sin alterar la estructura de los tejidos y células. La inmunocitoquímica cumple la misma función pero detectando proteínas.

M FISH: (*Multiple Fluorescent in situ Hybridization*), hibridación in situ fluorescente múltiple.

Microarreglos de DNA: Se obtienen al depositar pequeñas gotas de una solución de DNAc o al sintetizar un oligonucleótido sobre una matriz sólida, como el cristal, en un orden determinado, formando una matriz en la cual cada punto representa un gen en particular. Para el análisis de proteínas se depositan en la matriz anticuerpos específicos.

RNAm: RNA mensajero, es el intermediario entre el DNA y las proteínas. Se sintetiza como una molécula de cadena sencilla a partir del DNA mediante el proceso de transcripción.

Northern Blot: Técnica por la cual se transfieren moléculas de RNA a una matriz sólida, tal como papel de nitrocelulosa para su estudio. El Southern y Western blot se basa en el mismo principio metodológico y corresponde a la transferencia de DNA y proteínas, respectivamente.

Oligonucleótido: secuencia corta de DNA.

Polimorfismo: Una variación en el genoma entre miembros individuales de una población y que se encuentra en un número considerable de los mismos. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son cambios en una sola base de la secuencia del DNA. Al parecer la mayor parte de la variabilidad genética humana proviene de los SNPs.

Proteoma: La totalidad de las proteínas expresadas en una célula.

Protooncogenes: genes comúnmente involucrados en el control de la proliferación y diferenciación celular, cuando éstos se alteran reciben el nombre de oncogenes. La acción conjunta de varios oncoge-

nes transforma a la célula normal en una neoplásica. Los oncogenes actúan de forma dominante. PE: C-myc, Ret, etc.

Reacción en cadena de la polimerasa: PCR, técnica por la cual es posible amplificar enzimáticamente billones de veces una secuencia de DNA determinada, cuando se usa para detectar secuencias de RNA, se utiliza la PCR acoplada a retrotranscripción (RT PCR), es decir, se convierte el RNA a DNA en un primer paso y posteriormente se amplifica.

SAGE: (*Serial Analysis of Gene Expression*) Análisis en serie de la expresión genética.

Sitios de poliadenilación: Como uno de los últimos pasos en el proceso de maduración, a los RNAm de las células superiores se les adiciona una cola de poliadeninas en uno de sus extremos, para protegerlo de la degradación.

SKY: (*Spectral Karyotyping*), cariotipificación espectral.

Traducción: Proceso mediante el cual se utiliza una hebra de RNAm como templado para determinar la secuencia de aminoácidos en las proteínas.

Transcripción: Proceso por el cual un gen en el DNA se copia para producir un RNA, es el primer paso en la expresión genética, aunque finalmente no todos los RNAs producidos (transcritos) darán lugar a proteínas. Se lleva a cabo en el núcleo celular.

Transcriptoma: La totalidad de los transcritos (RNAs) presentes en una célula.

REFERENCIAS

1. Sager R. Expression genetics in cancer: Shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94: 952-5.
2. Alwine J, Kemp D, Stark G. Method for detection of specific RNAs in agarose by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5350-4.
3. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; Procedures and some applications. *Proc Nati Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.
4. Polak J, Van Noorden S. Eds. Immunocytochemistry: Practical applications in pathology and biology. John Wright PSG; Littleton, Mass: 1983.
5. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986; 51: 263-73.
6. Berchtold M. A simple method for direct cloning and sequencing cDNA by the use of a single specific oligonucleotide and oligo (dT) in a polymerase chain reaction (PCR). *Nucl Acids Res* 1989; 17: 453-5.
7. Gall J, Pardue M. Nucleic acid hybridization in cytological preparations. *Methods Enzymol* 1971; 38: 470-80.
8. Werner M, von Wasielewsky R, Komminoth P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*. 1996; 105: 253-60.
9. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
10. Venter JC, *et al*. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
11. Claverie J. Gene number: What if there are only 30,000 genes? *Science* 2001; 291: 1255-7.
12. Galas D. Sequence interpretation: Making sense of the sequence. *Science*, 2001; 291: 1257-60.
13. Velculescu V, Madden S, Zhang L, Lash A, Yu J, Rago C, *et al*. Analysis of human transcriptomes. *Nature Genetics* 1999; 23: 387-8.
14. Abbot A. A post-genomic challenge: Learning to read the patterns of protein synthesis. *Nature* 1999; 402: 715-20.
15. Sterky F, Lundberg J. Sequence analysis of genes and genomes. *J Biotechnol* 2000; 76: 1-31.

16. Hattori F, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 1999; 402: 489-95.
17. Dunhain I, et al. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 2000; 405: 311-9.
18. E. Green. The human genome project and its impact on the study of human disease. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. Charles R. Scriver Eds. 8th edition, McGraw Hill; 2000.
19. Hidalgo A, Martínez I, Franco C, Medrano M, Rodríguez S, Benítez L, Salcedo M. Presence of the 918 mutation in the RET proto oncogene in a Mexican patient with multiple endocrine neoplasia type 2B. *J Clin Exp Cancer Res* 1998; 17: 149-52.
20. Fujimura F. Diagnosis and the new genetics. *Curr Opin Biotech* 1994; 5: 654-62.
21. The International SNP map-working group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409: 928-33.
22. Chakravarti A. Single nucleotide polymorphisms to a future of genomic medicine. *Nature* 2001; 409: 822-3.
23. Ommen, Bakker, Dunnen. The human genome project and the future of diagnostics, treatment and prevention. *Lancet* 1999; 354: 5-10.
24. Butler D, Smaglik P. Draft data leave geneticist with a mountain still to climb. *Nature* 2000; 405: 984-5.
25. Dove A. Genetics research on the town hall agenda, courtesy of ELSI. Ethical, Legal, and Social Implications. *Nature Medicine* 1999; 5: 541-2.
26. Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights. UNESCO General Conference, 29th Session, November 11, 1997. http://www.unesco.org/human_rights/hrbc.htm
27. Pinkel D, Landegent 3, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome specific libraries; detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9138-42.
28. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward D. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using chromosome specific library probes. *Hum Genet* 1988; 80: 235-46.
29. Nederlof P, van der Flier S, Raap A. Detection of chromosome aberrations in interphase tumor nuclei by nonradioactive *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 42: 87-98.
30. Nederlof P, van der Flier S, Vrolijk J, et al. Fluorescence ratio measurements of double labeled probes for *in situ* hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry* 1992; 13: 839-45.
31. Speicher M, Ballard S, Ward D. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 1996; 12: 368-75.
32. Schrock E, du Manoir S, Veidman T, Schoell B, Weinberg J, Ferguson Smith M, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-7.
33. Gray J, Lucas J, Pinkel D, Awa A. Structural chromosome analysis by hole chromosome painting for assessment of radiation induced genetic damage. *J Radiat Res* 1992; 33: 80-6.
34. Ried T, Arnold N, Ward D, Weinberg J. Comparative high resolution mapping of human and primate chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 1993; 18: 381-6.
35. Misteli D, Spector D. The cellular organization of gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 323-31.
36. Carter N. Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry* 1994; 18: 2-10.
37. Ried T, Schrock E, Ning Y, Weinberg J. Chromosome painting: A useful art. *Hum Mol Gen* 1998; 7: 1619-26.
38. Schrock E, Veldman T, Ning Y, Padilla Nash H, Spurbeck J, Schaffer L, et al. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Human Genet* 1997; 101; 255-62.
39. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*, Wiley Liss; New York: 1995.
40. Macville M, Schrock E, Padilla Nash, et al. Comprehensive and definitive molecular characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res*, 1999; 59: 141-50.
41. Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley J, Ried T. Hidden chromosomal abnormalities in hematological malignancies detected by multicolor spectral karyotyping. *Nature Genetics* 1997; 15: 406-10.
42. Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-21.
43. Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes: [correspondence] *American J Pathol* 2000; 157: 689.
44. Gebhart E, Liehr T. Patterns of genomic imbalances in human solid tumors (Review). *Int J Oncol* 2000; 16: 383-99.
45. Hidalgo A, Schewe C, Petersen S, Salcedo M, Gariglio P, Schluns K, Dietel M, Petersen I. Human papillomavirus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines, *Eur J Cancer* 2000; 36: 542-8.
46. Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, Pacyna M, Schluns K, Goeze A, Krebber B, Szymas J, Schlag P, von Deimling A. Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors. *Brain Pathol* 2000; 10: 395-401.
47. Nacht M, et al. Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 5464-70.
48. Velculescu V, Thang L, Vogelstein B, Kinzler K, Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; 270: 484-7.
49. Bertelson A, Velculescu V. High throughput gene expression analysis using SAGE. *Drug Disc Today* 1998; 3: 152-9.
50. Madden S, Wang C, Landes G. Serial analysis of gene expression; from gene discovery to target identification. *Drug Disc Today* 2000; 5: 415-24.
51. Zhang L. Et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; 276: 1268-72.
52. Hibi K, et al. Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5690-4.
53. Madden SL, Galella EA, Zhu J, Bertelsen AH, Beaudry GA. SAGE transcript profiles for p53 dependent growth regulation *Oncogene* 1997; 15: 1079-85.
54. Pollack K, Xia Y, Weir JA, Kindler KW, Vogelstein B. A model for p53 induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-5.
55. Zhou W, Sokoll U, Bruzek DJ, Zhang L, Velculescu VE, et al. Identifying markers for pancreatic cancer by gene expression analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 109-12.
56. Michiels E, Oussoren E, Van Groenigen M, Pauws E, et al. Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain. *Physiol Genomics* 1999; 1: 83-91.
57. Southern E. Detection of specific DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-17.
58. Schena M, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
59. O'Brown P, Bostein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genetics* 1999; (Suppl) 21: 33-6.
60. Lipshutz R, Fodor S, Gingeras T, Lockhart D. High density oligonucleotide arrays. *Nat Genetics* 1999; (Suppl) 21: 20-4.
61. McCall G. et al Light directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13555-60.
62. Lockhart D. Et Al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1675-80.
63. Wang, D. Large scale identification, mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280:1077-82.
64. Kozal M, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV 1 clade B protease gene using high density oligonucleotide arrays: Implications for therapy. *Nature Med* 1996; 7: 753-9.

65. Gingeras T, et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res* 1988; 8: 435-48.
66. Gunthard H, Wong J, Ignacio C, et al. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type I pol from clinical samples. *AIDS Res Hum Retroviruse* 1998; 14: 869-76.
67. Hacia J. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature Genetic* 1999; (Suppl) 21: 42-7.
68. Yershov G, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4913-8.
69. Collins F. Microarrays and macroconsequences. *Nature Genetics* 1999; (Suppl) 21:2.
70. Lander E. Array of hope. *Nature Genetics* 1999; (Suppl) 21: 34.
71. Khan J, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent J. DNA microarray technology: The anticipated impact on the study of human disease. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1423: M17-M28.
72. Nguyen C, et al. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* 1995; 29: 207-16.
73. DeRisi J, Iyer V, Brown P. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997; 278: 680-6.
74. Cho R, et al. A genome wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* 1998; 2: 65-73.
75. White K, Rifkin S, Hurban P, Hogness D. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. *Science* 1999; 286: 2179-84.
76. Chambers J, et al. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: Profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol* 1999; 73: 5757-66.
77. Wen X, et al. Large-scale temporal gene expression mapping of central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 334-9.
78. Marton M, et al. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nature Med* 1998; 4: 1293-301.
79. DeRisi J, Penland L, Brown P, et al. Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics* 1996; 14: 457-60.
80. Hacia J, Brody L, Chee M, et al. Detection of heterozygous mutations in *BRCA1* using high density oligonucleotide arrays and two color fluorescence analysis. *Nature Genet* 1996; 14: 441-7.
81. Golub T, et al. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 282: 628-9.
82. Tamayo P, et al. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: Methods and application in hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2907-12.
83. Alon U, et al. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6745-50.
84. Perou C, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9212-7.
85. Ross D, Scherf U, Eisen M, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genet* 2000; 24: 227-35.
86. Scherf U, Ross D, Waltham M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature Genet* 2000; 24: 236-44.
87. Alizadeh A, et al. Distinct types of diffuse large B cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-10.
88. Perou C, Sorlie T, Eisen M, van de Rijn M, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000; 406: 747-52.
89. Eisenberg D, Marcotte E, Xenarios I, Yeates T. Protein function in the post genomic era. *Nature* 2000; 405: 823-6.
90. Gygi S, Rochon Y, Franza B, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1720-30.
91. O'Farrell P. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-21.
92. Henzel W, Billeci T, Stults J, Wong S. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5011-5.
93. Küster B, Mann M. Identifying proteins and post translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 393-400.
94. Mendoza L, McQuary P, Mongan P, et al. High throughput microarray based enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Bio-techniques* 1999; 27: 778-88.
95. Dalton R. Can researchers find recipe for proteins and chips? *Nature* 1999; 402: 718-9.
96. Greenbaum D, Medzihradsky K, Burlingame A, Bogoy M. Epoxide electrophiles as activity dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol* 2000; 7: 569-81.
97. McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, Coussens L, Warren R. A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol Med* 2000; 6: 450-60.
98. Seow TK, Ong SE, Liang RC, Ren EC, Chan L, Ou K, Chung MC. Two-dimensional electrophoresis map of the human hepatocellular carcinoma cell line, HCC M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21: 1787-813.
99. Unwin RD, Knowles MA, Selby PJ, Banks RE. Urological malignancies and the proteomic-genomic interface. *Electrophoresis* 1999; 20: 3629-37.
100. Emmert-Buck M, Strausberg R, Krizman D, Bonaldo F, et al. Molecular profiling of clinical tissue specimens. *Am J Pathol* 2000; 156: 1109-15.
101. Lal A, Lash AE, Altschul SF, Velculescu V, et al. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 5403-7.
102. Strausberg R, Buetow K, Emmert Buck M, Klausner R. The cancer genome anatomy project. *Trends Genet* 2000; 16: 103-6.
103. Grizzle W, Aamodt R, Clausen K, LiVolsi V, et al. Providing human tissues for research, how to establish a program. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 1065-76.

Reimpresos:

Dr. Mauricio Salcedo*

Dr. Alfredo Hidalgo**

* Candidato al grado de doctor

** Laboratorio de Genética Molecular del Cáncer

Unidad de Investigación Médica en

Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología,

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06725 México DF.

Tel: 5627 6900, Ext. 4301-4323. Fax: 5761-0952.

E-mail: alfhm@yahoo.com

Recibido el 8 de enero de 2001.

Aceptado el 25 de mayo de 2001.

REFERENCIAS

- 1.- World Health Statistics, 1987-1990. *World Health Organization*.
- 2.- http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/
- 3.- Programa de prevención y control del cáncer cervico-uterino. *Secretaría de Salud, México* 1992.
- 4.- Brisson J, Morin C, Fortier M, et al.: Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *American Journal of Epidemiology* 1994; **140**:700-710.
- 5.- Castellsague X, Bosch F, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research* 2002; **89**:191-199.
- 6.- Schiffman M, Bauer H, Hoover R, Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85**: 958-964.
- 7.- Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; **(1-2)**:1-5.
- 8.- Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer K, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Muñoz N. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; **189**: 12-19
- 9.- Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C, Shah K. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; **55**:244-265.
- 10.- de Villiers E. Human pathogenic papillomavirus types: and update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;**186**:1-12.
- 11.- zur Hausen. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**:690-698.

- 12.- Syrjanen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000; **11**:259-274.
- 13.- Munoz N, Bosch F, de Sanjose, S, Herrero R, Castellsague X, Shah K, Snijders P, Meijer C. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New Eng J Med* 2003; **348**:518-527.
- 14.- <http://monographs.iarc.fr/monoeval/allmonos.html>
- 15.- Clifford G, Smith J, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; **88**:63-73.
- 16.- Thomas D, Ray R, Kuypers J, et al. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers. *Am J Epidemio*, 2001; **153**:740-748.
- 17.- Stubenrauch F, Laimins L. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars Cancer Biol* 1999; **9**:379-386.
- 18.- Longworth M, Laimins L. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**:362-372.
- 19.- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, **314**:111-114, 1985.
- 20.- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*. **59**:6132-6136, 1999.
- 21.- Münger K, Howley P, Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, **89**:213-228, 2002.

- 22.- Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, **20**:7874-7887, 2001.
- 23.- Münger K, Basile J, Duensing S, Eichten A, Gonzalez S, Grace M, Zacny V. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, **20**:7889-7898, 2001.
- 24.- Finzer P, Aguilar-Lemarroy A, Rösl F. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer letters*, **188**:15-24, 2002.
- 25.- Tindle R, Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Rev Cancer*, **2**:1-7, 2002.
- 26.- Woo R, Poon R. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev.* **18**:1317-1330, 2004.
- 27.- Motoyama N, Naka K, DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev*, **14**:11-16, 2004.
- 28.- Dravian V, Xie S, Sorger P. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev.* **14**:120-125, 2004.
- 29.- Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*, **20**:157-162, 2004.
- 30.- Duensing S, Münger K, Centrosomes, genomic instability, and cervical carcinogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp.* **13**:9-23, 2003
- 31.- Anton HN Hopman, Frank Smedts, Wendy Dignef, Monique Ummelen, Gabe Sonke, Marcel Mravunac, G Peter Vooijs, Ernst-Jan M Speel, Frans CS Ramaekers. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities *J Pathol*, **202**:23–33, 2004.

- 32.- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, 22:1225-1237, 2003.
- 33.- Cannizzaro LA, Durst M, Mendez MJ, Hecht BK, Hecht F. Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints. *Cancer Genet Cytogenet*; 33:93-98, 1998.
- 34.- Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, Gostout BS, Cheung TH, Chung TK, Fu WY, Smith DI. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene*; 22:7233-7242, 2003.
- 35.- Ferber MJ, Montoya DP, Yu C, Aderca I, McGee A, Thorland EC, Nagorney DM, Gostout BS, Burgart LJ, Boix L, Bruix J, McMahon BJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI, Roberts LR. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene*; 22:3813-3820, 2003.
- 36.- Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*, 64:3878-3884, 2004
- 37.- Wentzensen N, Ridder R, Klaes R, et al. Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene*, 2002, 21:419-426.
- 38.- Th. Boveri, Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, Fischer Verlag, Jena, 1914, English translation: The Origin of Malignant Tumors, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1929.
- 39.- Chaill D, Kinzler K, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumors. *Trends in Genetics*, 15:M57-M60, 1999.

- 40.- Atkin N. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: A Review. *Cancer Genet Cytogenet.* 95:33-39, 1997.
- 41.- Smits HL, Radsheer E, Rood I, Mehendale S, Slater R, Van Der Noordaa J, Ter Schegget J. Induction of anchorage independent growth of human embryonic fibroblasts with a deletion in the short arm of chromosome 11 by human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol*, 62:4538-4543, 1988.
- 42.- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*; 258:818-821, 1992.
- 43.- Strusky S, Doco-Fenzy M, Cornillet-Lefebvre P. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet*; 135:63-90, 2002. Review.
- 44.- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*; 20:399-407, 1997.
- 45.- Snijders, A.M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A.K., Huey, B., Kimura, K. et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat. Genet.*, 29, 263–264, 2001.
- 46.- Albertson D, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human Molecular Genetics*, Vol. 12, Review Issue 2, 2003.
- 47.- Wessendorf, S., Schwaenen, C., Kohlhammer, H., Kienle, D., Wrobel, G., Barth, T.F., Nessling, M., Moller, P., Dohner, H., Lichter, P. et al. Hidden gene amplifications in

aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene*, 22:1425–1429, 2003.

48.- Monni, O., Barlund, M., Mousses, S., Kononen, J., Sauter, G., Heiskanen, M., Paavola, P., Avela, K., Chen, Y., Bittner, M.L. et al. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98:5711–5716, 2001.

49.- Goldstein, M., Rennert, H., Bar-Shira, A., Burstein, Y., Yaron, Y. and Orr-Urtreger, A. Combined cytogenetic and array-based comparative genomic hybridization analyses of Wilms tumors: amplification and overexpression of the multidrug resistance associated protein 1 gene (MRP1) in a metachronous tumor. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 141:120–127, 2003.

50.- Snijders, A.N., Nowee, M.E., Fridlyand, J., Piek, J.M.J., Dorsman, J.C., Jain, A.N., Pinkel, D., van Diest, P.J., Verheijen, R.H.M. and Albertson, D.G. 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, 2003.

51.- Wilhelm, M., Veltman, J.A., Olshen, A.B., Jain, A.N., Moore, D.H., Presti, J.C. Jr, Kovacs G. and Waldman, F.M. Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res*, 62:957–960, 2002.

52.- Heselmeyer K, Schröck E, Du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:479-484, 1996.

53.- Heselmeyer K, Macville M, Schröck E, Blegen H, Hellström A, Shah K, Auer G, Ried T. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chrom Cancer*, 19:233-240, 1997.

54.- Deltas A, Torhorst J, Jiang F, Proffit J, Schultheiss E, Holzgreve W, Sauter G, Mihatsch M, Moch H. Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma stage IB detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, 59: 3475-3479, 1999.

55.- Kirchhoff M, Rose H, Petersen B, Maahr J, Gerdes T, Lundsteen C, Bryndorf T, Kryger-Baggesen N, Christensen L, Engelholm S, Philip J. Comparative genomic hybridization reveals a recurrent pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma in situ of the cervix and in advanced-stage cervical carcinoma. *Genes Chrom Cancer*, 24:144-150, 1999.

56.- Ried T, Heselmayer-Haddad K, Blegen H, Schrock E, Auer G. Genomic changes defining the genesis, progression and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chrom Cancer*, 25:195-204, 1999.

- 57.- Allen D, White D, Hutchins A, Scurry J, Tabrizi S, Garland S, Armes J. Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer* ; 83:1659-1663, 2000.
- 58.- Kirchhoff M, Rose H, Petersen B, Maahr J, Gerdes T, Philip J, Lundsteen C. Comparative genomic hybridization reveals non-random chromosomal aberrations in early preinvasive cervical lesions. *Cancer Genet Cytogenet*, 129:47-51, 2001.
- 59.- Umayahara K, Numa F, Suehiro Y, Sakata A, Nawata S, Ogata H, Suminami Y, Sakamoto M, Sasaki K, Kato H. Comparative Genomic Hybridization detects genetic alterations during early stages of cervical cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer*; 33:98-102, 2002.
- 60.- Harris CP, Lu XY, Narayan G, Singh B, Murty VV, Rao PH. Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*; 36:233-241, 2003.
- 61.- Narayan G, Pulido H, Koul S, Lu X, Harris C, Yeh T, et al. Genetic analysis identifies putative tumor suppressor sites at 2q35-q36.1 and 2q36.3-q37.1 involved in cervical cancer progression. *Oncogene*; 22:3489-3499, 2003.
- 62.- Rao P, Arias-Pulido H, Lu X, Harris C, Vargas H, et. al. Chromosomal amplifications, 3q gain and deletions of 2q33-q37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma. *BMC Cancer*, 4:5, 2004.
- 63.- Kanehisa M, Bork P. Bioinformatics in the post-sequence era. *Nature Genet*; 33:305-310, 2003.
- 64.- Chan JK, Monk BJ, Brewer C, Keefe KA, Osann K, McMeekin S, Rose GS, Youssef M, Wilczynski SP, Meyskens FL, Berman ML. HPV infection and number of lifetime sexual

partners are strong predictors for 'natural' regression of CIN 2 and 3. *Br J Cancer*. **89**:1062-1066, 2003.

65.- Caceres-Cortes J, Alvarado-Moreno J, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A, Rocha- Zabaleta L, Urdiales-Ramos J, Weiss-Steider B, Haman A, Hugo P, Brousseau R, Hoang T. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res*, 61:6281-6289, 2001.

66.- Monroy-Garcia A, Weiss-Steider B, Hernandez-Montes J, Ortiz-Navarrete VF, Banuelos-Panuco A, Acosta-Araujo A, Diaz-Quinonez A, Lopez-Graniel CM, Herbert G, Granados J, de Leo C, Silva-Lopez RM, Mora-Garcia ML. Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for the HLA-B*3901 allele. *Arch Virol*. **147**:1933-1942, 2002.

67.- Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I. Image analysis for Comparative Genomic Hybridization (CGH) based on a karyotyping program for Windows. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*; 19: 461-474, 1997.

68.- Baudis M, Cleary M. Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics*; **17**:1228-1229, 2001.

69.- Desper R, Jiang F, Kallioniemi OP, Moch H, Papadimitriou CH, Schaffer AA. Inferring tree models for oncogenesis from comparative genome hybridization data. *J Comput Biol*. **6**:37-51, 1999.

70.- Brodeur GM, Tsiatis AA, Williams DL, Luthardt FW, Green AA: Statistical analysis of cytogenetic abnormalities in human cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 7:137-152, 1982.

- 71.- Sasaki T, Arai H, Beppu T, Ogasawara K. Detection of gene amplification and deletion in high grade gliomas using a genome DNA microarray (GenoSensor Array 300). *Brain Tumor Pathol*, **20**:59-63, 2003.
- 72.- Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*, 254:1167-1173, 1991.
- 73.- Sreekantaiah C, Bhargava K, Shetty N. Premature chromosome condensation in human cervical carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 24:263-269, 1987
- 74.- Therman E, Buchler D, Nieminen U, Timonen S. Mitotic modifications and aberrations in human cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 16:185-197, 1984.
- 75.- Dorritie K, Montagna C, Difilippantonio MJ, Ried T. Advanced molecular cytogenetics in human and mouse. *Expert Rev Mol Diagn*. **4**:663-676, 2004.
- 76.- Esteller M, Guo M, Moreno V, Peinado M, Capella G, Galm O, Baylin S, Herman J. Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer Res*. **62**:5902-5905, 2002.
- 77.- Wahlberg P, Fex G, Biorklund A, Trope C, Willen R. Quantitation and localization of cellular retinol-binding protein in squamous-cell carcinomas of the cervix uteri and of the oral cavity. *Int J Cancer*. **41**:771-776, 1988.
- 78.- Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al: p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**:714-718, 1999.
- 79.- Quade BJ, Yang A, Wang Y, et al: Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* **80**:24-29, 2001.
- 80.- Wang T, Chen B, Yang Y, Chen H, Wang Y, Cviko A, Quade B, Sun D, Yang A, Mckeon F, Crum C. Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: A study of 250 cases. *Human Pathol*, **32**:479-486, 2001.

- 81.- Cho NH, Kim YB, Park TK, Kim GE, Park K, Song KJ. P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol*, **91**:346-353, 2003.
- 82.- Chen H, Toyooka S, Gazdar AF, Hsieh JT. Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (hDAB2IP) in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem*, **278**:3121-3130, 2003.
- 83.- Yang DH, Smith ER, Cohen C, Wu H, Patriotis C, Godwin AK, Hamilton TC, Xu XX. Molecular events associated with dysplastic morphologic transformation and initiation of ovarian tumorigenicity. *Cancer*. **94**:2380-2392, 2002.
- 84.- Sheng Z, Sun W, Smith E, Cohen C, Sheng Z, Xu XX. Restoration of positioning control following Disabled-2 expression in ovarian and breast tumor cells. *Oncogene*. **19**:4847-4854, 2000.
- 85.- Hocevar BA, Mou F, Rennolds JL, Morris SM, Cooper JA, Howe PH. Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). *EMBO J*, **22**:3084-3094, 2003.
- 86.- Huang LW, Chao SL, Chen TJ. Reduced Fhit expression in cervical carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Gynecol Oncol*, **90**:331-337, 2003.
- 87.- Butler D, Collins C, Mabruk M, Leader MB, Kay EW. Loss of Fhit expression as a potential marker of malignant progression in preinvasive squamous cervical cancer. *Gynecol Oncol*, **86**:144-149, 2002
- 88.- Takizawa S, Nakagawa S, Nakagawa K, Yasugi T, Fujii T, Kugu K, Yano T, Yoshikawa H, Taketani Y. Abnormal Fhit expression is an independent poor prognostic factor for cervical cancer. *Br J Cancer*, **88**:1213-1216, 2003.
- 89.- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*, **22**:1225-1237, 2003.

- 90.- De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*; **19**:3189-3199, 2004
- 91.- Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A, Leiman J, Ward D, Ish-Horowitz D, Artavanis-Tsakonas S. Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol*, **154**:785-794, 1999.
- 92.- Kurose K, Zhou XP, Araki T, Eng C. Biallelic inactivating mutations and an occult germline mutation of PTEN in primary cervical carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, **29**:166-172, 2000,
- 93.- Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, Thilak L, Robson CN, Neal DE, Leung HY. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene*, **22**:1381-1389, 2003.
- 94.- Kai M, Wang T. Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis. *Mutat Res*, **532**:59-73, 2003.
- 95.- Badaracco G, Venuti A, Sedati A, Marcante ML. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol*; **67**:574-582, 2002.
- 96.- Heselmayer K, Janz V, Castle P, Chaudhri N, White N, Wilber K, Morrison L, Auer G, Burroughs F, Sherman M, Ried T. Detection of genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in cytologic specimens as a genetic test for the diagnosis of cervical dysplasia. *Am J Pathol*, **163**:1405-1416, 2003.
- 97.- Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. *J Biol Chem*; **279**:32716-32727, 2004.
- 98.- Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J Biol Chem*; **277**:39655-39665, 2002.

- 99.- Chen Y, Riley DJ, Zheng L, Chen PL, Lee WH. Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J Biol Chem* **277**:49408-49416, 2002.
- 100.- Hutchins JR, Moore WJ, Hood FE, Wilson JS, Andrews PD, Swedlow JR, Clarke PR. Phosphorylation regulates the dynamic interaction of RCC1 with chromosomes during mitosis. *Curr Biol.* 2004; **14**:1099-104, 2004.
- 101.- Chen J, Fang G. MAD2B is an inhibitor of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*; **15**:1765-1770, 2001.
- 102.- Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, **82**:238-246, 2001
- 103.- Frattini M, Hurst S, Lim H, Swaminathan S, Laimins L. Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J*, **16**:318-331, 1997.
- 104.- Lee D, Kim H, Jeong K, Shim Y, Horikawa I, Barrett T, Choe J. Human papillomavirus E2 down-regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. *J Biol Chem*; **277**:27748-27756, 2002.
- 105.- Collins K, Mitchell J. Telomerase in the human organism. *Oncogene*; **21**:564-579, 2002
- 106.- Hackett J, Greider C. Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene*; **21**:619-626, 2002.
- 107.- Zhang DK, Ngan HY, Cheng RY, Cheung AN, Liu SS, Tsao SW. Clinical significance of telomerase activation and telomeric restriction fragment (TRF) in cervical cancer. *Eur J Cancer*; **35**:154-160, 1999.

- 108.- O'Sullivan JN, Finley JC, Risques RA, Shen WT, Gollahon KA, Moskovitz AH, Gryaznov S, Harley CB, Rabinovitch PS. Telomere length assessment in tissue sections by quantitative FISH: image analysis algorithms. *Cytometry*; **58A**:120-131, 2004.
- 109.- Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM, De Marzo AM. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res*; **10**:3317-3326, 2004.
- 110.- Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, Ide T, Utakoji T. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene*; **13**:433-439, 1996.
- 111.- Nakano K, Watney E, McDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. *Am J Pathol*; **153**:857-864, 1998.
- 112.- Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H. et al. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene*; **13**:433-439, 1996
- 113.- Liu K, Schoonmaker M, et al. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:5147-5152, 1999.
- 114.- Hiyama K, Iria Y, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol*, **155**:3711-3715, 1995.
- 115.- Masutomi K, Yu E, Khurts S, Et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*, **114**:241-253, 2003.
- 116.- Duensing S, Münger K. The Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Independently Induce Numerical and Structural Chromosome Instability. *Cancer Res*; **62**:7075-7082, 2002.
- 117.- d'Adda di Fagagna, Reaper P, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, **426**:194-198, 2003.

118.- Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence Induced by Altered Telomere State, Not Telomere Loss. *Science*, **295**:2446-2449, 2002.

119.- Zhang A, Wang J, Zheng B, Fang X, Angstrom T, Liu C, Li X, Erlandsson F, Bjorkholm M, Nordenskjord M, Gruber A, Wallin KL, Xu D. Telomere attrition predominantly occurs in precursor lesions during in vivo carcinogenic process of the uterine cervix. *Oncogene*, **23**:7441-7447, 2004.

120.- Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Clin Cáncer Res.* 10:3059-3063, 2004.