



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES Iztacala

ESTANDARIZACIÓN DEL USO DE MICROARREGLOS  
DE cDNA EN LA DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE  
ALGUNOS GENES RELACIONADOS CON APOPTOSIS EN  
CÁNCER CERVICO UTERINO (CaCU)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

**ELIZABETH ALVAREZ RIOS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL

LOS REYES Iztacala, EDO. MEX.

2004



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 fue realizada en el laboratorio 24 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN en México, D.F., bajo la dirección del Dr. Patricio Gariglio Vidal, con el financiamiento del CONACyT y el apoyo económico aportado por el Taller Eléctrico "Navarro" y "Aceros Corsa".

## DEDICATORIA

*A mis padres:*

*A ustedes dedico esta tesis que indica el término de muchos años de esfuerzo por dame una educación, por parte suya y mía.*

*Porque gracias a ustedes estoy hoy aquí y podré salir adelante en la vida por mí misma.*

*Porque sólo ustedes supieron soportarme en tantas y tantas ocasiones de tristeza, enojo, preocupación, depresión, alegría, amor, desamor y más.*

*Porque siempre han estado para apoyarme y se que seguirán ahí en cualquier momento.*

PAPAS POR TODO MUCHAS GRACIAS ¡LOS  
AMO!

A Jose Luis:

*T e agradezco el apoyo incondicional, orientación,  
consejos, amistad, respeto y todo lo demás que me has  
brindado.*

*Por aguantar todos mis cambios de ánimo sin quitar  
un solo dedo del renglón y dame tu hombro para librarme  
de los momentos más difíciles.*

*Simplemente por estar a mi lado compartiendo la  
vida.*

*¡ T E A M O !*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer sinceramente a aquellas personas que compartieron sus conocimientos conmigo para hacer posible la conclusión de esta tesis:

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Dr. Diego Arenas Aranda

Dr. Sergio Vaca Pacheco

M en C. Irma Elena Dueñas García

M en C. Laura Castañeda Partida

Muy especialmente al QBP Rodolfo Ocadiz Delgado (Wilox) por todas sus enseñanzas no solo para la realización de esta tesis.

Al Biol. Enrique García Villa por tus observaciones y consejos.

Al QFB. Alberto Marroquín Chavira por sus consejos y enseñarme a hacer las cosas bajo presión.

A la técnica de laboratorio Guadalupe Villasana Hernández por su apoyo con el material requerido y limpiar el horno de microondas.

## AGRADECIMIENTOS

A Lian (China) gracias por tu amistad incondicional, son tantas las cosas, los momentos que hemos vivido juntas, los secretos mutuos, las enseñanzas y más que solo te puedo decir: ¡siempre haremos el Megapaso!

A Adrian tu amistad a significado mucho para mi porque estamos juntos desde el primer semestre y aunque no hemos estado siempre juntos sabemos que seguimos siendo amigos y recuerda no saltar antes que yo.

A mis amigas Claudia, Julia, Pris, Ana y Ale, por apoyarme en situaciones difíciles y compartir muchos momentos muy importantes a lo largo de estos años que quedarán en mi corazón para toda la vida ¡Gracias!.

A mis amigos Victor (mi Amiguito de la tele), ¡solo es un papel!, Victor (Chaq), Juan Carlos (Oso), Horacio (Choro), Pablo, Ivan, Gerardo (Pequeñín), Jesús (Chucho), Marcos (Marquitos) y Roberto (Robert) gracias por su amistad y porque gracias a ustedes tengo mucho que contar a mis nietos

A José por toda la ayuda que me brindaste para poder terminar esta tesis y por supuesto los momentos de diversión que hemos pasado.

A mis amigos del laboratorio Cesar y Toño por las aventuras que hemos compartido.

A Alfredo (pirañiño) gracias por tus palabras de aliento.

Y a todas aquellas personas que a lo largo de tantos años de estudio han estado involucrados en una parte importante de mi vida, siempre los recordaré con mucho cariño.

# ÍNDICE

	Página
<b>Resumen</b> .....	i
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Microarreglos.....	1
1.2 Fabricación de microarreglos.....	4
1.3 Fuentes para blancos de ADN.....	8
1.4 Blancos control.....	8
1.5 Hibridación.....	9
1.6 Bioinformática.....	10
1.7 Sistema para el manejo de información.....	11
1.8 Análisis de la imagen.....	11
1.9 Perfiles de expresión.....	12
1.10 Cáncer.....	12
1.11 Apoptosis.....	14
1.12 Protooncogenes y antioncogenes.....	15
1.13 Genes supresores de tumor o antioncogenes.....	16
1.14 Queratinocitos.....	17
<b>2. Antecedentes</b> .....	18
<b>3. Objetivos</b> .....	21
3.1 General.....	21
3.2 Particulares.....	21
<b>4. Justificación</b> .....	21
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	22
5.1 Líneas celulares.....	22
5.2 Extracción del ARN total.....	22
5.3 Síntesis del ADNc.....	23
5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
5.5 Microarreglos de ADNc.....	25
5.6 Fabricación de microarreglos.....	30
<b>6. Resultados</b> .....	32
6.1 Obtención de ARN.....	32
6.2 Síntesis de ADNc.....	32
6.3 RT-PCR's <i>in vitro</i> .....	34
6.4 Marcado de la sonda.....	35
6.5 Hibridación de los microarreglos comerciales.....	35
6.6 Fabricación de microarreglos.....	37
<b>7. Discusión</b> .....	43
7.1 RT-PCR's.....	43
7.2 Extracción del ARN.....	45
7.3 Síntesis del ADNc.....	45
7.4 Hibridación.....	46
7.5 Fabricación de microarreglos.....	46
7.6 Solventes de impresión.....	47
7.7 Inmovilización o fijado del blanco.....	48
7.8 Lavados post-impresión.....	48
7.9 Control de calidad.....	48
<b>8. Conclusiones</b> .....	49
<b>9. Perspectivas</b> .....	50
<b>10. Bibliografía</b> .....	51
<b>11. Apéndice</b> .....	60



## **RESUMEN**

En el transcurso del desarrollo de la Biología Molecular se ha logrado clonar y caracterizar genes involucrados en importantes procesos celulares y enfermedades; así como también determinar el papel etiopatogenético que desempeñan ciertos virus, como el Virus del Papiloma Humano (HPV). El esfuerzo por desarrollar tecnologías de punta como son los Microarreglos de ADN y ADNc, será de gran utilidad para la secuenciación de genomas de diverso origen, para la determinación de mutaciones en enfermedades como el cáncer cérvico-uterino (CaCU), el análisis de perfiles de expresión en carcinogénesis y diagnóstico molecular. En México, como en el resto del mundo, existen enfermedades que constituyen graves problemas socioeconómicos y de salud pública; una de ellas, por su alta incidencia en nuestro país, es el CaCU en el cual se estima que más de un 60% de mortandad es ocasionada por una falta de detección temprana. Es de suma importancia el desarrollar y establecer tecnología de vanguardia para determinar de manera precisa y rápida, las alteraciones de expresión de genes relacionados con eventos celulares importantes que lleven a desarrollar este tipo de enfermedades.

Los estudios iniciales se han desarrollado a partir de queratinocitos inmortalizados con los oncogenes virales E6 y E7 del HPV. En este trabajo se purificó ARN total analizándose la expresión de algunos genes de interés mediante RT-PCR semicuantitativo. Posteriormente se establecieron las condiciones para la fabricación de Microarreglos y finalmente se estandarizaron las condiciones de hibridación con microarreglos de cDNA comerciales.

Con el presente estudio quedan establecidas las bases para un protocolo de experimentación utilizando Microarreglos de ADNc, desde la fabricación hasta la obtención de la imagen.

## 1. INTRODUCCIÓN

Para entender el desarrollo de un organismo, el comienzo de alguna enfermedad genética o las funciones celulares, el mejor procedimiento es dar seguimiento a las actividades de los genes y sus productos en diferentes tejidos y en diferentes etapas de desarrollo bajo condiciones normales (salud) o alteradas (enfermedad). A la fecha no se conocen muchos de los mecanismos que controlan una sola función celular.

La técnica de Microarreglos de Ácido Desoxirribonucleico complementario (ADNc) ofrece el mejor camino para aproximarnos a cumplir esa tarea. Esta tecnología se ha desarrollado en los últimos 10 años y cambia día con día, indicando el desarrollo de una herramienta útil para las investigaciones en biología molecular y el diagnóstico clínico (Xiang y Chen, 2000).

Con esta tecnología es posible medir la expresión de cientos y/o miles de genes simultáneamente proporcionando gran información sobre las funciones e interacciones de un gen dado, también permite monitorear un perfil de expresión completo (diversos genes) en condiciones normales y en respuesta a agentes farmacológicos específicos, proporcionando la información de toxicidad y eficacia de una droga en diferentes fenotipos celulares o en diferentes etapas de desarrollo, análisis de enfermedades relacionadas al genoma, identificación de desórdenes cromosomales, estudios de mutaciones, polimorfismos genéticos, entre otros (Hegde *et al.*, 2000; Buchholz *et al.*, 2001; Katsuma y Tsujimoto, 2001; Ness y Woodworth, 2001).

Recientemente se ha desarrollado una gran variedad de técnicas que permiten la evaluación a gran escala de la expresión del Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm) en paralelo con cientos y/o miles de genes. Estas técnicas incluyen: Análisis Serial de Expresión Génica (SAGE), Patrón de expresión Diferencial (Differential Display, DD); Arreglos de oligonucleótidos y Microarreglos de ADNc. Para un análisis de expresión usando microarreglos de ADNc se requiere del desarrollo e implementación exitosa de una gran variedad de protocolos y estrategias de laboratorio (Schena *et al.*, 1995).

### 1.1 MICROARREGLOS

Un microarreglo consiste de un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos (oligonucleótidos, ADN, ADNc, etc.) inmovilizadas sobre un soporte sólido en el cual cada una de éstas son llamadas "spot" o "blanco". Estas secuencias pueden provenir de diversas fuentes (cultivos celulares, muestras de pacientes, etc.) y se utilizan diferentes métodos para la "impresión" sobre el soporte sólido. El tamaño de los spots varía de un sistema a otro, obteniendo diámetros desde 80 micras. La superficie más comúnmente utilizada es una laminilla de vidrio que actúa como un soporte sólido para la impresión de cientos o miles de "spots" (cada uno de los

puntos impresos en el microarreglo), de tal manera que puedan ser ordenados dentro del área total de unos pocos centímetros (Figura 1).

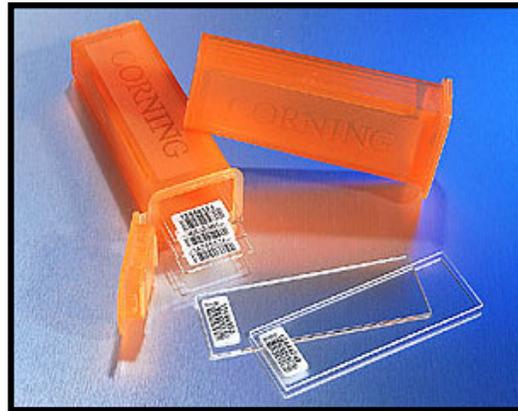


Figura 1. UltraGAPS™ Coated Slides. Laminillas de vidrio (Corning™). Tomada de [www.corning.com](http://www.corning.com)

Los términos de “sondas” y “blancos” son usados arbitrariamente para describir la muestra marcada o las secuencias inmovilizadas según el grupo de trabajo. Para el presente trabajo se usará “blanco” como las secuencias inmovilizadas sobre el vidrio y como “sonda” la muestra marcada fluorescentemente (Figura 2).

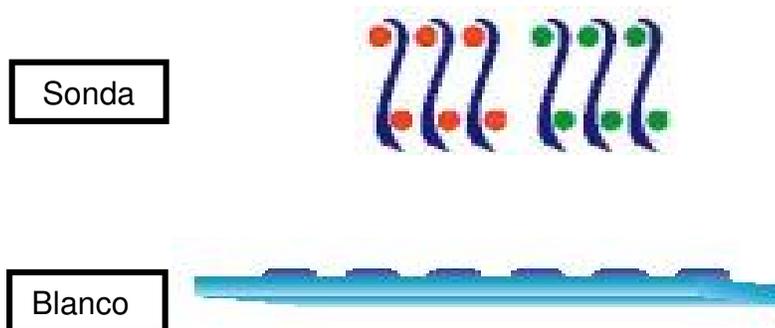


Figura 2. Terminología más comúnmente usada en Microarreglos. Tomada de <http://stanford.edu>

El proceso de análisis utilizando microarreglos se puede resumir básicamente en 3 etapas principales: a) la fabricación del arreglo el cual contiene

las secuencias de ácidos nucleicos inmovilizadas o blancos, b) el marcado de una o más muestras fluorescentemente o sondas, las cuales son hibridadas con el microarreglo, c) un sistema de detección que cuantifica la señal de hibridación y el análisis (Figura 3).

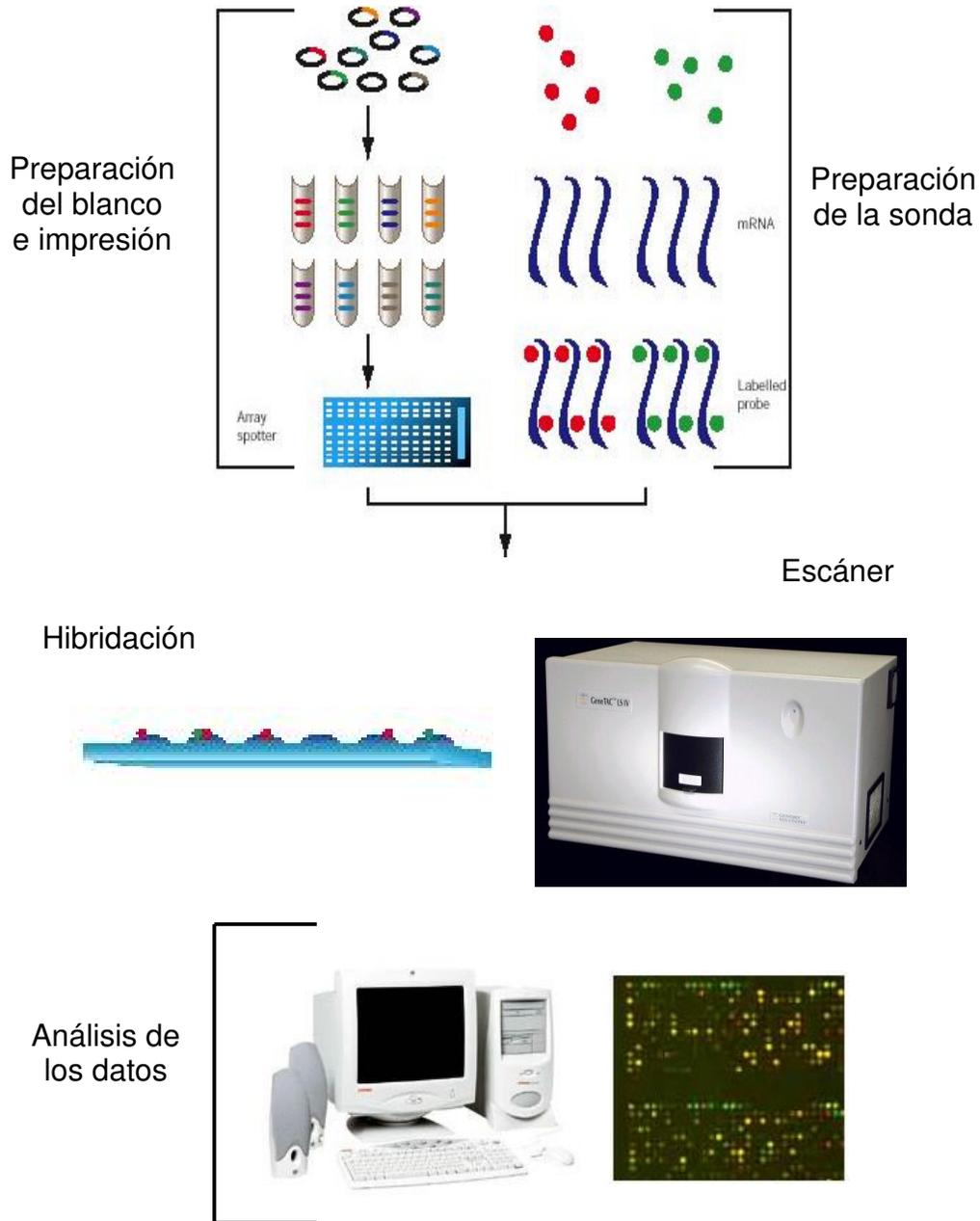


Figura 3. Etapas realizadas durante el proceso del análisis de expresión utilizando microarreglos de ADNc. Tomada de <http://stanford.edu>

Los colorantes fluorescentes y especialmente las cianinas Cy3 y Cy5 han sido adoptadas como marcadores predominantes en experimentos de microarreglos. La fluorescencia tiene la ventaja que nos permite la detección de dos o más señales diferentes en un experimento. Esto ha permitido a los investigadores realizar experimentos comparativos de dos o más muestras en un microarreglo, lo cual también incrementa la eficiencia y precisión del análisis de microarreglos sobre macroarreglos basados en filtros, en los cuales únicamente una muestra es marcada radioactivamente y analizada a un tiempo.

En una hibridación, se espera que la sonda forme un híbrido específico con su blanco complementario inmovilizado, lo cual requiere que las secuencias sean de cadena sencilla siendo accesibles para su correspondiente secuencia. El número de híbridos que se forman refleja el número relativo de cada fragmento específico con la sonda. Pueden ser hibridadas dos o más muestras marcadas con diferente fluorescencia simultáneamente, dando como resultado una hibridación simultánea con su spot y/o blanco. Cuantificando las diferentes intensidades de las señales de fluorescencia asociadas con cada spot, se puede determinar la abundancia de secuencias específicas para cada una de las muestras.

El sistema de detección o “escáner” de microarreglos contiene diferentes rayos láser que emiten luz a longitudes de onda que son convenientes para la excitación del colorante fluorescente usado como marcador. A pesar de su pequeño tamaño, los microarreglos generan una gran cantidad de datos en un solo experimento. Un experimento clásico puede involucrar el uso de varias muestras analizadas por repetición; lo que hace necesario el uso de procesadores de datos computarizados para manejar la cantidad de datos generados y para aprovechar al máximo la información del experimento. Esto puede ser realizado por un software especializado el cual extrae los datos primarios de la imagen del microarreglo, normalizando estos datos para eliminar la influencia de variación experimental “señal de fondo” (background) y finalmente manipular los datos para la elaboración de las conclusiones.

## **1.2 FABRICACIÓN DE MICROARREGLOS**

En general los microarreglos contienen fragmentos relativamente largos de ADNc, depositados físicamente en pequeñas cantidades en ubicaciones predeterminadas sobre superficies de vidrio (DeRisi *et al.*, 1997; Schena *et al.*, 1995) o membranas de nylon (Nguyen *et al.*, 1995; Piétu *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1995) las cuales son más comúnmente usadas además de otros soportes. Se inicia con la selección de las secuencias que serán impresas en el arreglo y que previamente pueden ser amplificadas mediante PCR (Xiang y Chen, 2000). En muchos casos los blancos son seleccionados directamente de una base de datos como son: UniGene del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y

el Índice Genético Humano (HGI) del Instituto de Investigaciones Genómicas (TIGR) (Hedge *et al.*, 2000). Generalmente los microarreglos son fabricados en laminillas de vidrio cubiertas con poli-L-lisina o aminosilano. Los fragmentos de ADNc son fijados aproximadamente a 300 mJ entrecruzando con luz ultra violeta (UV); a la superficie de vidrio previamente tratada, posteriormente se lavan con anhídrido succínico para eliminar las aminos restantes y reducir las cargas positivas sobre la superficie (Xiang y Chen, 2000).

Durante la impresión, se transfieren volúmenes pequeños de ácidos nucleicos en solución a la laminilla de vidrio. La unión química involucra una reacción entre los grupos de la superficie de la laminilla y el ácido nucleico lo que da como resultado la formación de enlaces covalentes entre ambos. Una de estas uniones se lleva a cabo entre oligonucleótidos modificados en su extremo amino y laminillas tratadas con grupos aldehídos. Otra forma es la derivación de grupos fosfato 5' con imidazol seguidas por una reacción con las aminos de la laminilla previamente tratada (Watson *et al.*, 1998).

El proceso para depositar las secuencias fue originalmente descrito por Patrick Brown y colaboradores en la Universidad de Stanford (Schena *et al.*, 1995) y es utilizado por algunas compañías comerciales para su venta (Xiang y Chen, 2000; Hedge *et al.*, 2000).

Diferentes técnicas se han desarrollado para el proceso de impresión, por lo que es muy importante tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- a) El tamaño del “spot” y la densidad. Estos deben ser pequeños y distinguibles entre ellos, deben ser depositados en base a un modelo en particular y con las mismas distancias entre cada “spot”.
- b) La reproducibilidad del “spot”. Los “spots” deben ser de tamaños y formas iguales y contener las mismas cantidades de ácidos nucleicos, para lo cual se requiere de una calibración precisa de cada una de las puntas de impresión y en conjunto en el brazo del robot.
- c) El control ambiental. Las condiciones ambientales pueden tener un efecto significativo en la calidad de las laminillas impresas. Un ambiente limpio es importante ya que las partículas como el polvo, pueden quedar fijadas en las laminillas, causando señales de fondo durante la hibridación o de señal de algún “spot” durante el análisis de los datos. El controlar la humedad ayuda a evitar cambios en las concentraciones y la evaporación durante el transporte de la muestra para la impresión o sobre la superficie de ellas. Niveles altos de humedad pueden causar manchas en lugar de “spots” y niveles bajos pueden causar evaporación de las muestras en la placa. En condiciones altas de temperatura los blancos pueden secarse rápidamente en los contornos causando una baja uniformidad del spot. Este efecto puede causar un spot en forma de dona. Se ha

demostrado que una humedad entre 20-50% es conveniente para la fabricación de un microarreglo.

d) El sobrante de la muestra. No deben mezclarse los sobrantes de una impresión a otra.

e) El proceso de impresión debe ser rápido para permitir oportunas impresiones de laminillas. Debe ser considerado el tiempo total necesario para la toma de muestras, impresión y lavados de las puntas del robot.

Para la impresión se utilizan puntas diseñadas con características específicas como son, sólidas, huecas o abiertas para transferir las muestras blanco a las laminillas. Estas puntas son colocadas sobre la solución blanco la cual se va adherir a la punta en una pequeña cantidad. Cuando la punta se pone en contacto con la superficie de la laminilla, una fracción de la solución tomada es depositada sobre la superficie. Una buena muestra tomada por la punta permite la impresión de varios "spots". Para obtener altos rendimientos, varias puntas son usadas simultáneamente, cada una de las cuales deposita una muestra diferente. La impresión por contacto requiere de menor cantidad de solución blanco que los métodos de no contacto y también los "spots" resultan más pequeños que pueden ser colocados con una mayor densidad en la superficie del microarreglo.

Las laminillas para microarreglos más comúnmente usadas como soportes son porta objetos de vidrio para microscopio, los cuales ofrecen una superficie lisa y rígida que emite baja fluorescencia de fondo. Tomando en cuenta las diferencias entre la diversidad de fabricantes y casas comerciales. Se recomienda un cuidadoso análisis de las laminillas antes de ser usadas para la impresión, además de así asegurar que se encuentre perfectamente limpias.

La química de la superficie de la laminilla es muy importante ya que no habrá una unión eficiente de los ácidos nucleicos a una laminilla no tratada químicamente. Se han diferenciado estrategias químicas para tratar superficies para facilitar la unión de los blancos a la laminilla. Estos tratamientos permiten no únicamente la unión eficiente de los blancos, también determinan la densidad de las moléculas que pueden ser adheridas por unidad de superficie.

La uniformidad y espesor de la superficie cubierta es crítica para obtener resultados de buena calidad lo que influye también en la uniformidad y morfología del "spot", unión del ADN y en las señales de fondo. La diversidad en los recubrimientos de las laminillas puede contribuir a la variación de las señales y disminución de la resolución de un experimento de microarreglo. El recubrimiento incorrecto de la laminilla puede provocar la unión deficiente del ácido nucleico depositado, el cual se puede perder durante el proceso de hibridación.

Comúnmente se utilizan laminillas con modificaciones en la superficie incluyendo la introducción de grupos aldehídos, aminos o poli-lisinas. Las

laminillas con aminosilano permiten la obtención de datos consistentes y reproducibles resultando más favorables en el uso de experimentos con microarreglos.

Los grupos amino pueden ser introducidos a las laminillas por tratamiento del vidrio limpio con aminosilano, como el 3-aminopropil-trimetoxi-silano. El tratamiento con vapor proporciona mejores resultados que el método en el cual se sumerjan las laminillas (Worley *et al.*, 2000). El ADN puede ser unido a laminillas modificadas con grupos amino por medio de las interacciones entre las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN y las cargas positivas de la superficie de la laminilla. Estas interacciones ayudan a asegurar la desnaturalización del ADN así como a incrementar la afinidad de unión a la superficie. Los tratamientos con UV pueden ser usados para fortalecer la inmovilización del ADN sobre la superficie. La unión por medio de interacciones electrostáticas es conveniente para la unión de fragmentos mayores de 60-70 nucleótidos (Watson *et al.*, 1998) (Figura 4).

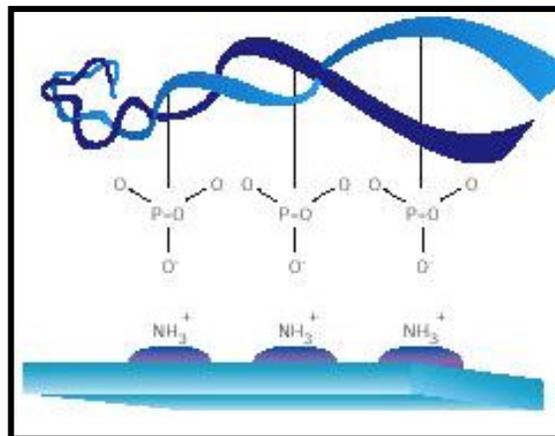


Figura 4. Unión del ADN a una superficie tratada con grupos aminos. Tomada de Ettan DIGE. User Manual.

Los blancos para microarreglos deben ser manipulados a partir de una solución con altas concentraciones de la muestra para permitir que un número suficiente de moléculas sean depositadas en la laminilla. La pureza de las soluciones blanco es importante para la eficiencia de unión de los ácidos nucleicos y para su disponibilidad durante la hibridación. Los blancos amplificados mediante PCR deben ser purificados previamente para eliminar el exceso de dNTP's, oligos, ADN polimerasa, buffers y detergentes. Algunos métodos de cromatografía en columna son convenientes para este propósito (Rowland, 2002; Alazawi *et al.*, 2002; Hanash *et al.*, 2002)

Los blancos, unidos a la superficie, están disponibles para la hibridación únicamente cuando son presentadas en una forma desnaturalizada o de cadena sencilla. Esto puede ser logrado por impresión de los blancos previamente desnaturalizados. Los blancos deben ser disueltos en soluciones conteniendo sal como por ejemplo SSC 3X (ver apéndice), o en solventes desnaturalizantes tales como el DMSO (Dimetil sulfóxido).

En conclusión, los factores críticos para el éxito de la fabricación de un microarreglos son:

- Siempre limpiar manualmente las laminillas en un ambiente estéril.
- No usar guantes que contengan polvo como el talco el cual invariablemente causará señales de fondo.
- Nunca tocar el área del arreglo, únicamente manipular las laminillas por los costados.
- Utilizar únicamente portaobjetos de microscopio con poca fluorescencia para la fabricación de microarreglos.
- Limpiar las laminillas perfectamente antes de aplicar el tratamiento seleccionado.
- Verificar la pureza y concentración de los blancos antes de usarse en la impresión.
- Manipular las placas de los blancos con cuidado para evitar la evaporación de las muestras o la mezcla entre ellas.
- Seguir cuidadosamente las instrucciones proporcionadas por los fabricantes del robot.
- Asegurarse que la impresión se realice bajo las condiciones óptimas de humedad y temperatura.
- Las laminillas para microarreglos tienen una vida media. Preparar las laminillas según se utilicen.
- Siempre almacenar las laminillas en un desecador y protegidas de la luz.

### **1.3 FUENTES PARA BLANCOS DE ADN**

Los fragmentos de ácidos nucleicos usados para la construcción de microarreglos pueden ser obtenidos de diversas fuentes. Para microarreglos de expresión genética los fragmentos son obtenidos de clonas de ADNc, o amplificadas de secuencias exónicas. Se han utilizado como fuentes de blancos las bibliotecas de clonas de ADNc, secuencias expresadas marcadas (EST's) o fragmentos amplificados mediante PCR correspondientes al marco de lectura abierto (ORF's) (Welford *et al.*, 1998; Penn *et al.*, 2000). Es necesario tener la información acerca de las secuencias que serán utilizadas en microarreglos. Si la secuencia de ADN es conocida, es posible seleccionar el área del ADNc que hibrida con mayor especificidad para secuencias derivadas de un mismo gen con el propósito de evitar que hibride con otras secuencias relacionadas. Muchas

secuencias desconocidas pueden también contener elementos genómicos repetitivos que pueden comprometer la especificidad de la hibridación.

#### **1.4 BLANCOS CONTROL**

El análisis de un experimento de microarreglo es un proceso complejo, eso hace necesario el uso de controles efectivos durante todo el procedimiento. Para microarreglos de expresión genética, las señales de hibridación son influenciadas por una variedad de factores, incluyendo el número de transcritos específicos en las muestras marcadas, el método de marcado, las propiedades de las puntas de impresión, las condiciones de hibridación y la superficie química de la laminilla. Además, la variación en las señales es observada no únicamente entre las diferentes laminillas sino también entre las diferentes réplicas blanco impresas en diferentes ubicaciones de la laminilla del microarreglo. Es sumamente importante tomar esto en cuenta para poder ser capaces de establecer las conclusiones y para la validación de los resultados. Las secuencias control incluidas en un experimento son los factores clave para ayudar en esas funciones.

Se han ideado diferentes estrategias como propuestas de control en un microarreglo. Éstas incluyen el uso de secuencias exógenas en cantidades conocidas (Shena *et al.*, 1996; Schuchhardt *et al.*, 2000) y genes con una expresión basal en condiciones normales o “housekeeping” (Yamanaka, 2001).

Para obtener el máximo de información sobre la calidad de los microarreglos, se utilizan controles positivos, negativos, de proporción, de rango dinámico y normalización. Dado que una hibridación utilizando microarreglos involucra miles de fragmentos de ácidos nucleicos, es importante que las secuencias usadas como controles sean seleccionadas y probadas funcionalmente para evitar uniones o hibridaciones inespecíficas. Por otro lado los controles negativos son necesarios para representar secuencias de ácidos nucleicos capaces de capturar eventos de hibridaciones al azar. Los “spots” vacíos o “negros” que no contienen ADN son usados también como controles negativos.

El uso de oligonucleótidos como blancos permite la utilización de sus secuencias complementarias como controles; para comparar las señales adecuadas con la secuencia complementaria, la confiabilidad de cada señal puede ser valorada individualmente (Lockhart *et al.*, 1996).

#### **1.5 HIBRIDACIÓN**

El proceso de hibridación es realizado para identificar y cuantificar ácidos nucleicos en una muestra. Generalmente esto involucra la alineación de un ácido nucleico de cadena sencilla con una secuencia complementaria o blanco. La unión de la secuencia y la intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de muestra inmovilizada. Algunos factores que son críticos para elaborar una

hibridación exitosa son: a) pre-hibridación, b) condiciones de hibridación, c) buffer de hibridación y d) astringencia de los lavados.

Podemos resumir el proceso de hibridación en 3 pasos críticos (Figura 5):

1) El buffer de hibridación, el cual contiene cantidades conocidas de la sonda marcada, es colocado en la superficie de la laminilla donde se encuentra el área del arreglo.

2) La laminilla se incuba en un ambiente húmedo durante más de 16 horas (toda la noche). En este tiempo la sonda entra en contacto con el blanco. Si la secuencia de la sonda es homóloga a la del blanco entonces habrá una buena hibridación.

3) Los lavados que se realizan a las laminillas al concluir el tiempo indicado son útiles para eliminar el buffer así como las sondas no hibridadas; dejando así solamente las sondas alineadas con su respectivo blanco para permitir la detección.

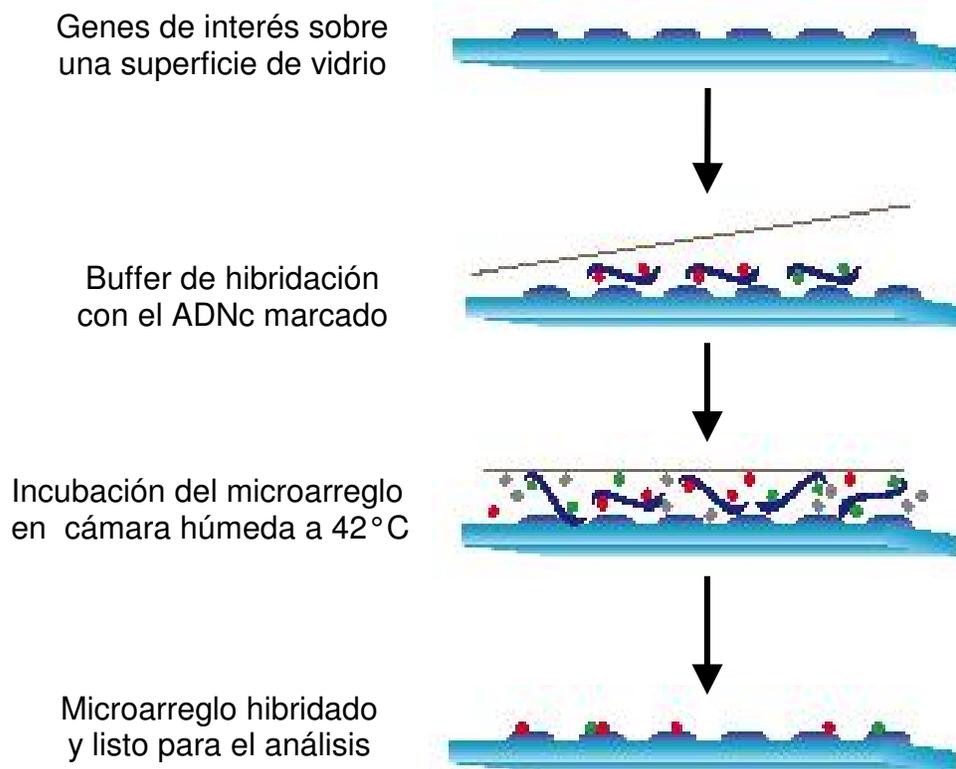


Figura 5. Proceso de hibridación de un Microarreglo.  
Tomada de <http://stanford.edu>

## 1.6 BIOINFORMÁTICA

Durante las primeras etapas del desarrollo de la tecnología de microarreglos, mucho del interés se enfocó hacia el establecimiento de una tecnología que fuera capaz de realizar un análisis de expresión genética a mayor escala que las convencionales, como son: Análisis Serial de Expresión Genética o SAGE (del inglés; Serial Analysis of Gene Expression), arreglos de oligonucleótidos y arreglos de ADNc. Al mismo tiempo, muy poco de este interés se dirigió hacia desarrollar un método para el análisis e interpretación de los datos que proporcionaban esas técnicas. Quizá una de las razones fue la misma insuficiencia de datos experimentales de ese tipo. Con la introducción de la tecnología de Microarreglos los genetistas se enfrentan a una rápida evolución en el manejo de la bioinformática y no únicamente a los problemas asociados con el mapeo y secuenciación de genes. También se enfrentan con el manejo de grandes cantidades de datos que son generados en paralelo por otras tecnologías de monitoreo de expresión genética.

Actualmente, con los avances en tecnología genómica; las publicaciones realizadas en investigaciones biomédicas han enfocado su atención hacia aspectos funcionales de cientos de genes en lugar de un solo gen. La comunidad de “bioinformáticos” se enfrenta ahora al reto del estudio de expresión genética dentro de los cuales se incluye: 1) el manejo de la información de laboratorio, 2) análisis de la imagen de microarreglos, 3) análisis de perfiles de expresión de

genes, 4) clasificación de patrones de expresión (huellas genéticas) y 5) un sistema control de alto nivel de análisis del producto (del inglés high-level control system modeling issues)( Xiang y Chen, 2000).

### **1.7 SISTEMA PARA EL MANEJO DE INFORMACIÓN**

La meta principal del sistema de manejo de información de laboratorio (LIMS) es la de manejar y encaminar toda la información de experimentos para su disponibilidad a los usuarios y facilitar así su consulta. El “Array DataBase” (ArrayDB) (<http://www.ngfri.nih.gov/DIR/LCG/15K/HTML9>) fue desarrollado para almacenar, consultar y analizar la información de diversos experimentos con microarreglos. Para cada experimento la información elemental en la base de datos es: 1) la información acerca de los microarreglos y la especificidad de las clonas de ADNc ( ID de la clona, nombre, hipervínculo, etc.), 2) información acerca de las sondas (fuente, condiciones para el experimento, tipo de marcador, etc.), 3) información acerca de la imagen (escaneo, intensidad y proporción de cada clona blanco, etc.). Otra meta del ArrayDB es identificar patrones y relaciones entre intensidad y proporción, individuales y en experimentos múltiples cruzados. Además, la opción de consultar datos asociados con experimentos de microarreglos de Internet adiciona la posibilidad del análisis de datos del experimento del usuario.

### **1.8 ANÁLISIS DE LA IMAGEN**

El objetivo del análisis de la imagen del microarreglo es extraer la intensidad o proporción de fluorescencia de la sonda hibridada correspondiente a la ubicación de cada blanco de ADNc; así, los investigadores pueden inicialmente hacer una interpretación parcial del resultado para posteriormente realizar un análisis de alto nivel. La forma típica de análisis consiste en la detección del blanco, segmentación del ADNc, medir la intensidad del fondo y la fluorescencia de la sonda, análisis de la proporción y finalmente la visualización de los datos. La clave para el éxito del análisis de una sola laminilla es la medición y proporción de la expresión entre las muestras y la selección de un grupo de genes con una expresión basal en condiciones normales o “housekeeping” para la normalización, la cual consiste en disminuir la variación experimental.

### **1.9 PERFILES DE EXPRESIÓN**

El proceso de análisis con programas de computación diseñados para un microarreglo es suficiente para la obtención de un patrón de expresión. Para algunos otros experimentos, como el monitoreo de cambios temporales de un patrón de expresión genética, favorece el estudio de interacciones biológicas entre genes de un organismo, para entender el mecanismo de comportamiento de expresión del gen en uno o diferentes tipos celulares.

El primer paso para el análisis de los datos es llamado a menudo “exploración de los datos” en el cual cualquier patrón al azar o perfil requiere otra exploración más detallada y consciente. El agrupamiento ó “clustering” es una de las técnicas en la cual los datos de interés son colocados dentro de un pequeño número de grupos homogéneos o grupos “clusters”. Para estudiar el orden de las líneas de los datos de expresión, la técnica de escala multidimensional (del inglés Multidimensional Scaling, MDS) es usada comúnmente para la visualización de muestras biológicas similares. El agrupamiento jerárquico que un investigador puede utilizar es según sus objetivos, respecto a las secuencias estudiadas es utilizada principalmente para muchos experimentos de microarreglos como método de visualización y análisis (Hedge *et al.*, 2000).

## **1.10 CÁNCER**

Después de un cuarto de siglo de grandes adelantos, las investigaciones en cáncer han generado una amplia y compleja cantidad de información, revelando que el cáncer es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma (Hanahan y Weinberg, 2000).

El cáncer se origina cuando clonas de células mutadas sobreviven y proliferan en forma inapropiada, rompiéndose el balance entre la proliferación celular y la apoptosis (muerte celular programada y genéticamente controlada). En los últimos 5 años, la investigación en cáncer ha producido avances notables en el conocimiento de la biología y la genética de la célula cancerosa. Entre los logros más importantes está el tomar conciencia de que la apoptosis y los genes que la controlan juegan un papel fundamental en el desarrollo de un tumor maligno. Algunos oncogenes inhiben vías apoptóticas y favorecen la progresión de una neoplasia. Otros oncogenes incrementan los procesos apoptóticos, lo cual establece una presión selectiva para que en una célula se introduzca una segunda mutación y escape a la apoptosis durante la carcinogénesis. Las versiones normales de los oncogenes (o protooncogenes) regulan positivamente el crecimiento y la división de las células en tanto que los antioncogenes inhiben estos procesos. Frecuentemente el cáncer es iniciado por agentes ambientales que causan mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumor (antioncogenes), o incluso en genes involucrados en la reparación del daño al ADN. En etapas sucesivas se alteran y/o desregulan transcripcionalmente genes relacionados con ciclo celular, inmortalización, estabilidad genómica, apoptosis, invasión, angiogénesis y metástasis. En otras palabras, el cáncer tiene un origen genético y en su desarrollo participan varios genes que van llevando a la invasión gradual de uno o varios tejidos del paciente. Hace muy poco tiempo se descubrió que tanto los oncogenes (por ejemplo c-myc, ras, bcl-2) como los antioncogenes más estudiados (rb, p53) participan activamente en apoptosis. Para que un tumor maligno se desarrolle, deben mutar 4-5 genes que controlan el crecimiento. Adicionalmente, en algunas neoplasias intervienen oncogenes virales, como por ejemplo los oncogenes de los papilomavirus humanos (HPV) de alto riesgo en cáncer cérvico uterino (CaCU). Hay evidencias que indican que la mayoría de los

compuestos citotóxicos empleados en la clínica para combatir el cáncer son inductores de la apoptosis, lo cual lleva a pensar que una falla en el tratamiento quimioterapéutico puede ser debida a un defecto en alguna vía apoptótica. En este momento el conocimiento de las bases moleculares del cáncer es enorme y esto hace posible el diseño de nuevas estrategias preventivas, de diagnóstico y de terapia molecular. La mayoría de estas estrategias considera la inducción de la apoptosis de las células malignas como un evento fundamental (Ames *et al.*, 1990; Bieche y Lidereau, 1995; Damm, 1993; Gariglio y Rangel, 2003; Giaccone, 1996; Leake, 1996; Murray y Kirschner, 1991; Weinberg, 1995).

El estado actual de los estudios y descubrimientos en oncología molecular es fascinante y de gran importancia médica. En particular en los últimos 5 años se ha determinado que la inhibición de los mecanismos apoptóticos puede representar una clave importante para entender el crecimiento tumoral y para desarrollar estrategias de terapia molecular. Un entendimiento del cáncer a nivel molecular es un requisito importante no sólo para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y para el diseño de métodos terapéuticos más efectivos, sino también en el establecimiento de medidas preventivas con sólidos fundamentos científicos (Gariglio y Rangel, 2003; Stanbridge, 1992).

En los países en desarrollo como México, se está observando una transición epidemiológica curiosa; aumentan rápidamente las enfermedades frecuentes de los países desarrollados, como el cáncer, pero no disminuyen con igual rapidez las enfermedades características del subdesarrollo (Gariglio y Rangel, 2003; Picconi *et al.*, 2000). En México, el cáncer representa un serio problema socioeconómico y de salud; ocupa el segundo lugar como causa de muerte en la población, mostrando una tendencia ascendente (Cisneros *et al.*, 1987). El tipo histológico más común es de la variedad epidermoide y contribuyó con el 89% del total (Carrada-Bravo, 1987, Lizano y García-Carrancá, 1997). En particular, el cáncer cérvico uterino es el más frecuente, en el año 2000 a nivel nacional se tuvieron 2,326,627 detecciones, de los cuales 10,852 se están controlando (Gariglio y Rangel, 2003; Lizano, 1997). Para el año 2001 se tienen registrados 3304 casos nuevos (Epidemiología, 2001). Solamente en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México se presentan cada año más de 850 casos nuevos (Mohar *et al.*, 1999). En los casos de detección del HPV a nivel nacional se tiene registrada una tasa de 13.67 por 100 000 habitantes, lo que es igual a 13,802 casos en el 2001 (Epidemiología, 2001).

El desarrollo del CaCU está estrechamente relacionado con las infecciones persistentes que producen algunos tipos de virus del papiloma humano (HPV), conocidos como HPV de alto riesgo. A la fecha se han identificado casi 200 variantes distintas de HPV; de las 100 variantes clasificadas hasta ahora, cerca de la tercera parte infecta las regiones genitales (Zur Hausen, 1996). Los HPV se han clasificado en cutáneos y mucosos de acuerdo al sitio preferencial de la lesión en tipos de alto, mediano y bajo riesgo con base a su potencial oncogénico (Disaia y Creasman, 1994). Los HPV de alto riesgo se asocian de manera directa con el

desarrollo de las neoplasias genitales, en particular los tipos 16 y 18, ya que se encuentran en más del 70% de todos los tumores cervicales (Bosch *et al.*, 1996; Berumen *et al.*, 1994; Berumen *et al.*, 1997; Gariglio *et al.*, 1998) y junto con los tipos 31, 33, 35, 45 y 58 alcanzan más del 95% de ellos. Además, existen variantes moleculares de HPV que parecen ser más agresivos y tener diferentes comportamientos biológicos, incluyendo el desarrollo del CaCU en pacientes jóvenes (Berumen *et al.*, 1994; Hildsheim *et al.*, 2001; Berumen *et al.*, 2001). Así pues, la historia natural de las infecciones por HPV de alto riesgo influye de manera directa en el curso y el pronóstico del CaCU y las infecciones persistentes por estos se asocian claramente con un mayor riesgo para desarrollarlo, aunque no debemos olvidar que existen otros factores de riesgo importantes para el desarrollo de esta enfermedad (Walboomers *et al.*, 1999).

### **1.11 APOPTOSIS**

Apoptosis es la muerte celular programada que juega un papel crucial en el desarrollo, homeostasis y sirve como un mecanismo de defensa en los organismos multicelulares (Kerr *et al.*, 1972) o células hospedero que combaten una infección viral (Knipe y Howley, 2001). La respuesta apoptótica involucra una cascada de señalizaciones intracelulares iniciadas en respuesta a una gran variedad de estímulos, incluyendo una infección viral, la ausencia de factores de crecimiento esenciales, tratamientos con glucocorticoides, irradiación- $\bar{O}$  y la activación de ciertos receptores (Lewin, 2000). Las características morfológicas y bioquímicas de las células apoptóticas incluyen la condensación de la cromatina, vacuolización del citoplasma, rompimiento de la membrana plasmática, fragmentación del ADN internucleosomal y el cambio de lugar de fosfatidilserina de la membrana plasmática interna hacia el exterior (Knipe y Howley, 2001). La estricta regulación de la muerte celular programada es esencial para prevenir enfermedades. En humanos, diferentes enfermedades están asociadas con deficiencias en los mecanismos apoptóticos, en las que se encuentran algunos desórdenes neurodegenerativos, SIDA y cáncer (Kerr *et al.*, 1972). La célula cancerosa tiene seis capacidades, según Hanahan y Weinberg (2000), las cuales son: autosuficiencia en la producción de sus propias señales de crecimiento, insensibles a señales inhibitorias, angiogénesis, potencial replicativo ilimitado, metástasis y evasión de la apoptosis. La apoptosis es iniciada por mecanismos que regulan el crecimiento y diferenciación celular, dentro de estos mecanismos podemos mencionar la expresión de protooncogenes (genes normales) y oncogenes (versiones alteradas de los protooncogenes), entre los cuales está pRB, proteína que controla la proliferación y la apoptosis a través de la represión activa de promotores dependientes del factor de transcripción E2F. La apoptosis es regulada a través de la liberación y regulación del citocromo C, mediado por p53 y/o p73 y a través de la regulación trascricional de genes proapoptóticos (APAF1). La pérdida de la función de pRB resulta en hiperproliferación, resultando en un bloqueo del crecimiento y/o apoptosis (Raff, 1992).

La importancia fundamental de la apoptosis como componente de la respuesta del hospedero a una infección viral es ilustrada por el hecho de que un gran número de productos de genes codifican para la inducción o inhibición de apoptosis. La prematura destrucción de la célula infectada puede reducir enormemente la producción de virus; entonces, los virus pueden desarrollar estrategias para contrarrestar la respuesta apoptótica codificando productos de genes virales que afectan componentes de la cascada apoptótica. La supresión o retardamiento de la apoptosis pueden extender el periodo de tiempo de latencia del virus, permitiendo que siga la infección produciendo nuevos viriones, previos a la destrucción de los virus utilizando caminos biosintetizados por ellos. También puede ocurrir lo contrario; los productos de los genes virales pueden ser identificados y funcionar como inductores de la apoptosis, posiblemente para facilitar la liberación y extensión de los viriones progenie del hospedero infectado (Knipe y Howley, 2001).

### **1.12 PROTOONCOGENES Y ONCOGENES**

El descubrimiento de los protooncogenes (genes normales) y de los oncogenes (versiones alteradas de estos genes) hace aproximadamente 20 años ha permitido explicar el cáncer a nivel molecular. Los protooncogenes desempeñan funciones importantes para el crecimiento celular. Codifican para factores de crecimiento, receptores a dichos factores, transductores de señales y proteínas nucleares que actúan como factores de replicación o de transcripción, activando genes importantes en el crecimiento normal de la célula. Por ejemplo, las proteínas de la familia Ras se localizan en la membrana citoplasmática; por otro lado, la proteína Myc se localiza en el núcleo y participa tanto en la replicación del genoma celular como en regulación de la transcripción genética.

Debido a que los oncogenes representan formas mutadas de genes celulares normales, ellos ofrecen una indicación clara de los blancos genéticos que se alteran por agentes cancerígenos. Cuando los protooncogenes se alteran molecularmente se transforman en oncogenes activados; entre las alteraciones más frecuentes que activan a los protooncogenes tenemos: mutación, rearreglo génico y amplificación génica; frecuentemente; un protooncogén puede presentar más de una de estas alteraciones genéticas. En glioblastomas, neuroblastomas, cáncer cérvico-uterino y mamario, un mecanismo común de activación de protooncogenes es la amplificación del ADN. Por ejemplo, el gen *c-myc* está frecuentemente amplificado en cáncer de mama, pulmón y cérvico-uterino (Ocadiz *et al.*, 1987). Una sobreexpresión de los protooncogenes que codifican para ciclinas o cdks permitirá un avance inapropiado de las células tumorales a través del punto de control G1-S del ciclo celular (Gariglio, 2000).

### **1.13 GENES SUPRESORES DE TUMORES O ANTIONCOGENES**

La existencia de genes que regulan negativamente el crecimiento celular está apoyada por una extensa literatura describiendo las consecuencias de la

fusión entre células normales y tumorales; frecuentemente la célula híbrida pierde el carácter tumoral sugiriendo que a la célula neoplásica le falta un gen regulador del crecimiento y que es posible recuperar dicho control al fusionarla con una célula normal. Estos genes de regulación negativa del crecimiento se llaman genes supresores de tumor o antioncogenes y los más estudiados hasta este momento son el gen retinoblastoma (*rb*) y el gen *p53*.

El producto del gen *rb1* es una fosfoproteína nuclear de 105-110 kDa (pRb) que controla negativamente el ciclo celular al unirse e inactivar factores de transcripción tales como E2F, los cuales controlan la expresión de numerosos genes involucrados en proliferación celular. La actividad de pRb está también regulada negativamente por fosforilación inducida por cinasas dependientes de ciclinas (cdks). Además de controlar el ciclo celular, pRb participa en diferenciación celular de tejidos del adulto y durante el desarrollo embrionario; también se ha observado que pRb puede aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales, disminuir la angiogénesis y suprimir la invasividad del tumor.

El antioncogén p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y contiene 11 exones que codifican para 393 aminoácidos. Se le ha clasificado como supresor de tumores ya que detiene o retiene la transformación y el crecimiento de una célula blanco. La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear capaz de reconocer una secuencia específica de ADN y actuar como factor de transcripción. Una propiedad importante de esta proteína antioncogénica es su afinidad por proteínas virales oncogénicas como: el antígeno T grande codificado por SV40, la oncoproteína E1B de adenovirus y la proteína E6 de HPV de alto riesgo. La proteína p53 participa en la respuesta celular al daño genético, al menos en dos formas diferentes: 1) deteniendo el ciclo celular en la fase G1, lo cual permite que se repare el ADN antes de la división celular; 2) causando apoptosis cuando el daño genético ha sido muy importante y ya no se puede reparar; en este caso la concentración de p53 se mantiene elevada por bastante tiempo. Además, la proteína participa directamente en el mantenimiento de la estabilidad genómica; su función como “guardián del genoma” es inhibida o destruída por deleciones, inserciones y mutaciones puntuales, así como por la formación de complejos inactivos con proteínas endógenas o con oncoproteínas virales. Lo anterior permite la proliferación de células defectuosas que favorecen la aparición de una neoplasia (Gariglio, 2000).

Es indudable que se seguirán descubriendo genes que modifican el riesgo al cáncer en individuos genéticamente predispuestos; así como en la población en general. Esto ayudará no sólo a entender la patogénesis del cáncer, sino también al desarrollo de nuevos métodos de terapia.

## **1.14 QUERATINOCITOS**

Los queratinocitos son el mejor modelo de estudio de la epidermis. El conocimiento de la biología de queratinocitos se incrementa rápidamente debido a

la disponibilidad de modelos de cultivo celular que asemejan los procesos de diferenciación *in vivo* y las técnicas de biología molecular. Los cultivos primarios de queratinocitos proporcionan una abundante fuente de queratinocitos puros que pueden ser usados para probar los efectos de agentes de proliferación, diferenciación y regulación en funciones celulares y como una fuente para obtener proteínas y genes. La identificación de genes ha sido procesada rápidamente; esa información ha hecho posible delinear la estructura de muchas proteínas importantes, así como el estudio de sus funciones y regulación genética dentro de la célula. La expresión de proteínas mutantes *in vivo* e *in vitro* ha llevado a realizar investigaciones de génesis en enfermedades epidermales (Eckert et al., 1997).

Cultivos primarios de queratinocitos humanos fueron inmortalizados con el retrovirus anfotrópico que tiene integrados los oncogenes virales E6, E7 y E6/E7 (Halbert et al., 1991).

Los resultados descritos anteriormente proporcionan una vía para llegar a conocer completamente el proceso de una enfermedad, la tecnología de microarreglos nos brinda la oportunidad de alcanzar esta meta, ayudándonos a conocer y comprender las interacciones y cambios genéticos que ocurren. Resulta de mayor importancia el establecimiento de este tipo de tecnología en nuestro país así como también el contar con personal capacitado para poder manejarla, para finalmente tratar de mejorar las condiciones de salud que afectan gravemente al país.

## 2. ANTECEDENTES

En 1991 Stephen Fodor A. y colaboradores combinaron las técnicas de química en fase sólida, grupos fotosensibles (del inglés, "photolabile groups") y fotolitografía para diseñar la Síntesis Química Paralelamente Distribuida Dirigida por Luz, la cual puede producir grupos muy diversos de productos químicos. Esta técnica utiliza filtros binarios como una estrategia de combinación durante la síntesis de oligonucleótidos, produciendo  $2^n$  componentes, en donde  $n$  es el número de pasos químicos. Produjeron un arreglo de 1024 péptidos en 10 pasos y experimentaron sus interacciones con un anticuerpo monoclonal analizando los resultados mediante microscopía de epifluorescencia (Fodor *et al.*, 1991).

En 1993 Stephen Fodor A. junto con otro grupo de investigadores implementaron los arreglos biológicos en miniatura o "chips", desarrollando dos metodologías claves: a) Síntesis química combinada por luz dirigida la cual permite la síntesis de miles de componentes en ubicaciones precisas y conocidas dentro del "chip", y b) el análisis de ese "chip" con láser confocal de fluorescencia que facilita la evaluación de las uniones en sitios individuales del chip (Fodor *et al.*, 1993).

En 1994 Ann Pease C. y colaboradores reportaron una técnica basada en fotolitografía usada para facilitar el análisis de secuencias creando arreglos miniatura de sondas de oligonucleótidos. Fabricaron un arreglo de 1.28 x 1.28 cm con 256 octanucleótidos diferentes, producido en 16 ciclos o pasos químicos durante 4 horas. El patrón de hibridación marcado fluorescentemente fue detectado por microscopía de epifluorescencia. Las señales de fluorescencia para las sondas complementarias fueron de 5-35 veces mayor que las que poseen hibridaciones inespecíficas, demostrando así la especificidad en la identificación de secuencias complementarias (Pease *et al.*, 1994).

En 1995 Marck Shena y colaboradores investigaron el proceso de fabricación e hibridación de 45 genes de *Arabidopsis thaliana*, utilizando un robot de alta velocidad para la impresión de los ADNc's de interés sobre una laminilla de vidrio, marcando las muestras con fluoróforos y realizando la estandarización de la sensibilidad del escáner utilizado, observando la sobreexpresión de algunos genes. Al mismo tiempo realizaron un análisis comparativo entre la raíz y la hoja de la misma planta, observando 27 genes expresados diferencialmente (Shena *et al.*, 1995).

En 1996 Marck Chee y colaboradores realizaron el análisis simultáneo del genoma mitocondrial humano con arreglos que contenían mas de 135 000 sondas complementarias de 16.6 kb generadas por Síntesis Química con Luz Dirigida. Desarrollando además, un esquema de marcado con 2 colores para permitir la comparación simultánea de un blanco polimórfico para una referencia de ADN o ARN. Analizaron polimorfismos con un límite de detección de diferencia de una sola base y una eficiencia sin precedente (Chee *et al.*, 1996).

En 1997 Joseph DeRisi y colaboradores utilizaron microarreglos de ADN que contenían cada uno de los genes de *Saccharomyces cerevisiae* para determinar la expresión genética temporal que acompaña los cambios metabólicos de fermentación a respiración. Los perfiles de expresión de genes observados con funciones metabólicas conocidas, señalan hacia características de reprogramación metabólica que ocurre durante un cambio diaúxico. El patrón de expresión de muchos genes no caracterizados previamente proporcionará pistas para sus posibles funciones. El mismo microarreglo de ADN fue utilizado para la identificación de genes cuya expresión fue afectada por la delección del co-represor transcripcional TUP1 o sobreexpresión del activador transcripcional YAP1 demostrando así lo factible y útil de esta herramienta para la exploración de patrones de expresión genética del genoma completo (DeRisi *et al.*, 1997).

En 1998 Ramsay Graham hace una revisión de la tecnología y aplicaciones de los microarreglos de ADN u oligonucleótidos inmovilizados. Los arreglos de ADN son fabricados con un robot de alta velocidad en membranas de nylon o de vidrio, usando sondas marcadas para determinar la complementaridad, permitiendo así estudiar la expresión de miles de genes en paralelo y el descubrimiento de nuevos genes. Los microarreglos de oligonucleótidos son fabricados por síntesis química de luz dirigida o por síntesis convencional siguiendo a la inmovilización en substratos de vidrio. Las muestras de ADN son amplificadas por PCR y marcadas con fluorescencia para realizar la hibridación. Confirmando el éxito de la aplicación de ésta tecnología en varios campos (Graham, 1998).

En 1999 Javed Khan y colaboradores realizan una revisión sobre el impacto de la tecnología de microarreglos en el estudio de enfermedades humanas. Resaltando la importancia de tener una base de datos donde almacenar y consultar los resultados de experimentos anteriores así como la cita del artículo original para posibles consultas. La tecnología posee el potencial de equilibrar muchos otros estudios individuales, llevando a resultados más amplios y conclusiones más sutiles. Finalmente mencionan que la importancia de esta herramienta se encuentra restringida a pocos laboratorios los cuales desarrollan expertos en el área y para un número creciente de intereses comerciales. “El valor real de la tecnología de microarreglos se verá aumentado cuando sea más accesible (Khan *et al.*, 1999)”.

En el 2000 Gad Getz, Erel Levine y Eytan Domany, presentaron un método para analizar los datos de los experimentos con microarreglos. La idea principal es identificar grupos de genes, cada uno de los cuales puede contener a otro, sugiriendo una división estable y significativa. La búsqueda para cada subgrupo es una compleja tarea hablando de computación. Presentaron un algoritmo basado en agrupamientos interactivos que llevan a cabo cada una de las búsquedas. Este tipo de análisis es especialmente conveniente para datos de microarreglos, donde las aportaciones de una variedad de mecanismos biológicos de expresión genética son muy complicados por la gran cantidad de datos. Aplicaron este método a 2 grupos de datos de microarreglos para cáncer de colon y leucemia. Gracias a la

identificación de un subgrupo de datos se pudieron descubrir discordancias y correlaciones de ciertos genes que son enmascaradas cuando todos los grupos fueron usados en el análisis. Algunas de estas correlaciones tienen interpretaciones biológicas y otras pueden servir para orientar posibles investigaciones (Getz *et al.*, 2000).

En el 2001 Mangalathu Rajeevan y colaboradores adaptaron la técnica de Real Time-PCR (Tiempo Real-PCR), para la validación de genes expresados diferencialmente. Describiendo un experimento de RT basados en la detección del colorante SYBR Green I y analizando la curva producto para validar genes expresados diferencialmente por tecnologías de perfiles de expresión genética. Los niveles de expresión relativos fueron cuantificados por construcción de una curva estándar en la cual se utilizaron diluciones de ADNc de un gen sobre-expresado. De esta forma se validaron 17 (71%) de 21 genes identificados por microarreglos y 13 (92%) genes excepto 1 identificados por Expresión Diferencial (Differential Display PCR). La validación de genes expresados diferencialmente detectados por análisis de microarreglos fueron relacionados con las intensidades de hibridación. Los resultados por Tiempo Real sugieren que los genes identificados por microarreglos de ADN con 2 a 4 veces de diferencia de expresión no pueden ser aceptados como verdaderos o falsos sin una validación más específica. A pesar de la tecnología de perfiles de expresión genética, mientras que las secuencias de los genes de interés no sea conocida, es una técnica conveniente sólo para la validación de expresión diferencial, siendo cuantitativa, rápida y útil ya que se requiere de 1000 veces menos ARN para el experimento (Rajeevan *et al.*, 2001).

En el 2002 Olshen A.B. y Jain A.N. presentaron dos métodos sencillos para la identificación de la expresión específica de los genes, en los cuales la expresión es vinculada con un fenotipo resultante, así como por la predicción sistemática del número de miembros de la clase de muestra. Validaron trabajos realizados anteriormente con microarreglos, obteniendo los siguientes resultados: en el estudio elaborado por Golub y col. en 1999 sobre leucemia lograron replicar las conclusiones cuantitativas con mejores resultados de clasificación, ocupando métodos más sencillos en la obtención de los mismos. En el trabajo elaborado por Perou y *et al.*, en el 2000 sobre tumores de mama proporcionaron un soporte cuantitativo riguroso para las conclusiones del artículo original. En cuanto al trabajo de Alizadeh y *et al.*, en el 2000 hecho sobre linfomas, el análisis apoyó únicamente parcialmente las conclusiones de los autores originales (Olshen y Jain, 2002).

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1 General :**

\* Estandarizar la metodología de Microarreglos de ADNc, para determinar de manera precisa y rápida, perfiles de expresión genética, en modelos para el estudio del cáncer cérvico uterino (CaCU).

#### **3.2 Particulares:**

\* Realizar la validación de la expresión de algunos genes relacionados con apoptosis y proliferación utilizando microarreglos de ADNc, mediante pruebas de RT-PCR *in vitro* en cultivos primarios de queratinocitos y queratinocitos inmortalizados con el oncogén *E6* del HPV 16.

\* Establecer un protocolo ideal para realizar la hibridación con Microarreglos de ADNc comerciales.

\* Iniciar la estandarización de las condiciones para la fabricación de Microarreglos.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

La vida depende de la capacidad de las células de almacenar, recuperar y transmitir las instrucciones genéticas requeridas para mantener a un organismo. La información hereditaria es cedida de la célula madre a sus hijas por mitosis, de generación en generación en cada organismo, estas instrucciones son almacenadas en cada célula dentro de los genes conteniendo elementos que determinan las características de una especie como un todo. Cada célula cuenta con el producto de estos genes para una gran variedad de funciones incluyendo la producción de energía, biosíntesis de macromoléculas, mantenimiento de la estructura celular, respuesta a estímulos ambientales, etc. Con base en lo anterior, es de gran importancia el establecimiento de una técnica como la de Microarreglos de ADNc para estudiar la expresión de patrones de expresión.

Es necesario realizar la validación de los Microarreglos de ADNc mediante técnicas convencionales como lo es RT-PCR *in vitro*. Hemos iniciado nuestros ensayos en modelos biológicos como líneas celulares para el estudio del CaCU. A partir de queratinocitos normales y queratinocitos inmortalizados con el oncogen viral *E6* del HPV 16.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Líneas celulares

Se utilizaron Cultivos Primarios de Queratinocitos y queratinocitos inmortalizados con *E6* del HPV 16.

Las células fueron cultivadas en cajas Petri adecuadas con medio especial para Queratinocitos (Invitrogen, USA), antibiótico ciprofloxacina (10 µg/ml) y fungizona (Invitrogen, USA) utilizando una concentración final de 2.5 µg/ml. Se crecieron las células hasta obtener la confluencia, posteriormente se extrajo el medio agregando PBS para lavar en 2 ocasiones, se extrajo el PBS, inmediatamente después se adicionó tripsina incubando a 37°C durante 5 minutos para desprender las células de la caja. Para detener la acción de la tripsina se agregó medio especial para queratinocitos enriquecido con suero, se mezcló con una pipeta hasta disolver perfectamente los agregados y se centrifugó a 2000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen suficiente para sembrar en el número de cajas deseadas a confluencia, se agregó a cada una de las cajas el medio especial de queratinocitos e incubó en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y una temperatura de 37°C para permitir su crecimiento.

Los queratinocitos inmortalizados con el oncogén *E6* del HPV 16, es una línea celular establecida y proporcionada por el Dr. Frank Röesl (Deutsches Krebsforschungszentrum, Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie, Abteilung Tumorstudiologie, Heidelberg, Germany). Esta línea celular fue manipulada al igual que el cultivo primario de queratinocitos.

\*Para consulta y preparación de soluciones ver Apéndice.

### 5.2 Extracción de ARN total

La obtención del ARN total de los cultivos celulares antes mencionados se realizó por el método de Trizol, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA), descrito a continuación:

Se agregaron 2 ml de Trizol, por cada caja Petri a temperatura ambiente y se colocaron en 2 tubos para microcentrífuga. A cada uno de los tubos se les agregó 200 µl de cloroformo (almacenado a -20°C) por cada mililitro de Trizol, se agitó vigorosamente durante 30 seg. manualmente y después con vortex hasta obtener un color rosa uniforme, se incubó 15 min a 4°C (se agitó con vortex cada 5 min y al final durante 30 seg). Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/15 min/ 4°C. La fase inferior (orgánica) contiene ADN y proteínas y la superior es la fase acuosa (60% del volumen del Trizol, el cual contiene el ARN total). Se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo, se agregó un volumen de isopropanol por cada mililitro de trizol, se mezcló suavemente; se incubó 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/10 min/ 4°C. La pastilla (RNA total) se lavó con 1 ml de etanol

al 80% [en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ] por cada mililitro de Trizol, se agitó con vortex para resuspender la pastilla, se centrifugó a no más de 9000 rpm/10min/ $4^{\circ}\text{C}$ , para repetir el lavado, se decantó en un solo paso y se dejó secar, finalmente se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de agua DEPC calentando a  $60^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$  y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para visualizar el ARN obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa (BIO-RAD Laboratories, USA) al 1.8% en buffer tris-acetatos y EDTA (Acido etilen-diamino-tetra-acético) (TAE), teñido con bromuro de etidio, utilizando como buffer de carga el colorante "Orange G" y visualizados en un transiluminador de luz U.V. La imagen fue obtenida con una cámara GeneCam (SynGene, USA).

### **5.3 Síntesis del ADNc (Reacción de la Transcriptasa Reversa)**

Partiendo del ARN total extraído de ambas líneas celulares se tomó un volumen de muestra equivalente a 5  $\mu\text{g}$  de ARN, al cual se le agregó 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleótido de timina (oligodT, 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y agua tratada con DEPC al 0.1% para tener un volumen final de 12  $\mu\text{l}$ , se incubó a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. e inmediatamente se incubó en hielo durante 1 min. Posteriormente se le agregaron 4  $\mu\text{l}$  de buffer 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM y  $\text{MgCl}_2$  15mM), 2  $\mu\text{l}$  de ditioneitol (DTT, 0.1mM), 1  $\mu\text{l}$  de deoxinucleótidos tri-fosfatados : dATP, dGTP, dCTP y dTTP (dNTP's, 0.2 mM); 1  $\mu\text{l}$  de Inhibidor de enzimas que degradan el ARN (RNase Inhibitor Cloned, 10 U/ $\mu\text{l}$ ) se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 2 min. y finalmente se agregó 1  $\mu\text{l}$  de la enzima transcriptasa reversa, "SuperScript™ II Rnase H" (200 U/ $\mu\text{l}$ ) y se dejó actuar a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas posteriormente se incubó a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 15 min almacenando el ADNc a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

NOTA: Los reactivos utilizados fueron obtenidos de la casa comercial Invitrogen, Life Technologies, USA. La metodología es la recomendada por el fabricante.

### **5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se prepararon tubos con un volumen de reacción final de 50  $\mu\text{l}$ , los cuales contenían: 39  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura, 2.5  $\mu\text{l}$  de Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$ , 2mM), 1  $\mu\text{l}$  del oligo sentido (100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de oligo antisentido (100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  de Buffer 10x (Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM), 1  $\mu\text{l}$  dNTP's (0.2 mM) y 0.2  $\mu\text{l}$  de la enzima Taq ADN polimerasa (5U/ $\mu\text{l}$ ) (Sambrook J., 1989).

Las condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos.

Gen	Pre-desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento (T <sub>m</sub> )	Síntesis	Extensión	Ciclos	Citas
<i>β2-m</i>	94°C/3min	94°C/1min	60°C/1:30min	72°C/1min	72°C/10min	30	Wang, <i>et al.</i> , 1993
<i>β-actina</i>	94°C/3min	94°C/1min	60°C/1min	72°C/1min	72°C/10min	30	Ace y Okulicz, 1995
<i>E6HPV</i>	94°C/3min	94°C/30seg	63°C/1min	72°C/1min	72°C/10min	30	Aguilar-L., <i>et al.</i> , 2002
<i>E7HPV</i>	94°C/3min	94°C/30seg	63°C/1min	72°C/1min	72°C/10min	30	Aguilar-L., <i>et al.</i> , 2002
<i>p21</i>	94°C/3min	96°C/30seg	59°C/1min	72°C/1min	72°C/10min	33	Saegusa, <i>et al.</i> , 2001
<i>p53</i>	94°C/3min	94°C/1min	60°C/1:30min	72°C/1min	72°C/10min	30	Zakut-Houri, <i>et al.</i> , 1985
<i>c-myc</i>	94°C/3min	94°C/1min	65°C/45seg	72°C/1min	72°C/10min	30	Gartel, <i>et al.</i> , 2001

Para visualizar los productos del RT-PCR correspondientes a la expresión de dichos genes, se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de agarosa (BIO-RAD, Laboratories, USA) al 3% en TAE, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV. En cada corrida se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, Life Technologies, USA). Los geles fueron analizados utilizando una cámara digital (GeneCam, Syngene, USA).

### 5.5 Microarreglos de ADNc

Para el establecimiento de las condiciones del proceso de hibridación se decidió utilizar el microarreglo comercial OpArray (Operon Inc., USA), el cual fue diseñado para establecer niveles de expresión de genes relacionados con apoptosis, el cual contiene oligonucleótidos de 70 nucleótidos de extensión, los cuales representan 374 genes problema y 10 genes control. Los oligos han sido impresos por triplicado dando un total de 1152 puntos siguiendo los parámetros de: 16 bloques (4 x 4); en cada bloque hay 6 arreglos en X y 12 arreglos en Y. El espacio entre cada bloque en X es de 350 micras, el espacio entre cada bloque en Y es de 150 micras y el diámetro entre cada punto es de 80 micras (Sambrook, et al. 1989) (Figura 6).

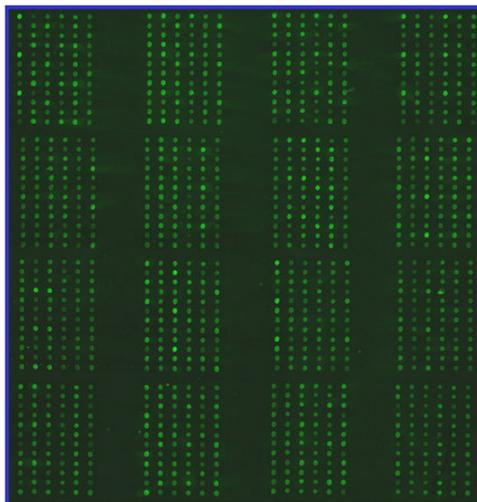


Figura 6. Microarreglo OpArray (Operon Inc., USA). Tomada de [www.operon.eu.com](http://www.operon.eu.com)

El procedimiento descrito a continuación, son las indicaciones del fabricante: “The DNA company, OPERON, OPT’s USA (OpArray<sup>R</sup>)”.

Se obtuvieron 5 µg de ARN total a partir de cada una de las líneas celulares utilizadas con el agente Trizol (procedimiento previamente descrito). Posteriormente se realizó la reacción de síntesis de ADNc (RT). Para la cual se mezclaron los

siguientes reactivos para obtener un volumen final de 12  $\mu$ l: 1  $\mu$ l de oligodT 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l (25 $\mu$ g), de ARN total se utilizaron los microlitros necesarios para una concentración final de 5  $\mu$ g y agua DEPC para ajustar al volumen final, posteriormente se incubó a 70° C durante 10 min e inmediatamente después se pasó a hielo y se incorporaron los siguientes reactivos al tubo para tener un volumen final de 25  $\mu$ l: 4  $\mu$ l buffer 5X, 2.9  $\mu$ l dNTP' s mezcla especial (Apéndice), 2 $\mu$ l DTT 0.1M, 1  $\mu$ l de inhibidor de Rnasa Clonado (10 U/ $\mu$ l), 1 ml de dCTP $\star$ , 1  $\mu$ l de la enzima SuperScript™ II Rnase H<sup>-</sup> y 2.1  $\mu$ l de agua ultrapura, posteriormente se incubaron a 42° C durante 2 horas(Figura 7).

$\star$ En el caso de la síntesis de ADNc a partir de ARN de queratinocitos normales se utilizó el dCTP marcado con Cy3 y para los queratinocitos con E6 del HPV 16 se utilizó el Cy5, ambos a una concentración final de 0.1 mM.

En este paso se realizó una purificación utilizando el Kit de Purificación de PCR (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante:

Se adicionó 35  $\mu$ l de NaOAc 100 mM pH 5.2 a cada una de las reacciones, se adicionó 500  $\mu$ l de buffer PB al tubo y toda la muestra se adicionó a la columna QIAquick, se centrifugó a 13000 rpm durante 60 seg se desechó el sobrenadante y se adicionó 400  $\mu$ l del buffer PE, se centrifugó a 13000 rpm durante 60 seg se desechó el sobrenadante, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min, se colocó la columna en un nuevo tubo, se adicionó 50  $\mu$ l del buffer EB se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min y se almacenó a -20° C.

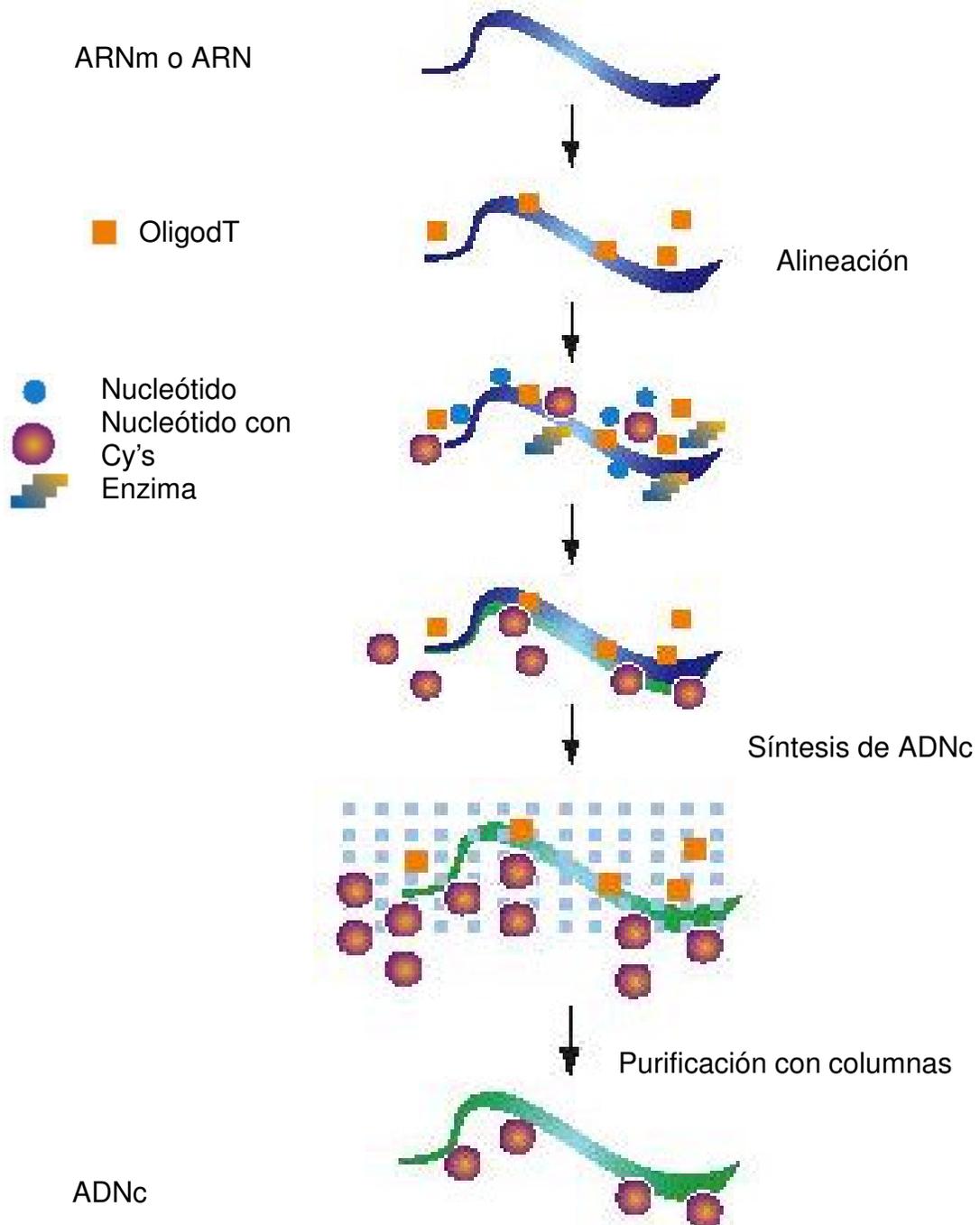


Figura 7. Marcaje y Síntesis del ADNc. Tomada de Ettan DIGE. User Manual.

Para realizar la pre-hibridación en la cual se mezcló lo siguiente para un volumen final de 300  $\mu$ l: 39  $\mu$ l de SSC 20X (3X), 75  $\mu$ l de Human Cot-1 DNA 500 mg, 20.2  $\mu$ l de ácido polideoxiadenílico 100 U, 60  $\mu$ l de SDS 2%, 150  $\mu$ l de formamida 50%.

Se incubó en la cámara de hibridación durante 1 hora a 42°C y posteriormente se lavó con 50 ml de agua ultrapura en un tubo cónico para centrifuga (Falcon) durante 1 min y 50 ml de isopropanol durante 1 min.

Para la solución de hibridación se utilizaron 300  $\mu$ l que contenían el volumen necesario para tener 1  $\mu$ g de ambas sondas marcadas, 39  $\mu$ l de SSC 20X (3X), 75  $\mu$ l de Human Cot-1 DNA 500 mg, 20.2  $\mu$ l de ácido polideoxiadenílico 100 U, 60  $\mu$ l de SDS 2%, 150  $\mu$ l de formamida 50%.

Para la aplicación de la sonda se siguieron las instrucciones del fabricante de la cámara de hibridación The DNA company, OPERON, OPT's USA (OpArray<sup>®</sup>) a continuación descrito:

Se colocó la laminilla en la placa inferior de la cámara de hibridación, se adicionó directamente la solución de hibridación cubriendo el área del arreglo, se colocó un cubreobjetos de 24 x 50 mm (Corning), se puso la placa superior de la cámara de hibridación, se selló perfectamente utilizando los tornillos para asegurar el sellado y se incubó a 42°C durante toda la noche (Figura 8).



Figura 8. Cámara de hibridación OPERON, OPT's USA (OpArray<sup>®</sup>). Tomada de [www.operon.eu.com](http://www.operon.eu.com)

Al día siguiente se removió la laminilla de la cámara de hibridación y se efectuaron los siguientes lavados según Ludwig Institute for Cancer Research: Volumen Final 40 ml de cada uno en tubo cónico para centrifuga (Falcon)

Solución I: Astringencia Media

4 ml SSC 20X      10 min  
36 H<sub>2</sub>O

Solución II: Astringencia Alta

0.2 ml SSC 20X  
0.4 ml SDS 10%      10min, 2X  
39.4 ml H<sub>2</sub>O

Solución III: Post-lavado

0.2 ml SSC 20X      10 min  
39.8 ml H<sub>2</sub>O

Todos los lavados se realizaron en un agitador orbital a baja velocidad para mantener en agitación constante en completa oscuridad y se secó con aire filtrado.

Para la lectura en el escáner se utilizó el sistema de procesamiento de imágenes GeneTAC LSIV, el cual posee las siguientes características: (Figura 9)

- a) hasta 4 láseres y 7 filtros de emisión.
- b) capacidad para 24 laminillas.
- c) resolución variable: 1 a 100 µm.
- d) se puede analizar una muestra varias veces.
- e) opción del PMT dual:
  - análisis simultáneo de dos ÷ para tener mayor velocidad
  - análisis de una sola ÷ para aumentar el intervalo dinámico y mejorar la detección.



Figura 9. Escáner GenTac LSIV,  
Genomic Solutions™.  
Tomada de [www.operon.eu.com](http://www.operon.eu.com)

## 5.6 Fabricación de Microarreglos

El sistema robotizado para la impresión de los Microarreglos es GenTAC™ G3 de Genomic Solutions, el cual posee una cabeza con 32 puntas de Titanio que pueden llegar a depositar desde 0.5 nl por muestra, logrando imprimir hasta 250,000 oligos por cm<sup>2</sup> (Figura 10).



Figura 10. Robot GenTAC G3, Genomic Solutions™. Tomada de [www.operon.eu.com](http://www.operon.eu.com)

Para la fabricación de decidió utilizar laminillas UltraGAPS™ Coated Slides de Corning. Estas laminillas se encuentran cubiertas con Amino Propil-silano el cual permite que las laminillas cuenten con una alta calidad de unión del blanco a la superficie (Figura 1).

Se diseñaron diferentes protocolos para la impresión cambiando las condiciones de humedad, temperatura, concentración de la muestra, solventes y concentración de éstos. Se estableció un programa para la impresión de los spots en el cual se realizaron matrices de 4 X 4, de cada una de las variantes que se utilizaron.

El programa utilizado para el robot es el HDA. Este programa provee una lista de las placas que pueden ser utilizadas para la impresión del arreglo y va mostrando paso a paso la definición del programa, como el espacio entre "spots" o entre matrices número de impresiones; ubicaciones; concentraciones; etc. El programa para el escáner utilizado es GTLS el cual está diseñado para manejar hasta 4 láseres diferentes, además de que es posible analizar una sola laminilla las veces que sean necesarias hasta determinar la intensidad adecuada, la cantidad de laminillas que se desean leer, el área para leer y el número de laminilla.

Los protocolos de lavado fueron realizados de acuerdo con los manuales de Corning™ y Genomics Solutions™ respectivamente.

Corning™: Se lavó con 0.2% SDS durante 20 seg y posteriormente agua destilada durante 1 min, agua destilada a 95°C durante 2 min y etanol al 95% durante 1 min. Se dejaron secar y se guardaron a -4°C en completa oscuridad.

Genomics Solutions™: Se lavó con 0.2% SDS durante 10 min, enjuagar con agua durante 2 min y posteriormente etanol al 100% y se centrifugó para secar en completa oscuridad.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Obtención del ARN

Se extrajo ARN total de queratinocitos normales e inmortalizados con el oncogén viral *E6* del HPV a partir de cultivos celulares, obteniendo dos muestras por caja petri. Se realizó la cuantificación leyendo en el espectrofotómetro a 260 nm, la concentración para queratinocitos normales fue de 0.276  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 0.294  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  respectivamente, para los queratinocitos inmortalizados fue de 0.256  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 0.298  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  respectivamente. Ambas muestras fueron observadas en un gel de agarosa al 1.8% teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador de luz UV para comprobar la integridad de las muestras. Fueron elegidas las muestras 2 de cada línea respectivamente por tener una mayor concentración (Figura 11).

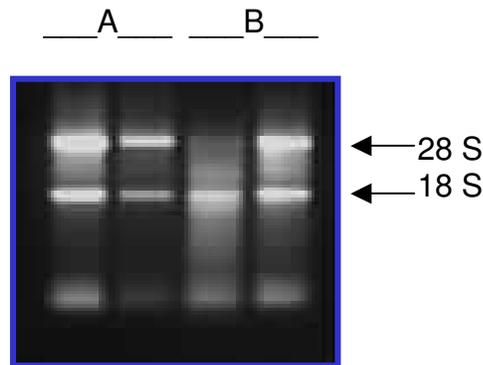


Figura 11. Extracción del ARN total. A) QN y B) QE6.

Para una mejor comprensión de los resultados, se describen las muestras de la siguiente manera:

QN<sup>-</sup>: queratinocitos normales (no inmortalizados), sin marcar.

QE6<sup>-</sup>: queratinocitos inmortalizados con el oncogén E6 del HPV, sin marcar.

QN<sup>+</sup>: queratinocitos normales (no inmortalizados), marcados.

QE6<sup>+</sup>: queratinocitos inmortalizados con el oncogén E6 del HPV, marcados.

### 6.2 Síntesis de ADNc

El ADNc sintetizado por la Transcriptasa Reversa, sin marcar y marcado, fueron observados en un gel de agarosa para comprobar que la enzima estuviera trabajando correctamente y corroborar la integridad de las muestras (Figura 12).

A B C D

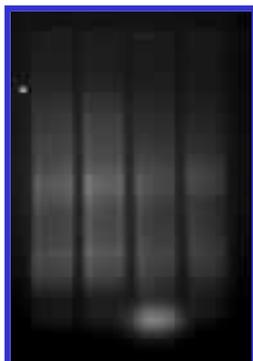


Figura 12. ADNc. A) QN<sup>-</sup>, B) QE6<sup>-</sup>, C) QN<sup>+</sup> y D) QE6<sup>+</sup>.

Posteriormente se realizó una purificación para eliminar el sobrante de nuestra mezcla de síntesis y se corrió en gel de agarosa para comprobar que no hubiera pérdida y/o degradación del ADNc durante la purificación, y para comprobar que no hubiera ARN en las muestras. Fueron cuantificadas en un espectrofotómetro a 260 nm, obteniéndose las concentraciones de ADNc: QN<sup>-</sup> 0.114 µg/µl, QE6<sup>-</sup> 0.130 µg/µl, QN<sup>+</sup> 0.122 µg/µl y QE6<sup>+</sup> 0.134 µg/µl (Figura 13).



Figura 13. Gel de agarosa con Br<sup>-</sup>et<sup>+</sup> del ADNc purificado. A) QN<sup>-</sup>, B) QE6<sup>-</sup>, C) QN<sup>+</sup> y D) QE6<sup>+</sup>.

### 6.3 RT-PCR's *in vitro*

En estos experimentos se utilizó el ADNc no marcado, realizando PCR's para los genes de *β2-microglobulina* obteniendo un producto de 100 pb, para *β-actina*, un producto de 260 pb, *p53* de 500 pb, *p21* de 277 pb, *c-myc* de 528 pb, *E6* presenta dos productos de amplificación de 161 y 344 pb y *E7* con un producto de 269 pb. La amplificación se verificó mediante geles de agarosa al 2% (Figura 14).

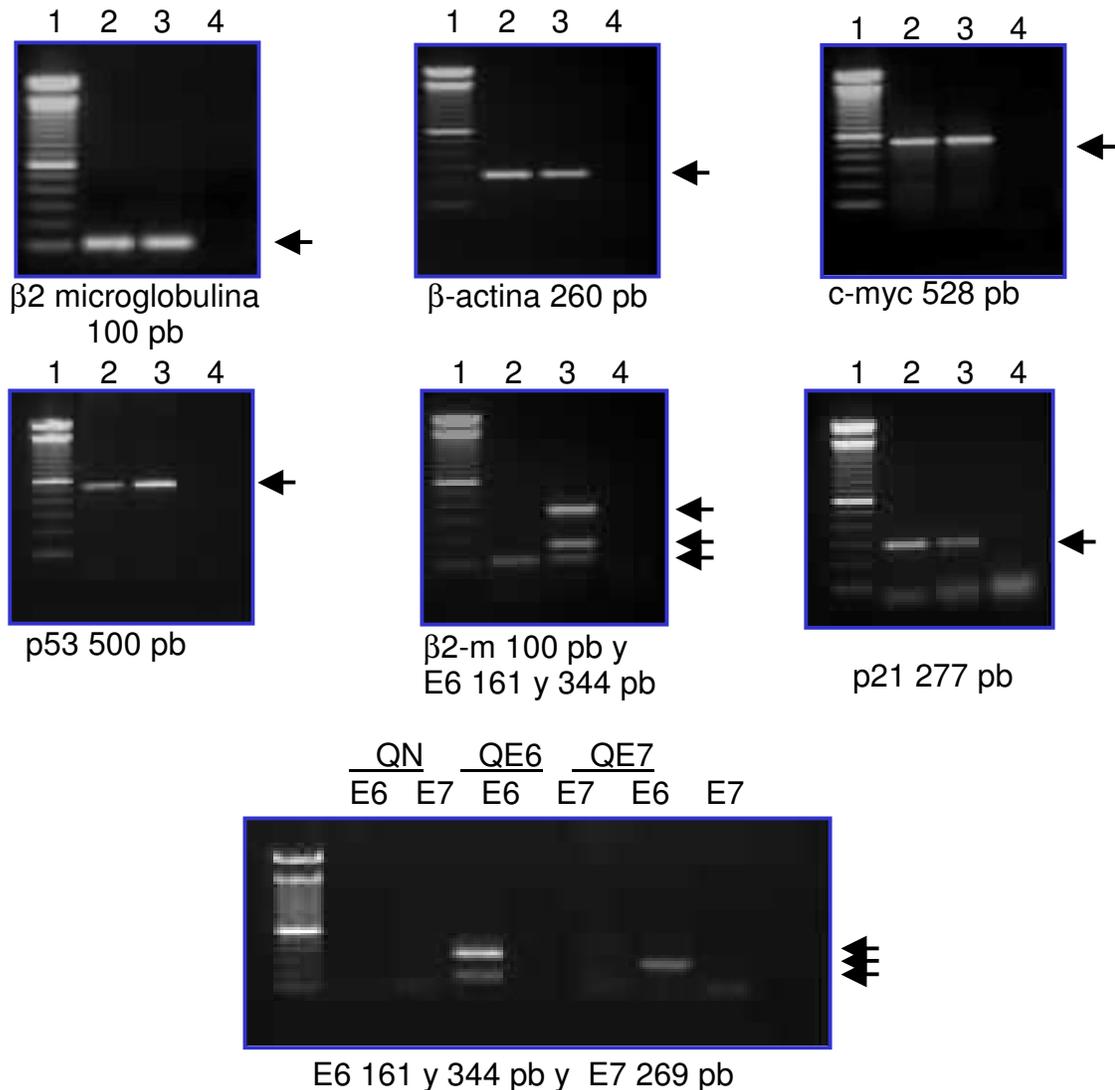


Figura 14. RT-PCR para algunos genes de interés.

1) Marcador de peso molecular de 100 pb, 2) Queratinocitos normales  
3) Queratinocitos inmortalizados con E6 y 4) Control negativo (sin ADNc).

#### 6.4 Marcado de la sonda

Una vez realizada la incorporación de los nucleótidos marcados con Cy3 y Cy5 por medio de la RT, se realizó un minigel de agarosa al 3% sobre un porta objetos, el cual fue observado en el escáner para comprobar su marcado, con el láser respectivo. Las muestras fueron cargadas con gliceraldehído al 50% y corridas con 22 volts, fue utilizado el colorante Orange G en un pozo alterno para observar el corrimiento todo el tiempo. (Figura 15).

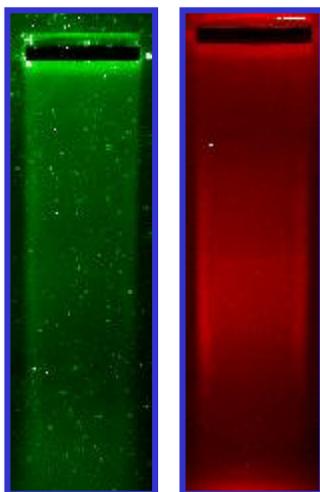


Figura 15. Gel de agarosa del ADNc purificado y analizado en el escáner.  
A) QN<sup>+</sup>Cy3 y B) QE6<sup>+</sup>Cy5.

#### 6.5 Hibridación de los Microarreglos Comerciales

Siguiendo las instrucciones de la compañía Operon<sup>TM</sup>, se preparó un buffer de hibridación con 2  $\mu$ l de SSC 20X (2.5X), 1  $\mu$ l PolydA/Cot1 10 $\mu$ g/ $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l SDS 10% (0.2%) y 250 ng de sonda marcada con Cy3 y Cy5 respectivamente. Desnaturalizando inmediatamente a 95°C durante 2 min. La laminilla se depositó sobre la cámara de hibridación colocando un cubre objetos sobre el área del arreglo y aplicando la sonda por uno de los lados permitiendo se expandiera por capilaridad. Se selló la cámara de hibridación y se incubó durante toda la noche a 65°C. Posteriormente se realizaron los lavados como se describió en la sección de material y métodos.

En la figura 16 se observa el resultado de la primera hibridación, en la cual son visibles algunos puntos simétricos. Basándose en el resultado obtenido se decidió realizar varias modificaciones al protocolo original para obtener mejores resultados. Se prepararon soluciones con un volumen final de 300  $\mu$ l para una pre-

hibridación y la de hibridación; las cuales contenían 39  $\mu$ l de SSC 20X (2.6X), 20.2  $\mu$ l PolydA 10 $\mu$ g, 75  $\mu$ l Cot1 10 $\mu$ g/ $\mu$ l, 60  $\mu$ l de SDS 10% 0.2%, 150  $\mu$ l Formamida 50%. Fue adicionada para la solución de hibridación la sonda marcada, 8  $\mu$ l de sonda Cy3, 7.6  $\mu$ l de sonda Cy5. Se incubó durante toda la noche a 42°C y posteriormente se realizan los lavados como se describió en la sección de material y métodos.



Figura 16. Primera hibridación, se distinguen algunos puntos rojos y verdes. Los círculos indican zonas donde hay un punto rojo y un punto verde con un cierto patrón, las flechas indican puntos solos.

En la Figura 17A se observa el resultado de la segunda hibridación, en la cual es notable la concentración de la sonda hacia una parte del área del arreglo, analizando esta imagen más detalladamente se lograron observar algunos puntos rojos, verdes y amarillos (Figura 17B).

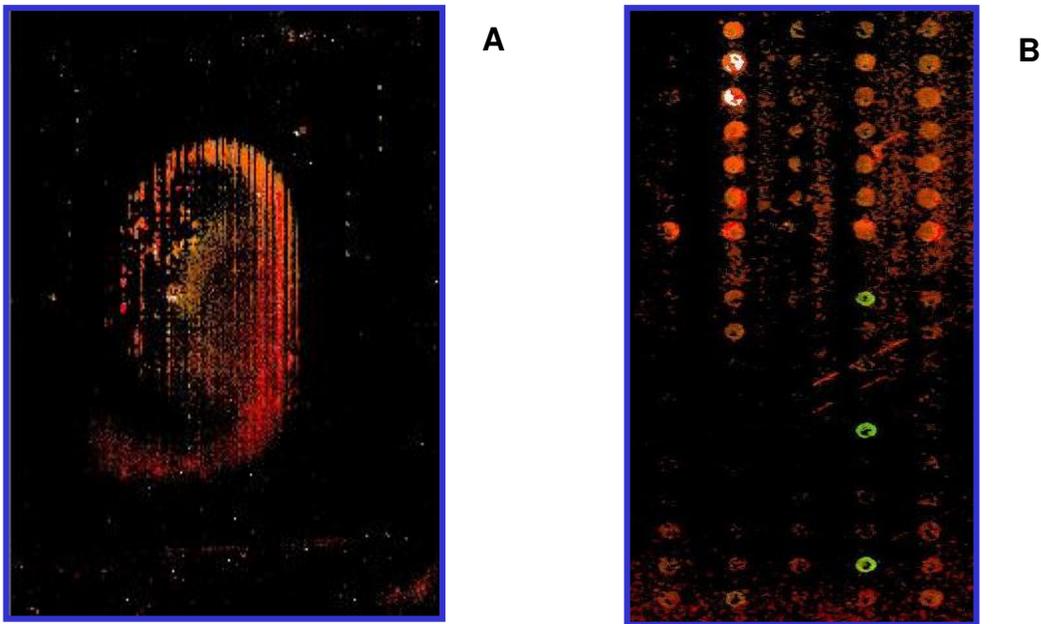


Figura 17. A) Segunda hibridación, en la cual es notable la concentración de la sonda hacia una parte del área del arreglo. B) Imagen aumentada en la cual se observan puntos rojos, verdes y amarillos.

## 6.6 Fabricación de Microarreglos

Fueron utilizadas laminillas de Corning a las cuales se les realizó un pretratamiento que consistía de la activación a 37°C durante 1 min en cámara húmeda. Se diseñó el siguiente protocolo de impresión: matrices de 4 X 4 con muestras a concentraciones variadas, disueltos en DMSO a diferentes concentraciones, SSC a diferentes concentraciones y agua. Se utilizó un oligonucleótido marcado con rodamina y ADN de esperma de salmón sin marcar (Tabla 2).

Antes de realizar la fijación se analizaron a simple vista las laminillas para observar si hubo impresión de la muestra. Las matrices de las muestras disueltas en agua no lograron ser observadas.

Para la fijación de la muestra se incubaron a 37°C en cámara húmeda durante toda la noche y en oscuridad, posteriormente fueron horneadas a 80°C durante 2 horas y se entre-cruzaron en un Crosslinker Ultravioleta CL1000, UVP; con 5 ciclos a 60 mJ durante 30 seg esperando 1 min entre cada uno.

Tabla 2. Descripción de las condiciones de las muestras utilizadas durante la impresión.

Muestra	Concentración (ng/ml)	DMSO (%)	SSC (X)	Agua
Oligo con Rodamina	0.025			X
	0.05			X
	0.1			X
	0.2			X
	0.4			X
ADN esperma salmón	0.025	10	0.25	
	0.5	10	0.25	
	0.1	10	0.25	
	0.2	10	0.25	
	0.4	10	0.25	
ADN esperma salmón	0.025	25	0.25	
	0.5	25	0.25	
	0.1	25	0.25	
	0.2	25	0.25	
	0.4	25	0.25	
ADN esperma salmón	0.025	50	0.25	
	0.5	50	0.25	
	0.1	50	0.25	
	0.2	50	0.25	
	0.4	50	0.25	
ADN esperma salmón	0.025			X
	0.5			X
	0.1			X
	0.2			X
	0.4			X

Se analizó una laminilla con Microscopio electrónico (ROSSBACH S.A., KYOWA) para comprobar que las muestras quedarán fijadas correctamente (Figura 18).

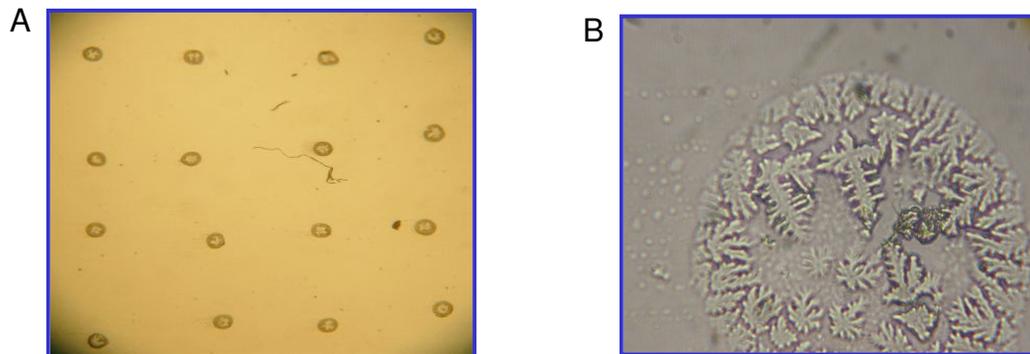


Figura 18. Impresiones del robot tomadas con Microscopio Electrónico ROSSBACH S.A. KYOWA. A) 75 X y B) 300 X.

Para saber que lo observado era la muestra, se lavó la laminilla con agua destilada y se observó nuevamente al microscopio; no fue encontrando algún tipo de formación (cristales), concluyendo que lo que se había visto anteriormente eran ocasionadas por los solventes. Por lo tanto se diseñó un nuevo experimento.

El nuevo diseño incluyó la impresión de 5 laminillas con ADN de esperma de salmón a diferentes concentraciones y un oligonucleótido marcado con Cy5 de 23 bases a diferentes concentraciones, impresas en matrices de 4 X 4 y por duplicado. Las características se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Descripción de las condiciones de las muestras utilizadas en el segundo experimento.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ l)	stock $\mu$ l	DMSO 50%	Agua
ADN esperma salmón 10 mg/ml Vol. Fin. 100 $\mu$ l	25	0.25	50.5	49.25
	50	0.5	50.5	49
	100	1	50.5	48.5
	150	1.5	50.5	48
	200	2	50.5	47.5
	250	2.5	50.5	47
	300	3	50.5	46.5
Oligo con Cy5 4.972 mg/ml Vol. Fin. 50 $\mu$ l	25	0.25	50.5	24.5
	50	0.5	50.5	24.25
	100	1	50.5	23.75
	150	1.5	50.5	23.25
	200	2	50.5	22.75
	250	2.5	50.5	22.25
	300	3	50.5	21.75

Se probaron diferentes formas de fijado entre las 5 laminillas (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones de fijado y lavado de las laminillas impresas.

Código de Barras	80°C/ 2hrs	U.V.	Lavado 1	Lavado 2
12481247	X		X	
12481248		X	X	
12481249		*X		X
12481250	X	X	X	
12481251	X			X

\*Laminilla analizada en el escáner antes de algún protocolo de fijado o lavado.

En la Figura 19 se observan las 5 laminillas con las diferentes variaciones.

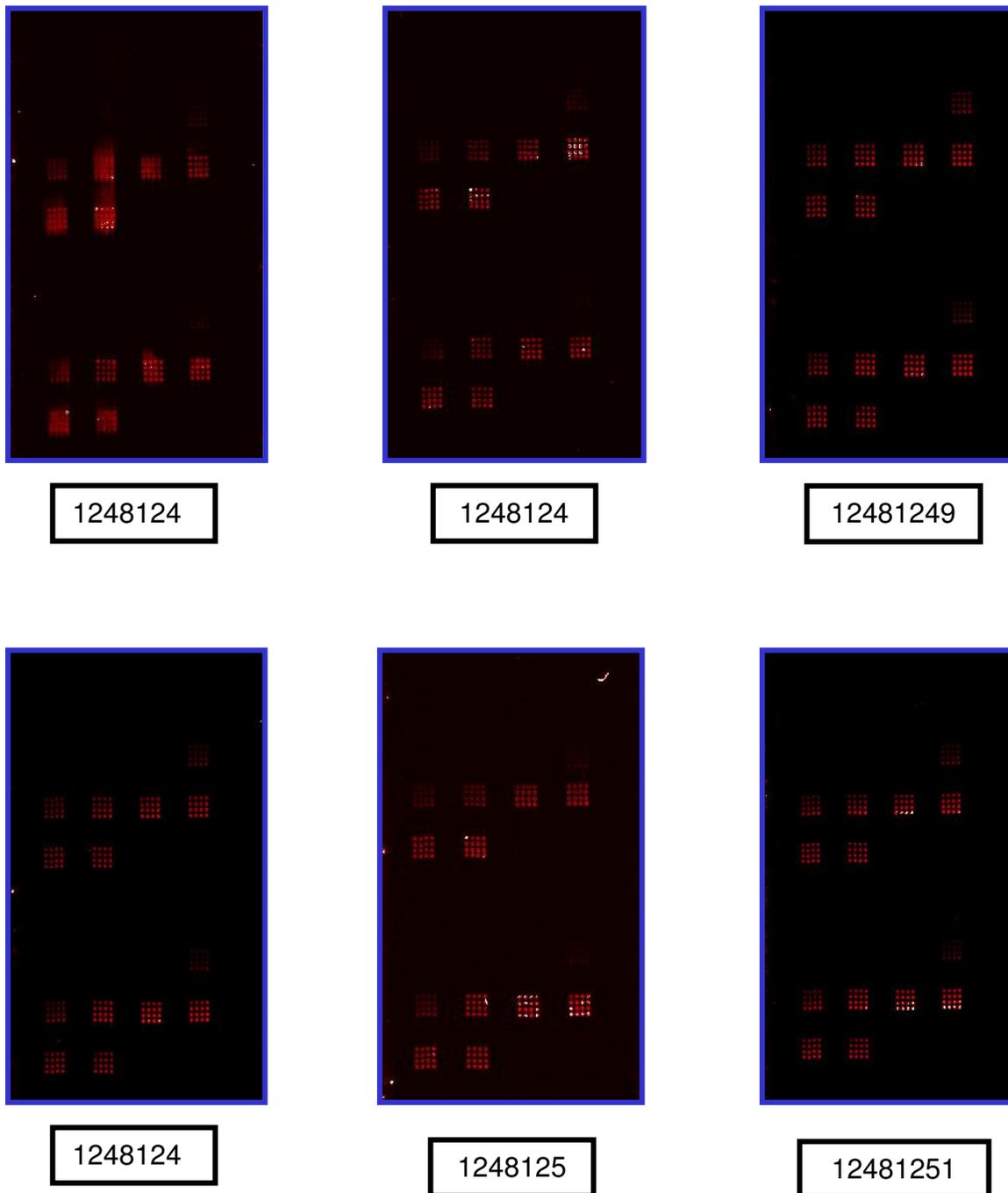


Figura 19. Laminillas impresas con un oligonucleótido marcado con Cy5 a diferentes concentraciones y tratadas con diferentes protocolos de lavado.  
\*Esta laminilla se leyó directamente en el escáner sin tratamiento de lavado.

En la Figura 20 A se observa una laminilla teñida con bromuro de etidio en la cual son visibles los "spots" impresos. Posteriormente se decidió utilizar el colorante SYBR<sup>R</sup> GREEN I (Sigma-Aldrich) para teñir otra laminilla, el cual es comúnmente utilizado para éste fin siendo más fácilmente detectable en el escáner a una longitud de onda de 520nm observando también las impresiones (Figura 20 B).

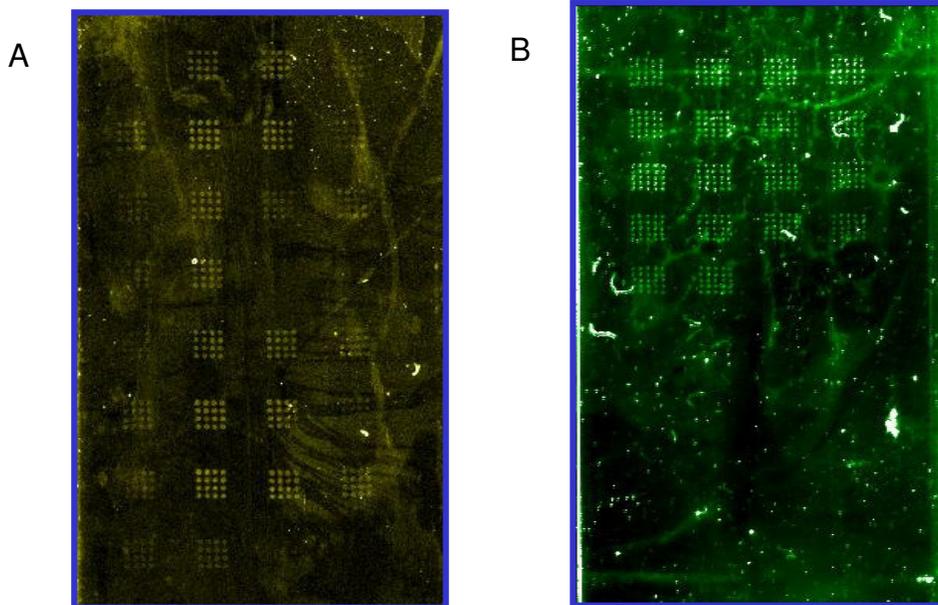


Figura 20. A) Laminilla 12481251 teñida con bromuro de etidio.  
B) Laminilla 12481270 teñida con SYBR Green I.  
Ambas analizadas en el escáner.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 RT-PCR's

Actualmente existen diversos artículos que describen el comportamiento de genes como *p53*, *p21*, *c-myc*, *E6*, *E7*,  $\beta 2$ -microglobulina y  $\beta$ -actina; en diferentes tipos celulares u otros modelos de estudio, bajo diferentes tratamientos, drogas, etapas. Tal es el caso de la línea celular queratinocitos utilizada como un modelo de estudio idóneo (Halbert *et al.*, 1991; Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2002; Alazawi *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2002; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2002). Igualmente utilizados son los queratinocitos inmortalizados con el oncogen E6 del HPV (Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2001, 2002; Tsutsui *et al.*, 2002). Ambas líneas mostraron, en el presente trabajo sus diferentes características, propias de cada una, como se esperaba, resultando muy convenientes para el desarrollo del trabajo.

Dentro de los estudios realizados en queratinocitos tanto normales como inmortalizados son utilizados genes "housekeeping" (constitutivos) como controles positivos. En este trabajo se utilizaron  $\beta 2$  microglobulina y  $\beta$ -actina para verificar la calidad de las muestras así como la cantidad aplicada (Koitte, 1995), amplificando ambos genes se obtuvieron resultados similares en las dos líneas celulares (cada una de su respectivo tamaño), con lo que se comprobó la integridad y calidad de las muestras.

En cuanto al análisis de los oncogenes de HPV *E6* y *E7* de las líneas celulares; los queratinocitos normales mostraron una notable calidad, al no amplificar la secuencia viral de *E6*, resultando una excelente línea celular para usarse como control negativo (Pim y Banks, 1999). Mientras que los queratinocitos inmortalizados mostraron ser altamente susceptibles a los oncogenes virales (Pim y Banks, 1999). Estos datos van acorde con lo reportado por Aguilar Lemarroy 2002, donde muestra la amplificación de *E6* como un producto de doble banda, una de 344 pb correspondiente a la secuencia completa y una de 161 pb debida a un empalme durante la maduración del ARNm (Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2002; Doobar *et al.*, 1990).

En lo correspondiente a *p53*, *p21* y *c-myc* han sido evaluados ampliamente en la literatura mundial, encontrándose una alteración de su expresión ocasionada por la acción de *E6* del HPV en comparación con queratinocitos normales (Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). En este estudio se confirmó lo reportado anteriormente.

Estudios realizados sobre la actividad de *p53* han llevado a la conclusión que las propiedades de este oncogén se encuentra alteradas cuando se estudia en células transformadas y en oncogénesis (Bargonetti *et al.* 1993; Kern *et al.*, 1992; Hainaut *et al.*, 1995; Ahn *et al.*, 2002). En el presente trabajo *p53* muestra una mayor expresión en queratinocitos inmortalizados con *E6* en comparación con

los queratinocitos normales, lo que probablemente se explica por la interacción entre *E6* y *p53* lo cual sugiere un mecanismo convincente para la acumulación de alteraciones genéticas necesarias para la progresión de un tumor (Kessiss *et al.*, 1993). *p53* al encontrarse mutado, puede provocar una acumulación de las mismas al no ser traducido a proteína, lo anterior probablemente es conducido por un mecanismo transcripcional. La síntesis de otro producto genético involucrado en la inducción o estabilización de la proteína puede ser también importante (Kastan *et al.*, 1993). Los niveles del ARNm de *p53* observados pueden ser relacionados también entre la expresión genética celular y la expresión genética viral (Fogel y Riou, 1998).

En el caso de *p21*, su papel en apoptosis es controversial, la mayor parte de la evidencia, apoya el hecho de ser una proteína proapoptótica, resultando alterada su expresión en células inmortalizadas (Ahn *et al.*, 2002; Wedemeyer *et al.*, 2000). En este estudio se muestra una disminución en la expresión de *p21* en queratinocitos inmortalizados con *E6* en comparación con los normales, ya que su actividad está regulada por la proteína *p53* la cual actúa como factor de transcripción, sugiriendo que en células transformadas al encontrarse una disminución en la expresión de la proteína *p53* (reportada en trabajos anteriores), no hay transcripción del gen *p21*, encontrándose una expresión disminuida en los resultados del presente trabajo (Aguliar-Lemarroy *et al.*, 2002).

Los estudios llevados a cabo sobre el papel que juega el protooncogén *c-myc*, han visto involucrada su actividad en proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Estando regulada por mutágenos o virus, resultando en alteraciones genéticas de desregulación de la expresión en un amplio número de tipos tumorales incluyendo el carcinoma cérvico uterino (Coller *et al.*, 2000; Magrath, 1990, Ocadiz *et al.* 1987). En los resultados obtenidos en el presente trabajo para el protooncogén *c-myc*, se observa un pequeño aumento en su expresión en queratinocitos inmortalizados con *E6* en comparación con los normales probablemente ocasionado por la inserción del promotor viral el cual se ubica junto al protooncogén dando lugar a un aumento en la producción del ARNm y a la cantidad de producto génico. O tal vez podría ser ocasionada por la adquisición de nuevas secuencias regulatorias, las cuales pueden incluir intensificadores de expresión o "enhancers". (Klug y Cummings, 1999)

A la fecha son muchas las evidencias que muestran que las alteraciones en los genes celulares que controlan el crecimiento celular y la diferenciación juegan un papel crítico en la patogénesis del cáncer, por ello se ha puesto especial atención en el análisis y descripción de cada uno de ellos y otros genes relacionados a estos eventos celulares con lo cual se ha aprendido mucho de ellos, bajo diferentes situaciones experimentales. Pero se han estudiado individualmente y por separado debido a las técnicas moleculares con las que cuentan. De ahí que se requiera una tecnología que permita el análisis simultáneo de cientos y miles de genes; como son los microarreglos.

## **7.2 Extracción del ARN**

El éxito en el análisis de expresión genética depende de la calidad del ARN (Shena y Davis, 2000). El primer paso es la obtención de una buena cantidad de ARN de alta calidad y pureza, alrededor de 1-5  $\mu\text{g}$  (Jordan, 1998; Dahse *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000), aunque esto no representa un problema cuando no hay límite de muestra, como cuando se emplean líneas celulares. Una variedad de protocolos han sido probados dependiendo del tipo y cantidad de muestra problema. En el presente trabajo se utilizó Trizol como el método más apropiado de extracción de ARN a partir de líneas celulares (Celano *et al.*, 1993; Chomczynski y Mackey, 1995; Shearstone *et al.*, 2002). Diversos grupos de trabajo se han dado a la tarea de investigar el tipo de ARN que resulta más eficiente para experimentos con microarreglos. Lo cual depende en gran parte lo que se quiere estudiar con ellos. Para la mayoría de los experimentos el uso de ARN total es más eficiente, resaltando el hecho que se obtiene una mayor cantidad y la confiabilidad y reproducibilidad de los datos es mayor (Mahadevappa y Warrington, 1999; Dahse *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000; Wodicka *et al.*, 1997; Shena *et al.*, 1995; Lockhart *et al.*, 1996; Hedge *et al.*, 2000) por lo que fue más conveniente para este trabajo la extracción de ARN total, obteniendo muy buenas cantidades sin degradación y sin contaminación de sales, polisacáridos, ADN, proteínas o lípidos que pudieran provocar un mal marcado u ocasionar señal de fondo durante la hibridación (Bowtell y Sambrook, 2003)

## **7.3 Síntesis de ADNc**

El protocolo utilizado para la síntesis de ADNc fue ligeramente modificado incorporando los nucleótidos marcados con Cy3 y Cy5 siguiendo cuidadosamente las instrucciones de concentración, así como la de los nucleótidos utilizados convencionalmente (Shearstone *et al.*, 2002). El uso de la enzima SuperScript II (Invitrogen) utilizada usualmente para este fin, resulta de la misma eficiencia para este tipo de experimentos (González *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Dahse *et al.*, 2002; Shearstone *et al.*, 2002), reportándose que las sondas obtenidas mediante esta forma resultan más activas y confiables (Hedge *et al.*, 2000). Lo que se comprobó realizando geles de agarosa teñidos con  $\text{Br}^- \text{et}^+$ , verificando la integridad de las muestras y por otra parte con el minigel de agarosa analizado directamente en el escáner se comprobó el excelente marcado del ADNc.

La utilización de un oligo marcado como blanco permitió monitorear las condiciones y calidad de la impresión, ya que se analizaron las laminillas antes de ser hibridadas y probar las diferentes formas de fijado (Shearstone *et al.*, 2002; Genomic Solutions<sup>TM</sup>, Corning<sup>TM</sup>).

Los fluorocromos CyDye<sup>TM</sup> de Amersham Biosciences han ganado su aceptación en varios laboratorios de investigación como marcadores excepcionales para análisis de experimentos con fluorescencia por su alto nivel de señal y manejo en laboratorio, siendo ideales para el marcado de cualquier ácido

nucleico. Tomando en cuenta lo anterior se utilizaron para el presente trabajo utilizando Cy3 dCTP y Cy5 dCTP, obteniendo un excelente marcado de la sonda (Ettan<sup>TM</sup>, Mujumdar *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994).

## **7.4 Hibridación**

La meta en cualquier hibridación es obtener una alta especificidad y un mínimo de señal de fondo, en cuanto a esto último los grupos amino libres sobre la laminilla deben ser bloqueados o inactivados para evitar la unión específica de la sonda produciendo una gran señal de fondo (Corning<sup>TM</sup>, Genomic Solutions<sup>TM</sup>, Hedge *et al.*, 2000). Tomando en cuenta estas observaciones se realizaron pre-hibridaciones a los microarreglos las cuales resultaron muy efectivas para evitar la unión inespecífica de la sonda a la laminilla. El protocolo original de Operon<sup>TM</sup> para la hibridación fue ligeramente modificado utilizando 50% de formamida, para ayudar a disminuir la temperatura de hibridación y que las cadenas de ADN se mantengan relajadas (Diehls *et al.*, 2001) y evitar así que la muestra se evaporara, como ocurrió en la segunda hibridación variando también el volumen de reacción de 20 a 300  $\mu$ l. En la primera hibridación donde el volumen de reacción fue de 20  $\mu$ l la temperatura se disminuyó de 65 a 42°C (por la adición de la formamida), lo que pudo afectar la alineación y unión de la sonda con su blanco en la laminilla (Bowtell y Sambrook, 2003; Diehl *et al.*, 2001; Hedge *et al.*, 2000).

En general una buena especificidad de hibridación se obtiene realizando todo el proceso a una alta astringencia, así como los lavados posteriores a ella (Corning<sup>TM</sup>, Genomic Solutions<sup>TM</sup>, Operon<sup>TM</sup>). En este trabajo las condiciones de lavado sugeridas por el fabricante del microarreglo fueron óptimas para este paso.

## **7.5 Fabricación de microarreglos**

El control de calidad durante la impresión del blanco sobre la laminilla es crítico para mantener la integridad de los datos y prevenir el uso de ARN, reactivos y tiempo. Una variedad de parámetros como son la aceleración del robot, temperatura y humedad determinan la morfología y tamaño del "spot". Se ha reportado en trabajos anteriores una humedad relativa de 45% y una temperatura constante de 22°C aproximadamente como condiciones óptimas de impresión (Diehls, *et al.* 2001; Hedge, *et al.* 2000). Para el presente trabajo se utilizó una temperatura entre 20 y 30°C y una humedad relativa del 40% siendo constantes en cada uno de las sesiones de impresión, tomando en cuenta que cambios importantes en estos factores tienen un impacto significativo en el tamaño y morfología del "spot", así como en la eficiencia de unión del ADN, siendo cuidadosamente controlados para proveer un resultado consistente durante el proceso (Diehls *et al.*, 2001; Hedge *et al.*, 2000).

La superficie de la laminilla y el buffer de la muestra son componentes críticos para la reproducibilidad y fidelidad de los datos. La utilización de laminillas tratadas con aminosilano ofrecen una superficie más consistente con muy baja

fluorescencia de fondo. Se ha probado que las laminillas de Corning™ son las más consistentes para este tipo de experimentos (Hedge *et al.*, 2000, ArrayIt™).

El uso de las laminillas Ultra GAPS™ (Corning™), posee la ventaja entre otras cosas de usar soluciones de impresión que contienen un mínimo de 25 ng/μl de ADN. En este trabajo se utilizaron concentraciones que van de 25 a 300 ng/μl de ADN encontrando que las concentraciones más adecuadas son de 150 y 200 ng/μl. Sin embargo, la concentración adecuada puede ser determinada empíricamente (Corning™; Diehls *et al.*, 2001; Hedge *et al.*, 2000). Por la experiencia adquirida en este trabajo hemos observado que la calidad de los microarreglos depende también del tipo de muestra que se desee imprimir como por ejemplo oligonucleótidos, ADN, productos de PCR, etc.

## **7.6 Solventes de Impresión**

Con el fin de evaluar el efecto de los solventes utilizados para la impresión de las muestras se diseñó un experimento utilizando DMSO a diferentes concentraciones y SSC (0.25 veces concentrado, 0.25 X), estas soluciones son las más comúnmente utilizados en este tipo de experimentos. El DMSO ayuda a mantener el ADN desnaturalizado, posee un bajo nivel de evaporación y las interacciones con la superficie de las laminillas recubiertas con aminosilano producen “spots” más uniformes (Genomic Solutions™, Corning™). El SSC 3 veces concentrado (3X), el cual posee la propiedad de producir “spots” de menor diámetro permitiendo fabricar arreglos de alta densidad (Hedge *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos variando las concentraciones de los solventes demostraron los efectos esperados debido a las propiedades de cada uno de ellos. El DMSO utilizado a 10 y 25% ocasionó que la muestra se expandiera sobre un diámetro mayor deformando el área determinada de los “spots”, la concentración al 50% demostró ser la más adecuada en cuanto a uniformidad, y por la literatura, concentraciones mayores ocasionan agregación del ADN (Diehl *et al.*, 2001; Hedge *et al.*, 2000); también posee las ventajas adicionales de un bajo nivel de evaporación, lo que nos permite fabricar arreglos que pueden ser almacenados durante largos periodos de tiempo (Hedge *et al.*, 2000).

En cuanto a 3X de SSC, Genomic Solutions™, no recomienda su uso ya que no permite la desnaturalización del ADN y posee altos niveles de evaporación requiriendo un extremo cuidado de las condiciones ambientales durante la impresión (Diehls *et al.*, 2001; Hedge *et al.*, 2000). En cuanto a nuestra experiencia, los resultados obtenidos 3X de SSC no mostró tener efectos significativos sobre la morfología del spot como se esperaba, por lo que no fue crítico su posterior uso, siendo ampliamente utilizado en laminillas cubiertas con poli-L-lisina (Shalon *et al.*, 1996).

### **7.7 Inmovilización o fijado del blanco**

La unión del ADN a la superficie de las laminillas es potenciado por entrecruzamiento con UV a 300mJ o calentando en un horno a 80°C/2 h (Diehl *et al.*, 2001; <http://www.bmskorea.co.kr>). Con la finalidad de discernir entre uno u otro fueron probados ambos métodos de fijado, no encontrando diferencias significativas. Como lo mencionan Genomic Solutions™ y Corning™ los cuales describen que ambos métodos son útiles, siendo más viable el entrecruzamiento con UV para moléculas menores a 300 pb, por lo que se utilizará esta forma en posteriores trabajos.

### **7.8 Lavados post-impresión**

Con el fin de retirar la sonda que no se haya unido a la laminilla durante la impresión y el fijado y evitar señal de fondo es muy importante realizar lavados después del fijado de la muestra a cada una de las laminillas. Fueron probados dos protocolos de lavado para observar diferencias entre ellos y elegir el más apropiado. Ambos métodos no mostraron diferencias significativas, eligiendo el protocolo de Genomic Solutions™ para futuros trabajos (Genomic Solutions™, Corning™; <http://www.bmskorea.co.kr>, ArrayIt™).

### **7.9 Control de calidad**

Con la finalidad de observar los spots de ADN de esperma de salmón y como control de calidad se utilizaron métodos para marcar el ADN impreso. Primero se utilizó Br<sup>et</sup>+, analizando la laminilla en el escáner observando los “spots” del ADN del esperma de salmón junto con los “spots” del oligo marcado con Cy5. En segundo lugar se probó el colorante SYBR Green I recomendado ampliamente por los expertos en microarreglos para este fin; que al igual que el Br<sup>et</sup> se incorpora entre las moléculas de ADN haciendo visible la muestra al ser analizada en el escáner (Genomic Solutions™, <http://www.bmskorea.co.kr>, Ettan™).

## 8. CONCLUSIONES

- \* Hemos comprobado que la técnica de RT-PCR *in vitro* es práctica y específica para realizar la validación de la expresión de algunos genes de interés.
- \* Para el análisis de la expresión genética se requiere ARN de alta calidad, así como una cantidad suficiente para la elaboración del experimento.
- \* El marcado de la sonda puede llevarse a cabo durante la síntesis del ADNc incorporando nucleótidos marcados, resultando eficiente y práctico.
- \* Durante la hibridación es importante contar con un volumen adecuado de la solución que contiene la sonda. Igualmente es importante tener en cuenta la temperatura a la cual se va llevar a cabo la incubación para obtener una unión altamente específica de la sonda con su blanco complementario.
- \* Para la fabricación de microarreglos es crítico controlar al máximo las condiciones ambientales para mantener la integridad de las muestras y por lo tanto de los datos obtenidos.
- \* La química de la superficie de la laminilla es un componente crítico. Las laminillas tratadas con amino silano ofrecen una superficie consistente para la reproducibilidad y fidelidad de los datos al igual que los solventes de impresión para la obtención de una imagen adecuada.
- \* Es necesario consolidar la inmovilización de ADN sobre la superficie de la laminilla, la utilización de luz ultravioleta o calentamiento resultan muy efectivos para este fin.
- \* Es importante realizar lavados posteriores al lavado de la muestra, utilizando detergentes suaves para ello.
- \* Quedan establecidas las bases para un protocolo de un experimento con microarreglo desde la fabricación hasta la obtención de la imagen en el escáner.
- \* La técnica de análisis de expresión genética utilizando microarreglos resultará conveniente para experimentos en donde el objetivo es analizar cientos y hasta miles de genes simultáneamente.

## **9. PERSPECTIVAS**

Es importante llegar a establecer la técnica de microarreglos a nivel nacional y aplicar como una metodología convencional en los laboratorios de genética y biología molecular para llegar a comprender el desarrollo de diversas enfermedades lo cual permitirá diseñar estrategias de prevención más efectivas, así como tomar decisiones terapéuticas acordes que reducirán las secuelas socioeconómicas que dejan las enfermedades.

Se propone continuar con estudios en los que se aplique la experiencia adquirida en el desarrollo de este trabajo y realizar el análisis de los resultados que se obtengan; utilizar más modelos de estudio así como incluir muestras de pacientes de la enfermedad de interés.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Ace CI and Okulicz WC. (1995). Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol.* **115**:95-103.

Aguilar-Lemarroy A, Kirchhoff S, Whitaker N, Gariglio P, zur Hausen H, Krammer PH, Rosl F. (2001). Differential sensitivity of human papillomavirus type 16(+) and type 18(+) cervical carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis. *Int J Cancer.* **93**:823-31.

Aguilar-Lemarroy A, Gariglio P, Whitaker NJ, Eichhorst ST, zur Hausen H, and Rösl F. (2002). Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene.* **21**: 165-175.

Ahn KS, Park KS, Jung KM, Jung HK, Lee SH, Chung SY et al. (2002). Inhibitory effect of glycolic acid on ultraviolet B-induced c-fos expression, AP-1 activation and p53-p21 response in a human keratinocyte cell line. *Cancer Lett.* **186**:125-35.

Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley A et al. (2002). Changes in Cervical Keratinocyte Gene Expression Associated with Integration of Human Papillomavirus 16. *Cancer Reserch.* **62**: 6959-6965.

Ammes B, Magraw R and Gold L. (1990). Ranking possible cancer hazards. *Science.* **236**: 71-80.

Anuario estadístico. (2000). Secretaría de Salud y Servicios de Salud en los Estados. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud.

Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR and Prives C. (1993). A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev.* **7**:2565-74.

Barr PJ and Tomei LD. (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology.* **12**:487-493.

Berger AJ, Baege A, Guillemette T, Deeds J, Meyer R, Disbrow G et al. (2002). Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 3 Expression Increases during Immortalization of Cervical Keratinocytes by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Proteins. *Am J Pathol.* **161**:603-10.

Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL and García-Carranca A. (1994). Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int. J. Cancer.* **56**:640-645.

Berumen J, Miranda E, Zafra G, Casas L, Segura E, Ordonez RM et al. (1997). Molecular epidemiology of high-incidence cancers in Mexico. *Gac. Med. Mex.* **133**:35-41.

Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galván SC, Estrada RA et al. (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**:1325-1330.

Bieche I and Liderau R. (1995). Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* **14**: 227-51.

Bosch X, McCray PB, Chang SM, Ulich TR, Simonet WS, Jolly DJ et al. (1996). Proliferation induced by keratinocyte growth factor enhances *in vivo* retroviral-mediated gene transfer to mouse hepatocytes. *J. Clin. Invest.* **98**: 2683-2687.

Buchholz M, Boeck W, Fensterer H, Muller F, Wenger C, Michl P et al. (2001). Use of DNA arrays/microarrays in pancreatic reserch. *Pancreatology.* **1**: 581-586.

Carrada-Bravo T. (1987). Cáncer de los órganos genitales y de mama en mujeres de la Ciudad de México. *Bol Of Sanit Panam.* **102**: 125-130.

Celano P, Vertino PM and Casero RA Jr. (1993). Isolation of polyadenylated RNA from cultured cells and intact tissues. *Biotechniques.* **15**:26-8.

Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D et al. (1996). Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays. *Science.* **274**: 610-614.

Chomczynski P and Mackey K. (1995). Modifications of the TRI Reagent<sup>TM</sup> procedure for isolation of RNA from polysaccharide and proteoglycan rich sources. *BioTechniques.* **19**: 942-945.

Cisneros MT, Espinosa R y Pineda BE. (1987). Mortalidad por cáncer de la mujer mexicana. *Salud Pública Méx.* **29**: 299-312.

Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Eisenman RN, Golub TR et al. (2000) Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci.* **97**:3260-5.

Dahse R, Berndt A and Kosmehl H. (2002). Total RNA-based target design for microarray analysis of defined tumor areas. *Biotechniques.* **32**:744-748.

Damm K. (1993). ErbA: Tumor suppressor turned oncogene?. *FASEB.* **7**: 904-909.

DeRisi JL, Iyer VR and Brown PO. (1997). Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science.* **278**: 680-686.

Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD. (2001). Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res.* **29**:E38.

Disaia PS and Creasman WT (1994). Enfermedades del cuello uterino en ginecología clínica. Pp 1-36

Doorbar J, Parton A, Hartley K, Banks L, Crook T, Stanley M, Crawford L. (1990). Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology.* **178**:254-62.

Eckert RL, Crish JF and Robinson NR. (1997). The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiological Reviews.* **72**: 397-424.

Epidemiología (2001). Información Epidemiológica de Morbilidad. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud.

Ettan DIGE. User Manual 18-1164-40 Edicion AA.

Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT and Solas D. (1991). Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science.* **251**: 767-773.

Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP and Adams CL. (1993). Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature.* **364**: 555-556.

Fogel S and Riou G. (1998). The early HPV16 proteins can regulate mRNA levels of cell cycle genes in human cervical carcinoma cells by p53-independent mechanisms. *Virology.* **244**: 97-107.

Gariglio P, Benitez-Bribiesca L, Berumen J, Alcocer JM, Tamez R and Madrid V. (1998) Therapeutic Uterine-Cervix Cancer Vaccines in Humans. *Arch. Med. Research.* **29**: 279-284.

Gariglio P. (2000). Bases moleculares del cáncer. En: Genética y Biomedicina Molecular. Dra. Esther Orozco Orozco y Dr. Patricio Garglio, Editores. Limusa. Noriega Editores. 181-198 pags.

Gariglio P y Rangel LM. (2003). Apoptosis y Cáncer Humano. En: La Frontera: Genética Molecular de la Enfermedad. Dra. Esther Orozco Orozco y Dr. Juan Pedro Luna, Editores. Editorial IPN. En prensa.

Gartel AL, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hay N, Najmabadi F, Tyner AL. (2001). Myc repress the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc. Natl. Acad. Science.* **98**: 4510-4515.

Getz G, Levine E and Domany E. (2000). Coupled two-way clustering analysis of gene microarray data. *Proc Natl. Acad. Science.* **97**: 12079-12084.

Giaccone G. (1996) Oncogenes and antioncogenes in lung tumorigenesis. *Chest* **109**: 130S-135S.

Gonzalez P, Zigler JS Jr, Epstein DL and Borrás T. (1999). Identification and isolation of differentially expressed genes from very small tissue samples. *Biotechniques.* **26**: 884-6, 888-92.

Hainaut P, Rolley N, Davies M, Milner J. (1995). Modulation by copper of p53 conformation and sequence-specific DNA binding: role for Cu(II)/Cu(I) redox mechanism. *Oncogene.* **10**:27-32.

Halbert CL, Demers GW and Galloway DA. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Journal of Virology.* **1**: 473-478.

Hanahan D and Weinberg RA. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell.* **100**: 57-70.

Hanash SM, Bobek MP, Rickman DS, Williams T, Rouillard JM, Kuick R, et al. (2002). Integrating cancer genomics and proteomics in the post-genome era. *Proteomics.* **2**:69-75.

Hedge P, Qi K, Abernathy C, Gay S, Dharap R, Gaspard JE et al. (2000). A concise guide to cDNA to microarray Analysis. *BioTechniques* **29**: 548- 562.

Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodríguez A et al. (2001) Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**: 315-318.

Jordan BR. (1998). Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips". *J Biochem.* **124**:251-8.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**: 6304-11.

Katsuma S and Tsujimoto G. (2001).Genome medicine promised by microarray technology. *Expert Rev Mol Diagn.* **1**: 377-382.

Kern SE, Pietsenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW and Vogelstein B. (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science.* **256**: 827-30.

Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**:239-257.

Kesis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. (1993). Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:3988-92.

Khan J, Bittner ML, Chen Y, Meltzer PS and Trent JM. (1999). DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. *Biochim Biophys Acta.* **1423**: M17-28.

Klug W and Cummings M. Conceptos de genética. Quinta edición. Madrid. Prentice Hall. 1999.

Knipe DM and Howley PM. (2001). Fundamental Virology. 4ta edición. Lippincott Williams and Wilkins. 1395 pp.

Koite M, Ishino K, Ikuta T, Huhn N and Kuroki T. (1995). Grown enhancement of normal human keratinocytes by the antisense oligonucleotide of retinoblastoma susceptibility gene. *Oncogene.* **10**: 117-122.

Leake R. (1996). The cell cycle and regulation of cancer cell growth. *Ann NY Acad. Sci.* **784**: 252-262.

Lewin B. (2000). Genes VII. Oxford University Press. 990 pp.

Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, Garcia-Carranca A. (1997). Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* **89**:1227-31.

Lizano M and Garcia-Carranca A. (1997). Molecular variants of human papillomaviruses types 16, 18, and 45 in tumors of the uterine cervix in Mexico. *Gac Med Mex.* **1**:43-8.

Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS et al. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* **14**:1675-80.

Magrath I. (1990). The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res.* **55**:133-270.

Mahadevappa M and Warrington JA. (1999). A high-density probe array sample preparation method using 10- to 100-fold fewer cells. *Nat Biotechnol.* **17**:1134-6.

Mohar A, Lazcano E, Gariglio P et al. (1999). Carcinoma cérvico-uterino en México: Una perspectiva multidisciplinaria. En: Diez Problemas de Salud Pública. (J:R: de la Fuente y J. Sepúlveda, compiladores). Fondo de Cultura Económica. 187-208 pags..

Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS. (1993). Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem.* **4**:105-11.

Murray A and Kirschner M. (1991). What controls the cell cycle?. *Sci. Am.* **264**: 56-63.

Ness M and Woodworth CD. (2001). Microarrays: spotlight on gene function and pharmacogenomics. *Curr Cancer Drug Targets.* **1**: 155-175.

Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, Baldit M, Bernard K, Naquet P et al. (1995). Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics.* **29**: 207-216.

Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M Graef AM and Gariglio P. (1987). High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.* **47**: 4173-4177.

Olshen AB and Jain AN. (2002). Deriving quantitative conclusions from microarray expression data. *Bioinformatics.* **18**: 961-970.

OpArray<sup>®</sup>. User Manual. The DNA company, OPERON, OPT's.

Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP and Fodor SPA. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 5022-5026.

Penn SG, Rank DR, Hanzel DK and Barker DL. (2000). Mining the human genome using microarrays of open reading frames. *Nat Genet.* **26**: 315-8.

Picconi MA, Alonio LV, Garcia Carranca A, Lizano M, Vazquez G, Distefano AL et al. (2000). Molecular variants of human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in adenocarcinomas of the cervix. *Medicine.* **60**: 889-94.

Pietu G, Alibert O, Guichard V, Lamy B, Bois F, Leroy E et al. (1996). Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genome Res.* **6**: 492-503.

Pim D and Banks L. (1999). HPV-18 E6\*1 protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. *Oncogene.* **18**: 7403-8.

Raff MC. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. **356**:397-400.

Rajeevan SM, Ranamukhaarachchi DG, Vernon D and Unger ER. (2001). Use of Real-Time Quantitative PCR to Validate the Results of cDNA Array and Differential Display PCR *Technologies. Methods*. **25**: 443-451.

Ramsay G. (1998). DNA: State-of-the art. *Nature Biotechnology*. **16**:40-44.

Rowland JM. (2002). Molecular genetic diagnosis of pediatric cancer: current and emerging methods. *Pediatr Clin North Am*. **49**:1415-35.

Saegusa M, Machida D and Okayasu I. (2001). Possible Associations among Expression of p14 ARF, p16 INK4a, p21KIP1, and p53 Accumulation and the Balance of Apoptosis and Cell Proliferation in Ovarian Carcinomas. *Cancer*. **92**: 1177-1189.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2da edition.

Shalon D, Smith SJ, Brown PO. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*. **6**: 639-45.

Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470.

Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO and Davis RW. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci*. **93**: 10614-9.

Schuchhardt J, Beule D, Malik A, Wolski E, Eickhoff H, Lehrach H et al. (2000). Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic. Acids. Res*. **28**:E47.

Shreastone JR, Allaire NE, Getman ME and Perrin S. (2002). Nondestructive quality control for microarray production. *Biotechniques*. **32**:1051-1057.

Simbulan-Rosenthal CM, Veleno A, Veldman T, Schlegel R and Rosenthal DS. (2002). HPV-16 E6/7 immortalization sensitizes human keratinocytes to ultraviolet B by altering the pathway from caspase-8 to caspase-9-dependent apoptosis. *J Biol Chem*. **277**: 24709-16.

Stanbridge E. (1992). Functional evidence for human tumor suppressor genes: Chromosome and molecular genetic studies. *Cancer Summ*. **12**: 43-57.

Tsutsui T, Kumakura S, Yamamoto A, Kanai H, Tamura Y, Kato T et al. (2002). Association of p16(INK4a) and pRb inactivation with immortalization of human cells. *Carcinogenesis*. **23**: 2111-7.

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. (2000). High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol*. **18**:457-9.

Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A and Ferrone S. (1993). Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta-2-microglobulin messenger RNA. *J. Clin. Invest*. **91**: 684-692.

Wang Z, Liu Y, Mori M and Kulesz-Martin M. (2002). Gene expression profiling of initiated epidermal cells with benign or malignant tumor fates. *Carcinogenesis*. **23**: 635-43.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol*. **189**:12-9.

Watson A, Mazumder A, Stewart M and Balasubramanian S. (1998). Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr Opin Biotechnol*. **9**: 609-14.

Wedemeyer N, Gohde W and Potter T. (2000). Flow cytometric analysis of reverse transcription-PCR products: quantification of p21(WAF1/CIP1) and proliferating cell nuclear antigen mRNA. *Clin Chem*. **46**:1057-64.

Weinberg RA. (1995). The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann. NY Acad. Sci*. **758**: 331-338.

Welford SM, Gregg J, Chen E, Garrison D, Sorensen PH, Denny CT et al. (1998). Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Res*. **26**: 3059-65.

Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH and Lockhart DJ. (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*. **15**: 1359-67.

Worley J. (2000). Microarray Biochip Technology. (Shena M., ed). Eaton Publishing/BioTechniques Books, Natick, MA, pp 65-85.

Xiang CC and Chen Y. (2000). cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnology Advances*. **18**: 35-46.

Yamanaka Y, Tamari M, Nakahata T and Nakamura Y. (2001). Gene expression profiles of human small airway epithelial cells treated with low doses of 14- and 16-membered macrolides. *Biochem Biophys Res Commun*. **287**:198-203.

Yu H, Chao J, Patek D, Mujumdar R, Mujumdar S, Waggoner AS. (1994). Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. *Nucleic Acids Res.* **22**: 3226-32.

Zakut-Houri R, Bienz-Tadmor B, Givol D and Oren M. (1985). Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J.* **4**: 1251-1255.

Zhao N, Hashida H, Takahashi N, Misumi Y, Sakaki Y and Zhao N. (1995). High density cDNA filter analysis a novel approach for large scale quantitative analysis of gene expression. *Gene.* **156**: 207-213.

Zhu Z, Chao J, Yu H, Waggoner AS. (1994). Directly labeled DNA probes using fluorescent nucleotides with different length linkers. *Nucleic Acids Res.* **22**: 3418-22.

Zur Hausen H. (1996). Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochem. Biophys. Acta.* **1288**: F55-F78.

## 11. APÉNDICE

### Agua ultrapura

Se utiliza agua destilada esterilizada en autoclave la cual es nuevamente esterilizada por filtración (poro de 0.2 mm) y almacenada en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Bromuro de etidio ( $\text{Br}^-\text{et}^+$ )

Agente cancerígeno usar guantes y cubrebocas.  
1 g de bromuro de etidio  
100 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
Agitar varias horas  
Almacenar en frasco ámbar a  $4^{\circ}\text{C}$

### Deoxinucleótidos tri-fosfatados (dNTP's)

10  $\mu\text{l}$  dATP 100 mM  
10  $\mu\text{l}$  dCTP 100 mM  
10  $\mu\text{l}$  dGTP 100 mM  
10  $\mu\text{l}$  dTTP 100 mM  
60  $\mu\text{l}$  de agua ultra pura

### Deoxinucleótidos tri-fosfatados (dNTP'S mezcla especial)

10  $\mu\text{l}$  dATP 100 mM  
10  $\mu\text{l}$  dGTP 100 mM  
10  $\mu\text{l}$  dTTP 100 mM  
5  $\mu\text{l}$  dCTP 100 mM  
465  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura

### DEPC (Dietil pirocarbonato, Agua tratada con...)

Para 100 ml al 0.1%  
0.1 g DEPC  
100 ml agua  
Esterilizar en autoclave.

### Esterilizar por filtración.

### EDTA (Acido etilen-diamino-tetra-acético)

Para 1 L  
186.1 g EDTA  
800 ml agua  
Ajustar a pH 8.0 con aprox. 20 g de lentejas de NaOH.  
Aforar a 1L  
Esterilizar en autoclave

### Formamida

50 ml formamida  
5 g resina de intercambio iónico (Bio-Rad AG501-X8, 20, 50 mesh)  
Agitar 30 min a T.A.  
Filtrar y almacenar en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Hidroxilamina

Para 100 ml  
50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$   
Agitar hasta disolver perfectamente  
Aforar a volumen final  
Filtrar y guardar en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$

### NaOAc (Acetato de Sodio)

Para 100 ml a 100 mM  
40.81g Acetato de Sodio  
50 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
Ajustar a pH 5.2 con Ac. Ac.

### Glacial

Aforar a 100 ml  
Esterilizar por filtración  
Almacenar en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$

NaOH (Hidróxido de sodio)

1N  
4g NaOH  
100 ml H<sub>2</sub>O

Esterilizar en autoclave

Tris (Hidroximetil-amino-metano)

1M  
121.1 g tris base  
800 ml de agua  
Ajustar a pH 7.4  
Aforar a 1L  
Esterilizar en autoclave.

PBS (Amortiguador salino de fosfato)

Para 1L (pH 7.4)  
8 g NaCl  
200 mg KCl  
1.44 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Añadir 50 ml agua destilada  
Mezclar con 700 ml de agua  
hasta disolver  
Aforar a 1L  
Esterilizar en autoclave

SDS (Dodecil sulfato de sodio)

Para 1 L al 10 %  
100 g SDS  
900 ml de agua  
Calentar a 68° C para disolver  
Ajustar a un pH 7.2 con HCl  
concentrado  
Aforar a 1L  
Esterilizar en autoclave.

SSC (Citrato de sodio salino)

Para 100 ml  
17.53 g NaCl  
80 ml de agua  
Ajustar a pH 7.0 (NaOH 1N)  
Aforar a 100 ml  
Esterilizar en autoclave.

TAE (Amortiguador Tris-acetatos)

Para 1L a 50X  
242g Tris base  
57.1 ml ácido acético glacial  
100 ml EDTA 0.5M pH 8.0  
Aforar a 1L