



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

DETERMINACIÓN DE DESBALANCES  
CROMOSÓMICOS USANDO MICROARREGLOS DE  
HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA EN  
LESIONES ESCAMOSAS INTRAEPITELIALES DE  
ALTO GRADO DEL CERVIX UTERINO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

HUGO ARREOLA DE LA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. MAURICIO SALCEDO VARGAS

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme realizar mis estudios de Maestría.

Agradezco a los apoyos recibidos por parte de CONACYT, por la beca recibida durante la Maestría.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, por su apoyo y crítica para la realización del presente proyecto de investigación.

Agradezco al Dr. Mauricio Salcedo, por permitirme formar parte de su grupo de investigación desde hace ya varios años y por su apoyo y orientación en el presente trabajo.

## **INDICE**

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>05</b>
<b>II. ABSTRACT.....</b>	<b>06</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>07</b>
<b>3.1 CÁNCER CERVICO UTERINO.....</b>	<b>07</b>
<b>3.2 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y CACU.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA (HGC).....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 LIMITACIONES DE LA HGC SOBRE CROMOSOMAS.....</b>	<b>21</b>
<b>V. HGC SOBRE MICROAREGLOS.....</b>	<b>22</b>
<b>VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>VII. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>VIII. HIPOTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>IX. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>29</b>
<b>9.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>29</b>
<b>X. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>10.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>10.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....</b>	<b>33</b>

10.3 MARCAJE DE LAS SONDAS PARA LOS ARREGLOS DE HGC.....	34
10.4 HIBRIDACIÓN DE LAS SONDAS MARCADAS SOBRE LOS ARREGLOS DE HGC.....	34
10.5 CAPTURA DIGITAL DE IMÁGENES Y ANÁLISIS.....	36
XI. RESULTADOS.....	42
11.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	45
XII. DISCUSIÓN.....	58
XIII. CONCLUSIONES.....	63
XIV. LITERATURA CITADA.....	64

## ***I. RESUMEN***

El Cáncer cérvico uterino (CaCu), representa la segunda neoplasia femenina más común a nivel mundial, en mortalidad. En México, es la neoplasia maligna con mayor incidencia entre la población femenina. El principal agente etiológico asociado al CaCu es la infección por Virus de Papiloma Humano, sin embargo, el largo periodo de latencia entre la infección y el desarrollo del tumor, así como el hecho de que no todas las pacientes infectadas desarrollan cáncer, hacen evidente que son necesarias otras alteraciones en la célula para que se de la transformación. Las técnicas de citogenética tradicionales han permitido detectar alteraciones limitadas en CaCu, sin embargo, la aplicación de técnicas moleculares han rendido mejores frutos. En este trabajo utilizamos la metodología de hibridación genómica comparativa sobre microarreglos (CGH arrays), así como diversas herramientas bioinformáticas para determinar nuevas alteraciones en lesiones precursoras de alto grado cervicales, ya que en estas regiones se pueden encontrar genes que jueguen un papel importante en los primeros eventos de transformación del epitelio cervical y en el mantenimiento del fenotipo transformado. A través de este estudio se encontraron nuevas alteraciones cromosómicas que se están presentando en las lesiones precursoras, caracterizado por la tendencia a la pérdida mínima de material genético. Asimismo, se encontraron alteraciones que corresponden a lo ya encontrado en estudios con CaCu, como la pérdida de casi todo el 19 y 20, así como, la identificación de posibles genes que se alteran en lesiones precursoras. En conclusión, este trabajo permitió encontrar nuevas alteraciones en lesiones precursoras, donde se pudo observar que son mínimas las alteraciones con respecto a lo ya reportado con muestras invasoras, asimismo, representa el primer estudio que abarco todo el genoma.

## ***II. ABSTRACT***

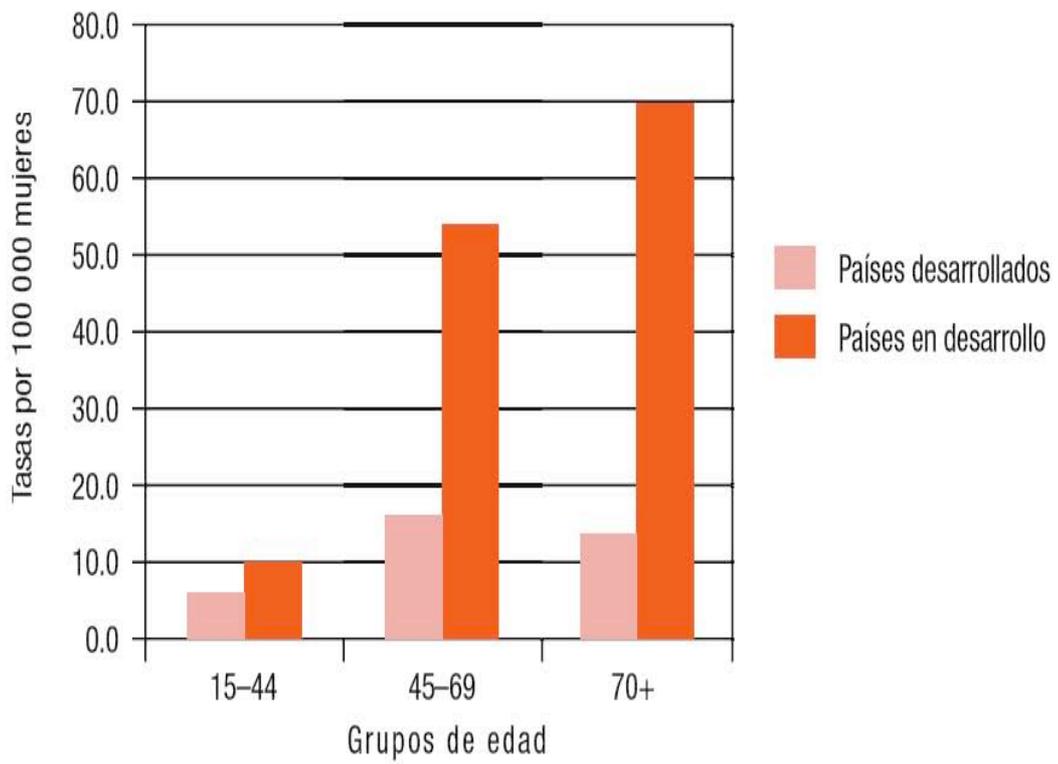
Cervical cancer (CC) represents the second most common female neoplasia in worldwide in mortality. In México, this disease is the neoplasia with more incidences among the female population. The main agent etiológico associated to CC is the infection with Human Papillomaviruses (VPH). However, the long period of latency between the infection and the development of the tumor, as well as the fact that not all the infected patients develop cancer, make evident that are necessary other alterations in the cell so that transforming. Traditional techniques of cytogenetic have allowed detecting alterations limited in CC, however, the application of molecular techniques have surrendered better results. In the present work we used the methodology of comparative genomic hybridization on arrays (CGH arrays), as well as diverse bioinformatics tools for determining news of chromosomal imbalances in high grade cervical lesions, due to in these regions can be genes that play an important role in the first events of transformation of the cervical epithelium and in the maintenance of the transformed phenotype. We found that there is a tendency to loss genetic material and we found to chromosomal imbalances previously reported in cervical cancer as the loss the almost all de chromosome 19 and 20. In conclusion, this work allowed to define a possible news chromosomal imbalances that could characterizing the high grade cervical lesions, where we could observe that there are minimum the alterations with regard to the already reported with invasive samples, also, there is a tendency to loss genetic material.

### **III. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 Cáncer cervico uterino**

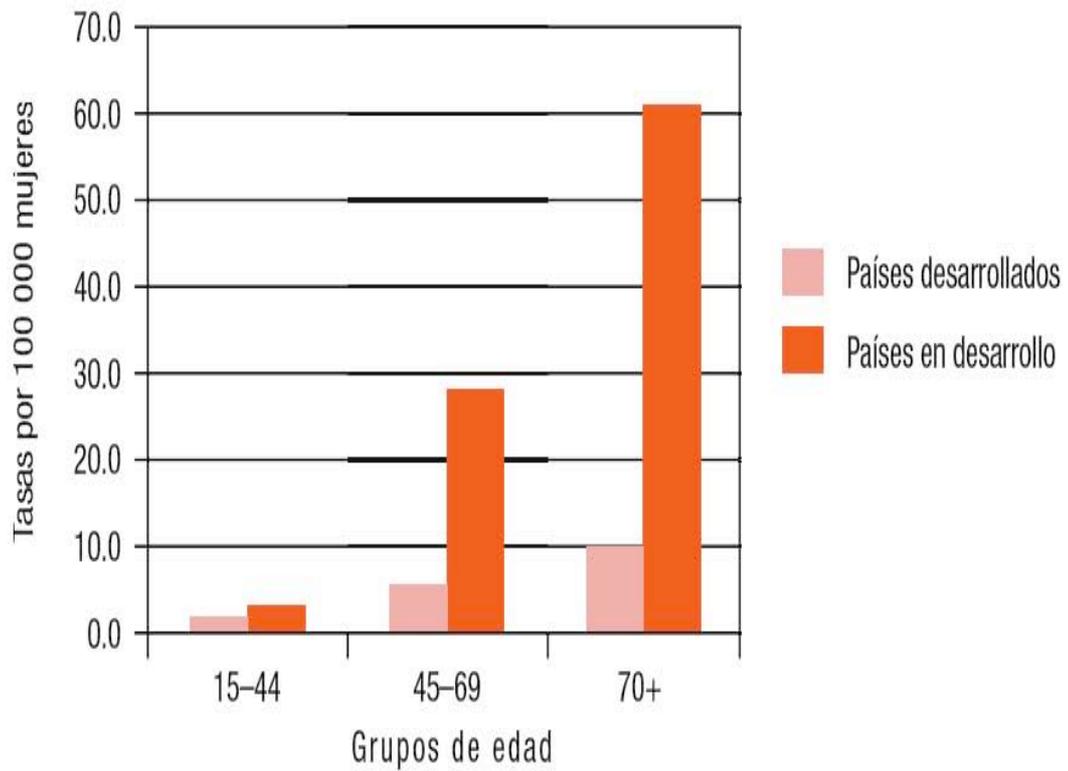
En el año 2005, se registraron, de conformidad con las proyecciones de la OMS, más de 500, 000 casos nuevos de cáncer cervico uterino (CaCu), de los cuales el 90% correspondía a países en desarrollo. Se estima que un número superior al millón de mujeres padecen actualmente de CaCu en el mundo, la mayoría de las cuales no están diagnosticadas o carecen de acceso a tratamientos que podrían curarlas o prolongarles la vida. Ese año, alrededor de 260 000 mujeres fallecieron de la enfermedad y cerca del 95% de esas defunciones ocurrieron en países en desarrollo; todo ello convierte al CaCu en una de las amenazas más graves para la vida de la mujer (1). En muchos países en desarrollo se tiene un acceso limitado a servicios de salud y la detección del CaCu, no se practica o bien se practica en unas pocas mujeres que lo necesitan. En dichas regiones, el CaCu es el cáncer más frecuente en la población femenina y la primera causa de mortalidad de cáncer entre las mujeres (1) (Gráfica 1 y 2). Las tasas más altas de incidencia anual se encuentran en algunos países de centro y Sudamérica (93.8 por cada 100,000 mujeres en Haití, con la incidencia nacional más alta del mundo), en África del Sur (61.4 por cada 100,000 mujeres en Tanzania), y Asia (30 por cada 100,000 mujeres en la India) (2).

Durante el 2006 alrededor de 800 mujeres murieron cada día en todo el mundo por CaCu, y cada día 12 de esas muertes ocurrieron en México (3). En 1990 la tasa de mortalidad en México era del 24.97%, y esta cifra se redujo a 15.07% en 2005. Las 12 mexicanas en promedio que mueren por esta enfermedad cada día siguen representando una cifra muy alta (3, 4).



**GRAFICA 1**

Tasa de incidencia de CaCu, normalizada según la edad, en países desarrollados y en desarrollo (1).



## GRAFICA 2

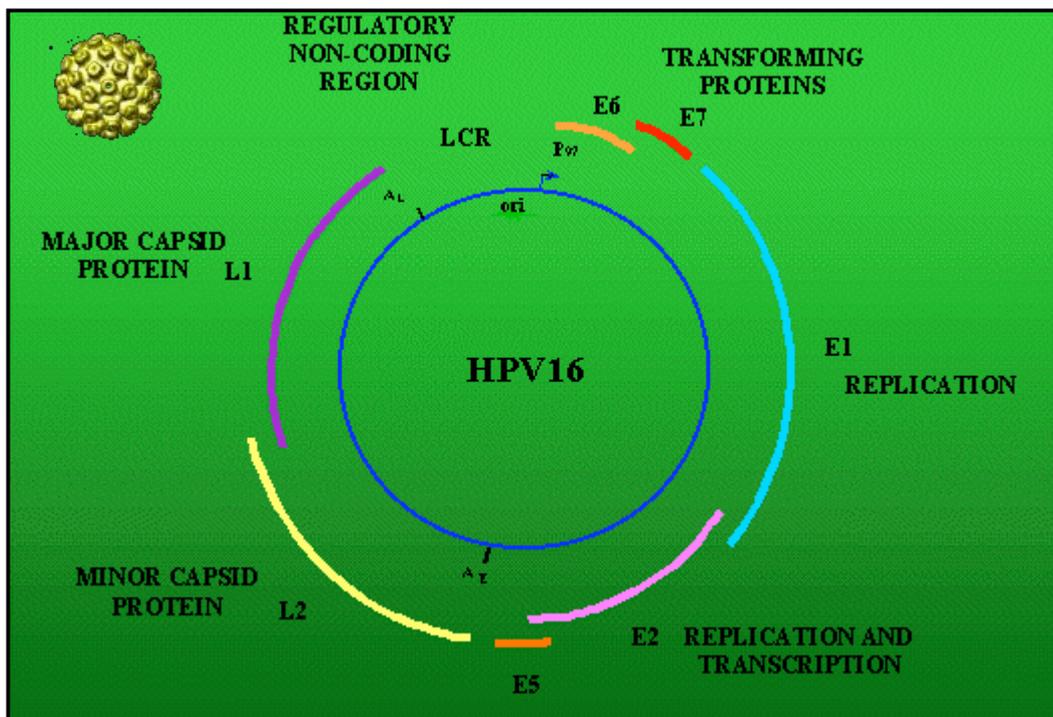
Tasa de mortalidad de CaCu, normalizada según la edad, en países desarrollados y en desarrollo (1).

### **3.2 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y CaCu**

Existen diversos factores que están asociados al desarrollo del CaCu, donde tenemos el inicio de una vida sexual a edad temprana, múltiples parejas sexuales, tener antecedentes de otras enfermedades transmitidas sexualmente, uso prolongado de anticonceptivos orales y el tabaquismo (5, 6). Sin embargo, el principal factor etiológico asociado al desarrollo del CaCu, es la infección por Virus de Papiloma Humano (VPH), un factor sexualmente transmisible. El VPH induce la transformación celular por medio de la inhibición de los mecanismos de regulación del ciclo celular (proliferación, apoptosis, diferenciación celular, control de la expresión genética, etc.), que traen como consecuencia alteraciones del fenotipo celular (7-9). Estudios recientes, utilizando metodologías muy sensibles de detección, han confirmado una positividad a VPH en el 99.7% de los casos de CaCu (10).

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, y comprenden alrededor de 120 tipos distintos (11). Son virus de DNA de doble cadena circular envuelto en una cubierta proteica llamada cápside. Su genoma se compone de dos grupos funcionales de marcos de lectura abiertos, llamados tempranos (E), y tardíos (L); están separados por una Región Larga de Control (LCR), que es necesaria para la replicación viral normal y el control de la replicación de genes (12). En la región temprana se encuentran genes que participan en la replicación viral y la immortalización celular, por ejemplo E6 y E7. La principal función biológica de

E6 hasta la fecha parece ser la inactivación de la proteína supresora de tumor p53. Por su parte, E7 es capaz de formar complejos con varias proteínas celulares, incluyendo a la proteína supresora de tumor retinoblastoma (pRb). Finalmente, los genes de la región tardía codifican para proteínas de los capsómeros (13) (figura 1). En general, los tumores sufren una continua acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que les permiten escapar de los controles de regulación celular y ambiental.



**Figura 1**

**Organización del Genoma Viral del VPH. Tomando como modelo al VPH tipo 16, donde se puede distinguir sus tres regiones principales (temprana, tardía y la región larga de control) (14).**

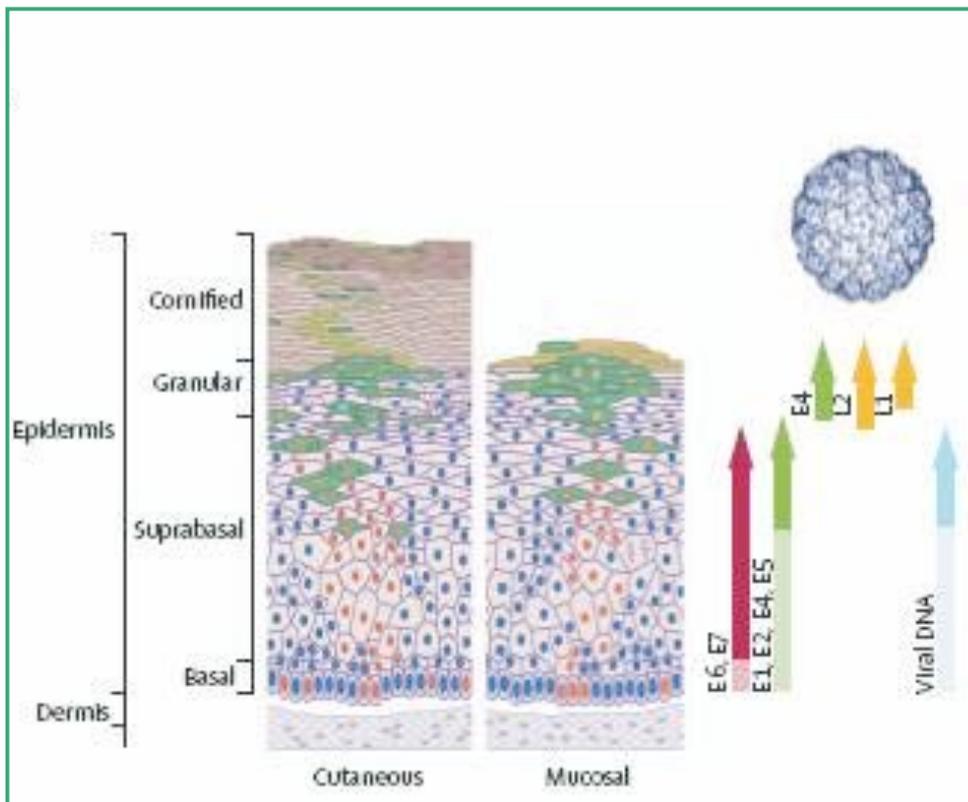
El largo periodo de latencia entre la infección y el desarrollo del tumor, así como el hecho de que no todas las pacientes infectadas desarrollan cáncer, hacen evidente que son necesarias otras alteraciones en la célula para que se de la transformación. Cada una de estas alteraciones y sobre todo, la cooperación entre cada una de ellas, es importante para la aparición y desarrollo de tumores cervicales durante las distintas etapas de la progresión, sobre todo aquellas que le permita a ciertas clonas celulares adquirir características que representen ventajas de crecimiento frente a las celulares normales (15, 16).

Uno de estos procesos lo constituye la inestabilidad cromosómica. En este trabajo, nos enfocaremos en particular al análisis de las alteraciones citogenéticas que se encuentran en lesiones precursoras de alto grado del cervix, que surgen durante la progresión del CaCu, las cuales pueden originarse durante el fenómeno de inestabilidad genómica.

La inestabilidad genómica puede otorgarle a la célula transformada una mayor plasticidad y se ha propuesto como uno de los motores de la progresión neoplásica, ya que dicho fenómeno se ha detectado desde etapas muy

tempranas de la carcinogénesis en una gran variedad de tumores (17) (figura 2).

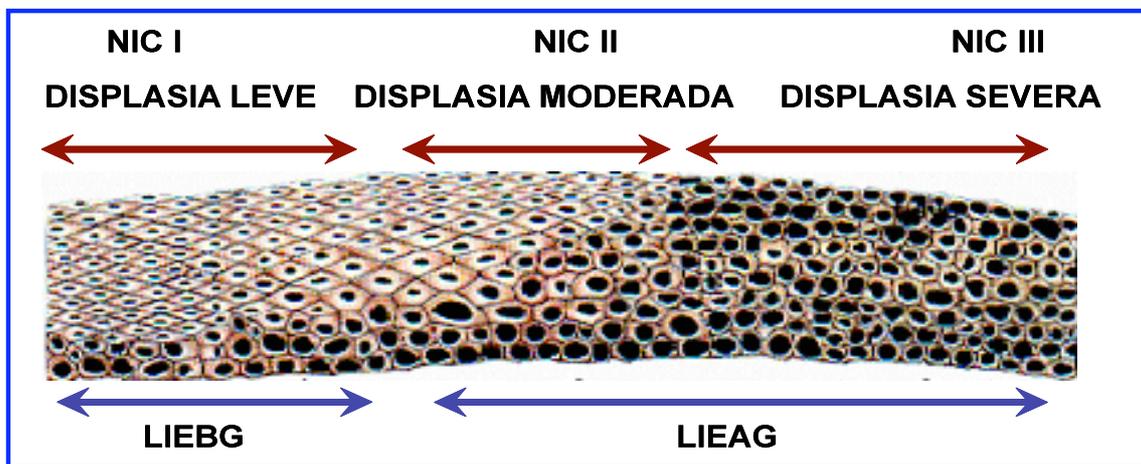
El proceso de inestabilidad genómica implica un cambio dinámico, donde se ve reflejado en alteraciones en el complejo genómico celular. De particular importancia resulta el estudio de este proceso de alteraciones genómicas, el cual se puede abordar mediante el análisis citogenético.



**Figura 2**

Historia natural de la infección de infección por VPH en el epitelio cervical, donde se observa la inestabilidad genómica desde etapas muy tempranas de la diferenciación del epitelio provocada por acción y efecto del VPH (7).

Previo al CaCu, se pueden distinguir una serie de etapas previas al desarrollo del mismo, denominadas neoplasias intraepiteliales cervical (NIC), que van del grado 1 al 3, asimismo, y de acuerdo a la nomenclatura de Bethesda las podemos dividir en lesiones de bajo grado (LIEBG) y de alto grado (LIEAG) en función de la cantidad de epitelio cervical que ocupa dicha lesión (18) (figura 3).



**Figura 3**

Representación de las NIC I (**lesión de bajo grado**), NIC II y NIC III respectivamente (**lesión de alto grado**).

La mayoría de las lesiones leves revierten espontáneamente (19). Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. Sin embargo, la mayoría son transitorias y sólo el 25% desarrollan una LIEBG. Después, sólo del 20 al 40% de estas LIEBG progresarán a LIEAG. Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, sólo del 5 al 10% de ellas desarrollarán una LIEAG (19, 20).

Estudios histopatológicos previos a 1960 demostraron anomalías mitóticas, no solo en CaCu, sino también en NICs (21). Gracias a la disponibilidad de material entre los 60s y 70s permitieron un gran número de estudios cromosómicos, que fueron muy limitados porque no se habían desarrollado todavía las técnicas de bandeado de cromosomas. En general estos estudios mostraron que así como en el CaCu, las lesiones (NICs), también tienen sus características en cuanto a desbalances cromosómicos. Tales desbalances indicaban principalmente aneuploidías (21).

Después de los 70s y gracias a las técnicas de bandeado cromosómico facilitaron el estudio de dichas anomalías cromosómicas principalmente en CaCu, pero la complejidad de los rearrreglos cromosómicos impedían seguir avanzando en el estudio.

Posteriormente gracias a estudios de cariotipo, pérdida de heterocigocidad y más recientemente por medio de la hibridación genómica comparativa (HGC), se pudo seguir avanzando (22). Los estudios han sido básicamente con muestras de CaCu y líneas celulares (21), revelando cromosomas implicados

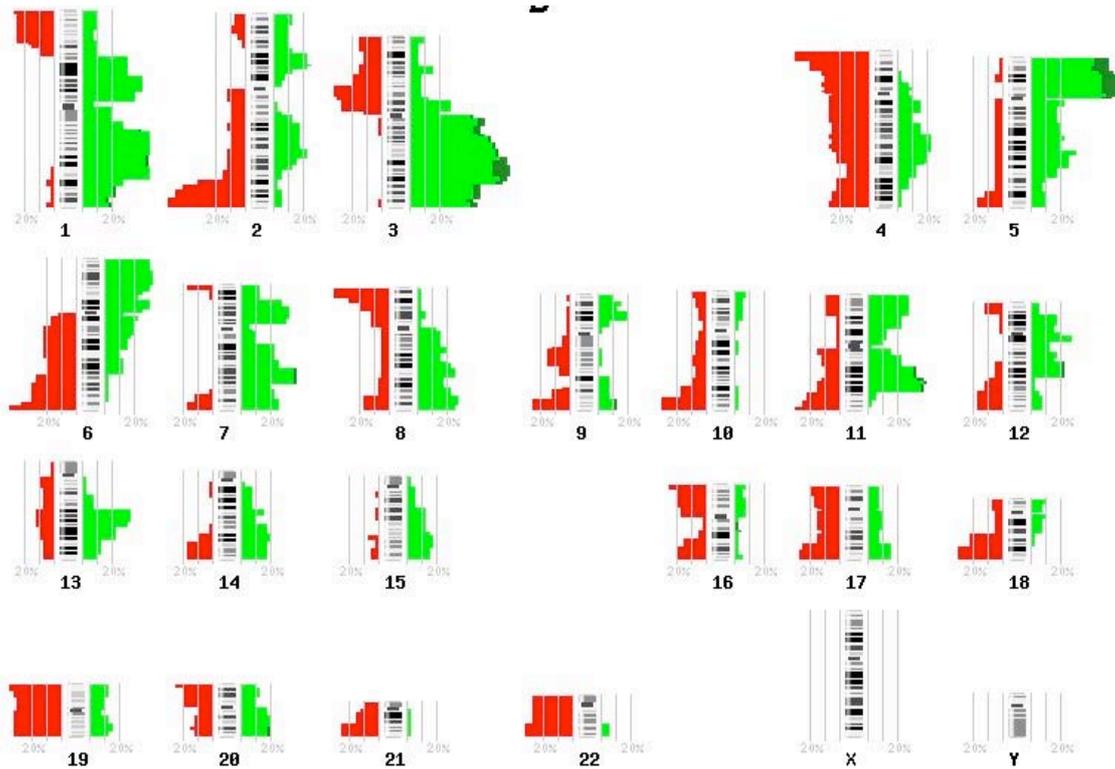
en cambios estructurales en los cromosomas 1,3q, 5p, 11p, 17, X, en muestras con CaCu en pérdida o ganancia de dichas regiones cromosómicas. Con los que respecta NICs, los estudios pocos e insuficientes, pero de los existentes muestran cambios implicando los cromosomas: 1, 3q, 5p, y el 11 que ha sido raramente reportado (21). Como hemos visto los estudios clásicos muestran muy poca evidencia de cambios sustanciales representativos de las NICs, asimismo, la vasta mayoría de los mismos se basan en muestras con CaCu, o líneas celulares.

Otros estudios marcan la ganancia del 3q como un indicador en la transición de una displasia severa (carcinoma *in situ*) a un carcinoma invasor (23), que contrastan con resultados de otros grupos donde no encuentra la ganancia del 3q en ninguna de sus muestras con NIC III (24).

En general por medio de HGC se han identificado cambios cromosómicos en varias regiones; pérdida del 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 11q, 13q, y 18q y ganancia del 1q, 3q, 5p, y 8q en varios estadios del CaCu. Se ha sugerido que la ganancia del 3q puede ser el cambio más consistente durante la transición de una NIC III a CaCu (25). En otros estudio con NICs por medio de HGC se ha visto en pérdidas el 5p y Xq como los más persistentes pero sólo en 5/34 muestras, y en ganancias el 3q (26).

Estudios con lesiones precursoras por medio de HGC, encontraron un patrón recurrente entre lesiones precursoras y CaCu, siendo en CaCu mayor el número de desbalances, siendo la ganancia del 3q la más representativa en ambos casos, con un 35% en las lesiones y un 72% en las invasoras (27). Asimismo nuestro grupo trabajando con muestras de CaCu por medio de HGC, donde ya se cuenta con más de 300 muestras procesadas, que se puede

consultar en la página <http://progenetix.blogspot.com/>, se ha llegado a obtener un patrón global de desbalances, donde se ve la ganancia del 3q y del 5p, así como la pérdida del cromosoma 4, que concuerda con lo ya reportado en la literatura para dicha neoplasia (figura 4)(22, 28).



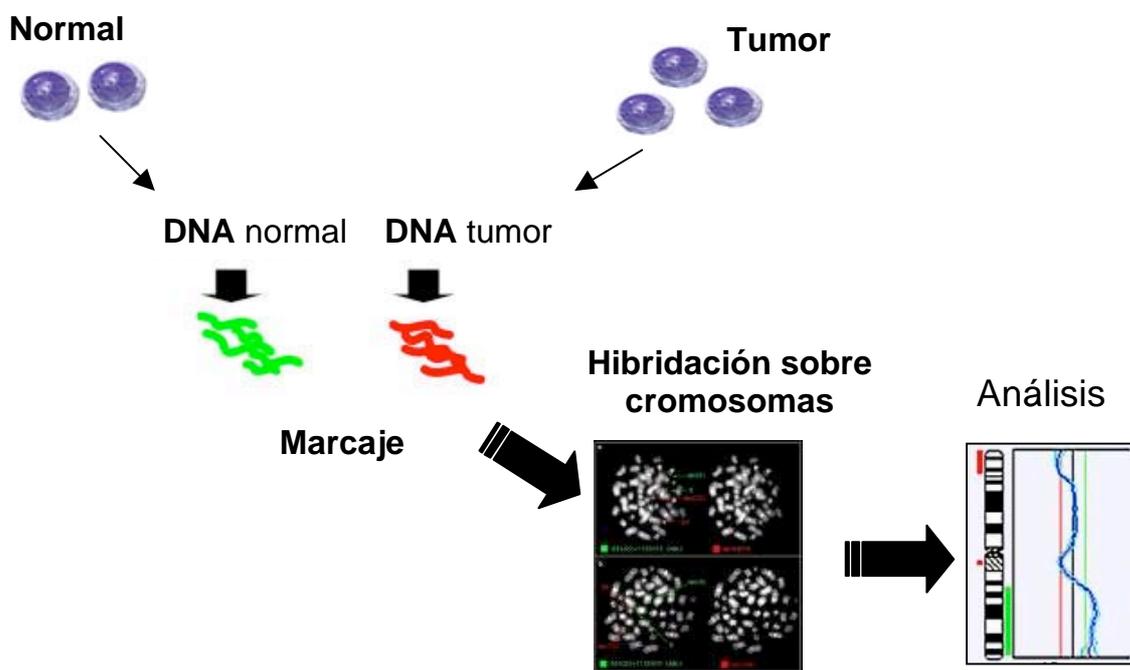
**Figura 4**

Desbalances cromosómicos detectados en más de 402 muestras hasta abril del 2008 derivadas de tejidos con CaCu mediante HGCm y microarreglos. El histograma representa las alteraciones de más de 334 muestras, la curva de incidencia a la izquierda de los ideogramas (rojo), representa la pérdida de ADN, la curva a la derecha (verde), representa la ganancia de ADN.

#### **IV. Hibridación genómica comparativa (HGC)**

En las dos últimas décadas hemos sido testigos de un impresionante avance en lo que se refiere al entendimiento del funcionamiento de celular normal, y de cómo se modifica dicho funcionamiento en células tumorales. Este avance a sido posible gracias al desarrollo de nuevas metodologías de análisis global, las cuales nos permiten detectar, analizar y cuantificar la presencia de moléculas de importancia biológica. La hibridación genómica comparativa es una metodología de análisis genómico que sólo requiere como fuente de análisis el ADN tumoral, obteniéndose un mapa genómico de las regiones de pérdida o ganancia de material genético en un solo experimento de hibridación (29). La HGC tiene su fundamento en la comparación de dos poblaciones de DNA genómico, una proveniente de la muestra tumoral y la otra proveniente de una muestra de referencia cariotípicamente normal. Cada una de estas poblaciones es marcada diferencialmente utilizando fluorocromos diferentes. Por convención, el genoma tumoral se marca con isotiocinato de fluoroceína (FITC, verde) y el genoma de referencia con tetrametil rodamina (TRITC, rojo). Ambas poblaciones genómicas se marcan diferencialmente en cantidades equimolares y se utilizan como sondas para una reacción de hibridación (en presencia de ADN cot-1 no marcado), sobre cromosomas en metafase de un sujeto cariotípicamente normal. La hibridación de estas sondas se lleva a cabo sobre sus secuencias complementarias en los cromosomas de manera competitiva, de esta forma, la cantidad relativa de ADN normal o tumoral que

puede unirse a su secuencia blanco en los cromosomas, irá en proporción a la abundancia relativa de esa secuencia en las poblaciones genómicas. El uso del ADN Cot-1 no marcado es para bloquear las secuencias cromosómicas altamente repetitivas presentes en las regiones centroméricas de los cromosomas, eliminando hibridaciones no específicas en este tipo de regiones. Después de que la hibridación se lleva a cabo la captura digital de las imágenes. Posteriormente un programa específicamente diseñado para este tipo de análisis empalma las tres imágenes capturadas (la imagen de la metafase normal, la imagen de la señal del genoma tumoral y la imagen de la señal del genoma normal de referencia), para producir una imagen compuesta, la cual es sometida a un análisis digital de imagen. De esta forma, una vez hibridados los genomas normal y tumoral sobre los cromosomas, las diferencias en la intensidad de cada fluorocromo se interpretan como cambios en el número de copias entre ambos genomas (figura 4).



**Figura 4**

**Metodología de Hibridación genómica comparativa.** El ADN se extrae tanto de células tumorales como de normales. Posteriormente se marcan con rodamina (tumor), y fluoresceína (normal), por medio de "nick translation", una vez mezclados en cantidades equimolares, ambos ADNs se utilizan como sondas de hibridación sobre cromosomas en metafase de un sujeto cariotípicamente normal. Una vez hibridado se lleva a cabo la captura de imágenes por medio de un microscopio de epifluorescencia, para después realizar el análisis de cambios en el número de copias a lo largo de todos los cromosomas.

#### **4.1 Limitaciones de la HGC sobre cromosomas**

A pesar de su gran capacidad de análisis y de la abundante información que ofrece, el método tiene sus limitaciones, entre las que podemos mencionar que el resultado del experimento refleja un promedio de las alteraciones presentes en la totalidad de las células analizadas, por lo que es muy importante asegurarse de que al menos el 60% de las células analizadas provengan del tejido tumoral mediante el análisis histopatológico del tejido del cual se obtiene el ADN. La HGC solamente detecta alteraciones en el número de copias en el ADN, pero no detecta translocaciones recíprocas, rearrreglos cromosómicos o cambios en la ploidía. Sin embargo, la mayor limitación de la HGC sobre cromosomas en metafase la constituye su limitada sensibilidad, así como el hecho de la necesidad de evaluar una gran cantidad de cromosomas en cada experimento para la obtención de un resultado adecuado, hace necesario la utilización de otras herramientas de análisis global para la detección de desbalances cromosómicos. Por otro lado, debido a estas limitaciones en la sensibilidad para detectar pequeñas alteraciones, los datos derivados de HGC sobre metafase nos ofrecen muy poca información acerca de los posibles genes específicos que son blancos de cambios en su número de copias, indicando únicamente la presencia de alteraciones en regiones citogenéticas que pueden contener una gran cantidad de genes dentro de ellas.

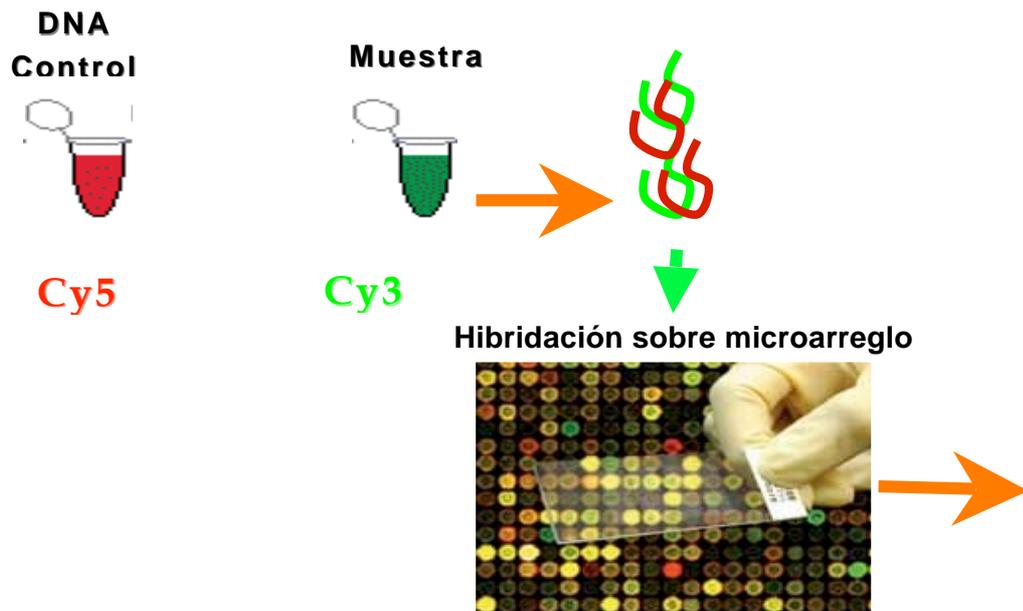
Para solventar algunas de estas limitaciones, sobre todo la de sensibilidad, diversos grupos han desarrollado un nuevo método, los arreglos de HGC (CGH array) (30, 31).

## **V. HGC sobre microarreglos.**

Un microarreglo, está constituido por secuencias de ácidos nucleicos que previamente han sido caracterizados, los cuales están ordenados e inmovilizados sobre una matriz sólida, que puede ser nylon, cristal o plástico, generalmente formando una matriz de puntos. Cada punto representa un gen y la posición de cada gen dentro de la matrix esta perfectamente ubicada. En general, el fundamento de los microarreglos es similar al de la HGC, dos poblaciones experimentales, ya sean de ADN o ADNc obtenido a partir de los genes expresados en diferentes condiciones experimentales (por ejemplo, tejido normal contra tumor), son marcados diferencialmente utilizando fluorocromos, cada sonda competirá por hibridar sobre su complementario en el microarreglo, y de igual forma que en la HGC, la evaluación de la intensidad de la fluorescencia entre las sondas hibridadas será una representación de la abundancia relativa de cada una en la población inicial. Una vez hibridados, se capturan las imágenes en los diferentes canales de cada fluorocromo utilizando un "scanner" y se obtienen la relación de intensidades de fluorescencia para cada fluorocromo. Finalmente, los datos se deberán analizar para determinar la tasa de expresión o el número de copias para cada uno de los genes representados en el arreglo.

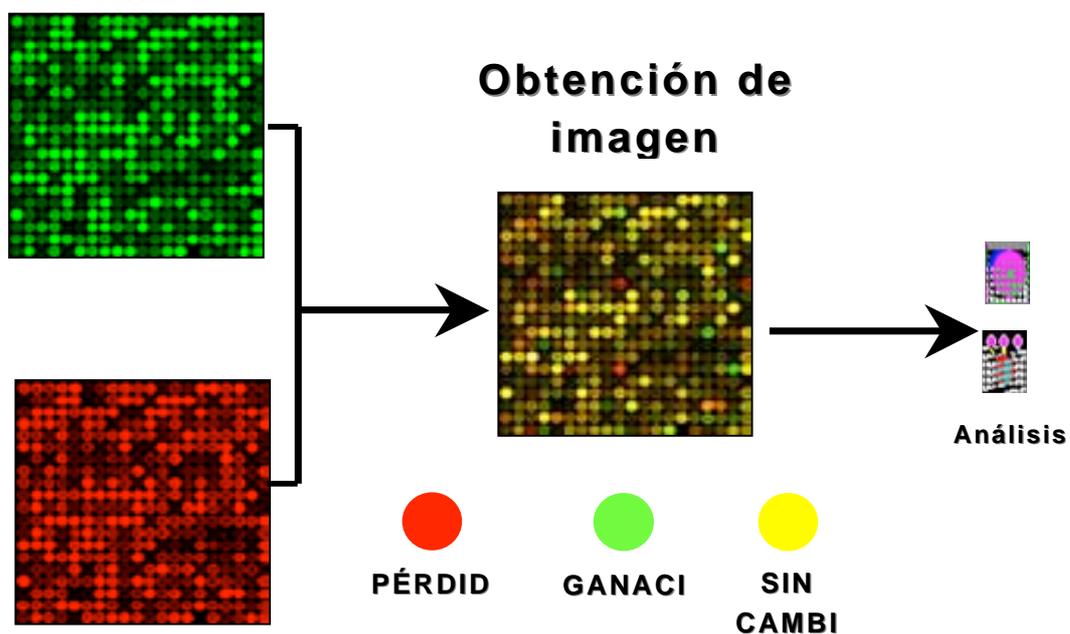
Por otra parte, uno de los beneficios alternos de la Secuenciación del Genoma Humano, fue la construcción de diversos vectores que contienen clonados fragmentos discretos de los cromosomas humanos, los cuales fueron utilizados para llevar a cabo la secuenciación del genoma de una manera ordenada. De tal forma que fue necesario conocer primero la localización citogenética exacta de cada una de estas clonas, así como el orden en que se encontraban cada una de ellas sobre los cromosomas. Este esfuerzo de mapeo puso a disposición de los investigadores un grupo de clonas que representaran secuencias particulares del genoma humano, perfectamente mapeadas y con una correlación directa con el genoma humano.

En la HGC sobre microarreglos se sustituyen las preparaciones de cromosomas en metafase por estas clonas, generalmente representadas en cromosomas artificiales de bacterias (BACs). Estas clonas son ordenadas sobre soportes de sólidos utilizando un robot micro-arreglador y sirven como blanco para la hibridación (figura 5 y 6), siguiendo una metodología muy similar a la utilizada en la HGC sobre metafase. De tal forma que la sensibilidad de los microarreglos dependerá del tamaño de las sondas inmovilizadas sobre el cristal (30, 31).



**Figura 5**

**Metodología de arreglo de Hibridación Genómica Comparativa.** Se hace la extracción de nuestros ADNs normal y tumoral, se marcan con flurocromos Cy5 para el ADN normal y Cy3 para nuestro ADN tumoral. Una vez marcados se mezclan en cantidades equimolares para hibridarlos sobre la laminilla con el microarreglo.



**Figura 6**

**Obtención de imagen.** Una vez hibridado se lleva a cabo la captura de imagen con ayuda de un scanner. Se lee el arreglo en sus diferentes canales, para después con ayuda de programas especializados para cada tipo de microarreglo realizar el análisis de cambios en el número de copias a lo largo de todos los cromosomas.

Otra ventaja de los microarreglos, además de su mayor resolución es el mejor rango dinámico que se obtiene en estos experimentos en comparación con los cromosomas en metafase, la correlación directa entre los blancos impresos en el arreglo y la secuencia del genoma humano y la facilidad de analizar un alto

número de muestras de manera automatizada, abriendo las puertas de la aplicación del método al ámbito diagnóstico (32).

La HGC sobre microarreglos ha sido aplicada también al estudio de la biología del cáncer, utilizándose arreglos dirigidos a ciertas regiones particulares del genoma (33, 34), regiones particulares que comúnmente sufren alteraciones en su número de copias en diferentes tumores (35), o utilizando microarreglos que cubren la totalidad del genoma humano (36). En todos los casos, la HGC sobre microarreglos ha detectado alteraciones que fueron pasadas por alto con por la HGC sobre metafase, lo que demuestra mucho mayor sensibilidad de los microarreglos de HGC. La HGC sobre microarreglos está abriendo la posibilidad de llevar a cabo clasificación de los tumores en base a sus patrones de alteraciones cromosómicas. Asimismo, dichos arreglos han permitido analizar de una manera más profunda las alteraciones previamente detectadas por medio de la HGC sobre cromosomas (37). También se ha utilizado la HGC en forma paralela con otras técnicas como el análisis de expresión por microarreglos de ADNc como una forma más rápida y poderosa de identificar genes importantes en la oncogénesis. Pollack y colaboradores, utilizaron microarreglos de ADNc para estudiar alteraciones en el ADN de muestras de tumor mamario y en forma paralela, utilizaron estos mismos microarreglos de ADNc para estudiar los cambios de expresión a nivel de ARN en las mismas muestras (38). Con esta metodología, pudieron demostrar que existe un alto grado de correlación entre las alteraciones a nivel de ADN y los cambios de expresión a nivel del ARN.

La aplicación de los métodos de análisis genómicos de alto rendimiento, como es la HGC sobre microarreglos, genera una gran cantidad de información, de la

cual es necesaria extraer lo más relevante, haciendo uso de diversas herramientas y de minado de datos. El manejo de grandes cantidades de información, así como la relación de estos datos con lo reportado e las bases de datos biológicos disponibles en la red, así como el análisis matemático de estas relaciones, ha dado lugar al surgimiento de una nueva área de las Ciencias Biológicas: la bioinformática.

La bioinformática es el campo de la ciencia en donde la biología, las ciencias computacionales y las tecnologías de manejo de la información se unen para dar lugar a una nueva disciplina (39). La bioinformática ha venido evolucionando para combinar toda esta información biológica, para poder dar una visión global de lo que esta pasando en un momento dado el la célula normal como en su contraparte tumoral. Asimismo, la bioinformática ha permitido el desarrollo de nuevas herramientas que permiten el análisis de diferentes plataformas experimentales (SAGE, HGC sobre microarreglos, etc.), así como el desarrollo de nuevos algoritmos que nos permitan hacer correlaciones biológicas que a simple vista pasa desapercibidas al analizar grandes cantidades de datos.

De esta forma la bioinformática es vital para el desarrollo y análisis de las herramientas de análisis global que hoy en día se utilizan y para aquellas que se seguirán desarrollando. En el presente trabajo haremos uso de dichas herramientas de análisis global, así como de algunos programas para determinar el patrón de alteraciones cromosómicas en lesiones precursoras de alto riesgo del cervix uterino.

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El CaCu representa la segunda neoplasia femenina más común a nivel mundial y la primera causa de mortalidad en la población femenina de México, constituyendo uno de los problemas de salud más importantes de nuestro país. Como sabemos el principal factor etiológico asociado a esta neoplasia es la infección por VPH, pero debe de haber otros factores genéticos que deben estar determinando la progresión de una lesión precursora a un cáncer. De particular importancia resultan las alteraciones que se presentan en lesiones precursoras, las cuales se mantienen en etapas posteriores de la progresión. Es posible que en estas regiones se ubiquen genes que juegan un papel en los primeros eventos de la transformación del epitelio cervical y en el mantenimiento del fenotipo transformado. De lo anterior, con la finalidad de resolver dicho problema se planteo la hipótesis mencionada a continuación y se establecieron los siguientes objetivos.

## **VII. JUSTIFICACIÓN**

El CaCu se desarrolla pasando por varias etapas previas al mismo, desde un epitelio normal, pasando por lesiones precursoras de bajo y alto grado para de esta manera llegar al carcinoma in situ, tumores invasores y metástasis en otros órganos del cuerpo. Las lesiones son morfológicamente distinguibles en cada etapa de la progresión, asimismo, si son detectables en etapas tempranas son curables (Histopatología y Citología). Sin embargo, el largo período de latencia entre la infección y el desarrollo del tumor, así como el hecho de que no todas las pacientes infectadas desarrollan cáncer, hacen evidente que son necesarias otras alteraciones en la célula para que se de su transformación . Hasta la fecha no se cuenta con ningún marcador molecular que pueda estar indicando la probabilidad de que una lesión precursora de alto riesgo evolucione a un tumor invasor. Entre las alteraciones que se presentan durante la progresión neoplásica se encuentran pérdida y ganancia de material genético (aneuploidía), por lo que la detección de alteraciones cromosómicas específicas en lesiones precursoras puede ser un reflejo de cambios que existen desde esta etapa y que ya se encuentran en un tumor invasor.

## **VIII. HIPOTESIS**

Es posible que haya regiones alteradas en lesiones precursoras de alto grado del cérvix, que también están presentes mayoritariamente en los carcinomas invasores del cérvix.

## **IX. OBJETIVO GENERAL**

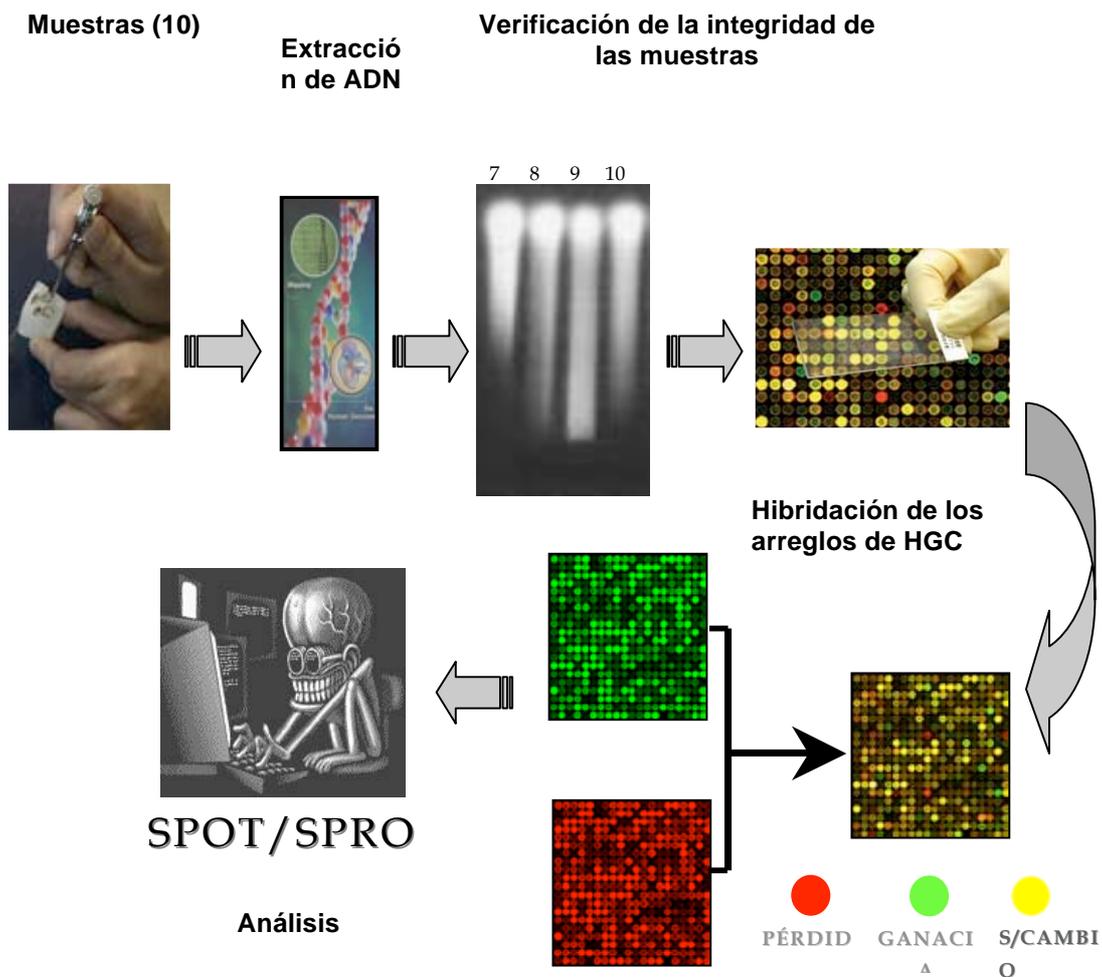
Determinar el patrón de desbalances genómicos que se alteran en lesiones precursoras de alto grado del cérvix uterino humano.

### **9.1 OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Determinar las ganancias y pérdidas de genes en el DNA genómico de las muestras mediante el uso de microarreglos Genómicos (microarreglos de HGC).
- Crear una base de datos mediante las herramientas GEO y Genome Browser UCSF y así definir los probables genes que se alteran.

## **X. MATERIAL Y METODOS**

Se analizaron en total 10 muestras mediante los arreglos de HGC. Estas muestras fueron de lesiones precursoras de alto riesgo incluidas en bloque de parafina, los resultados de dichas muestras dieron lugar a la creación de una base de datos de las alteraciones cromosómicas presentes en lesiones precursoras del cervix uterino. Esta base de datos fue evaluada utilizando diferentes herramientas de análisis bioinformática para determinar dicho patrón de alteraciones y así de esta manera determinar posibles genes que pudieran estar jugando un papel importante en la progresión. Para evitar falsos negativos o positivos, el área de interés en el tejido fue seleccionada y obtenida por punción evitando material genético proveniente de células estromales. La figura 7 presenta el esquema general seguido en esta metodología.

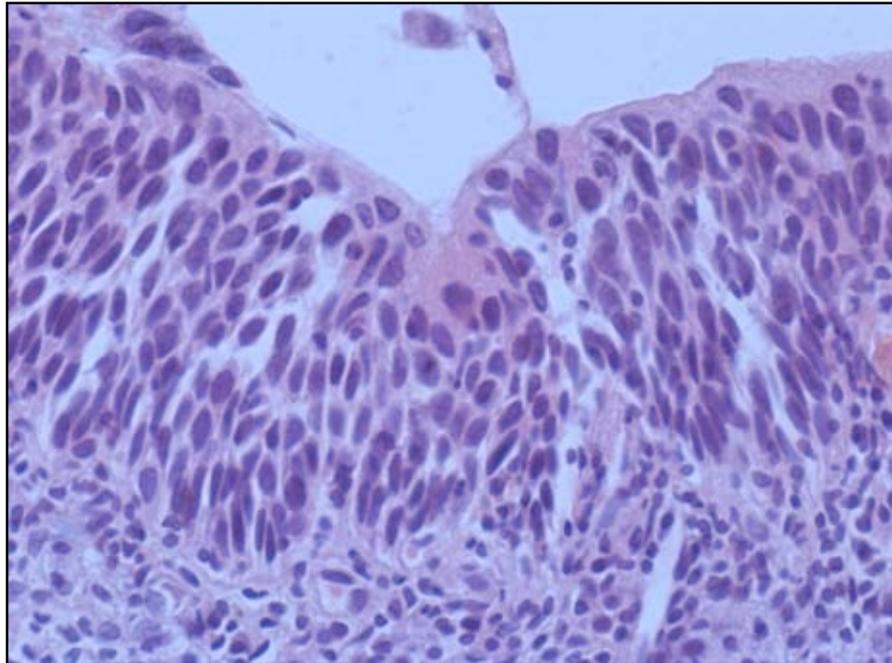


**Figura 7**

Diagrama de flujo que muestra la metodología diseñada para cumplir con los objetivos del presente trabajo. Se trabajaron 10 muestras de NIC III mediante los arreglos de HGC, para posteriormente con los programas SPOT y SPROC llevar a cabo el análisis bioinformático.

### **10.1 Muestras biológicas**

Las muestras biológicas de NIC III fueron obtenidas de los archivos de Patología en el Departamento de Ginecología Oncológica del Hospital de Oncología del Centro médico Nacional Siglo XXI-IMSS, el Departamento de Patología del Hospital General de México. El proyecto fue previamente sometido y autorizado por la Comisión Nacional de Investigación Científica, con número de registro 2006-785-089. Debidamente las muestras fueron seleccionadas, y solamente aquellas que cubrieran nuestros criterios de inclusión (muestras donde el epitelio fuera en su totalidad NIC III, para evitar sesgo en los resultados) fueron las utilizadas para las hibridaciones (en este caso sólo 10 fueron las seleccionadas para las hibridaciones) (figura 8).



**Figura 8**

Tinción de hematoxilina-eosina, donde se observa que el epitelio se encuentra cubierto en su totalidad por NIC III

## 10.2 Extracción de ADN

El ADN de los tejidos se purificó utilizando el kit de Wizard (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las áreas donde se encontraba la lesión fueron identificadas y señaladas por un patólogo en un corte histológico teñido con hematoxilina-eosina. Este corte se utilizó como guía para identificar la misma región en cortes histológicos no teñidos, de los cuales se microdisecaron 10 cortes de 10 micras para la obtención del ADN. El tejido fue depositado en tubos Eppendorf de 1.5 ml y desparafinado en xilol dos veces durante 10 minutos, seguido de rehidratación en una serie de alcoholes con concentración descendente, hasta PBS (amortiguador de fosfato salino, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1x. El tejido fue entonces centrifugado, se eliminó el PBS y se resuspendió en 600 µl de amortiguador de lisis (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.5% P/V SDS), incubándose durante 72 horas a 50°C. Después de esta incubación se adicionaron 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó por otras 24 hrs. a 50°C. Una vez completamente digerido el tejido, se adicionaron 200 µl de la solución de precipitación de proteínas (3 M NaAc) y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se centrifugó por 3 minutos a 16, 000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo que contenía 600 µl de isopropanol frío para precipitar el ADN. El ADN se centrifugó durante un min. a 16, 000 rpm y la pastilla se lavó dos veces en etanol al 70%, para ser finalmente resuspendido en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril. La calidad del ADN fue determinada mediante geles de electroforesis de agarosa al 1% y la concentración fue determinada por nanodrop.

### **10.3 Marcaje de las sondas para los arreglos de HGC**

El marcaje de nuestro ADN se llevo a cabo por el método de marcaje de random primed, siguiendo el protocolo del kit de marcaje (Invitrogen) para los arreglos de HGC. Brevemente, 800 ng de ADN genómico de las lesiones (NIC III), se mezclo con 10  $\mu$ l de la solución de random primer y se llevo a un volumen de 21  $\mu$ l con agua estéril, en un tubo eppendorf de 500  $\mu$ l. El ADN se desnaturalizo en un termociclador a 99°C por 10 min. Se centrifugo brevemente y se puso en hielo, para evitar que se volviera a renaturalizar nuestro ADN. Se le agrego 2.5  $\mu$ l de nuestra mezcla de dNTPS (8  $\mu$ l dATP 100 mM, 8  $\mu$ l dGTP 100 mM, 8  $\mu$ l dTTP 100 mM, 4  $\mu$ l dCTP 100 mM, 2  $\mu$ l Tris 1M, 0.4  $\mu$ l EDTA 0.5 M, 184.6  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O), 1  $\mu$ l de Cy3 (1mM, para el ADN de las NIC III) y 1  $\mu$ l de Cy5 (1 mM, para nuestro ADN de tejido normal), 0.6  $\mu$ l de la DNA polimerasa Klenow (40 U/  $\mu$ l). Se mezclaron y se dejaron incubando en un termociclador a 37°C toda la noche. Se puso una columna de sephadex G40 en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugo a 760 x g por 1min. Se descarto el sobrenadante. La columna se paso a un nuevo tubo de 1.5 ml y se puso cada muestra marcada dentro de la columna y se centrifugo a 760 x g por 2 min. Para remover todos aquellos nucleótidos no incorporados de nuestra mezcla de ADN. Entre más oscura se torne la muestra es un indicativo de una mayor cantidad de nucleótidos marcados.

### **10.4 Hibridación de las sondas marcadas sobre los arreglos de HGC**

Los análisis de los arreglos de HGC se llevaron acabo utilizando los microarreglos de la Universidad de San Francisco California (USA), siguiendo

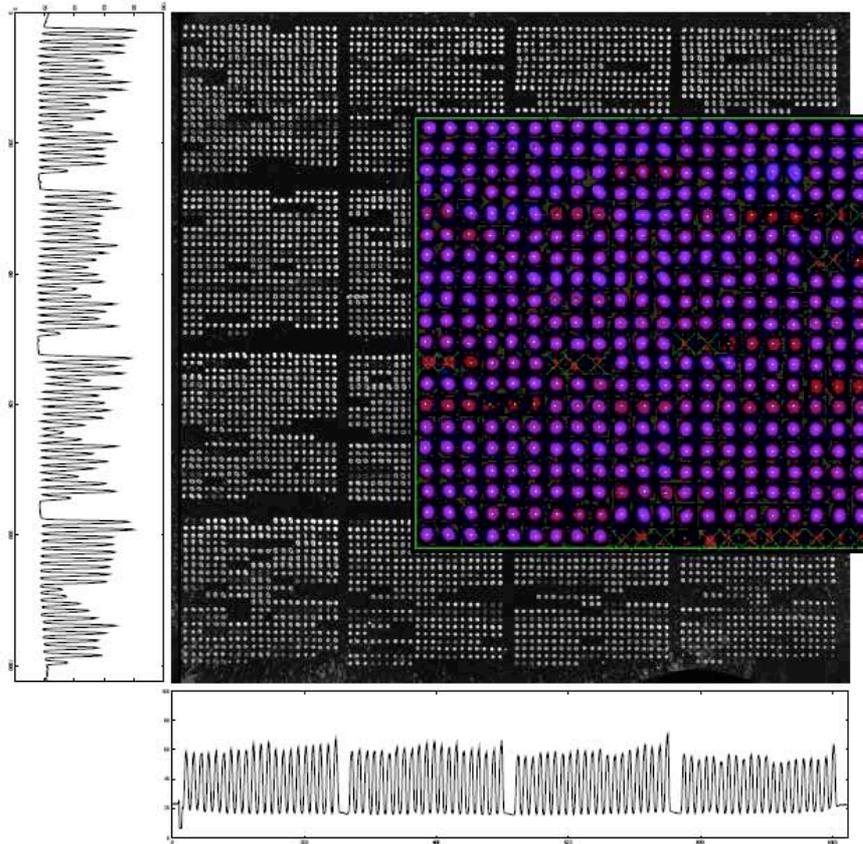
las instrucciones del proveedor. Cada microarreglo consiste de 2400 clonas, las cuales cubre la totalidad del genoma arregladas por triplicado, estando impresos dos microarreglos por laminilla. El microarreglo al cubrir la totalidad del genoma representa una herramienta útil para detectar de forma confiable alteraciones citogenéticas cuya asociación al cáncer han sido demostradas.

Brevemente el arreglo se activo en un Stratalinker a 260, 000  $\mu$ J de UV. La mezcla de hibridación se preparo combinando 30  $\mu$ l de ADN marcado tumoral (Cy3), con 30  $\mu$ l de ADN marcado normal (Cy5) y 75  $\mu$ g de ADN Cot1 humano no marcado. El ADN Cot1 representa la fracción del genoma que contiene secuencias altamente repetitivas, como las que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas, la finalidad de incluirlos en la reacción de hibridación es la de bloquear estas regiones cromosómicas con secuencias repetitivas para eliminar hibridación inespecífica de las sondas en estas regiones. A esta mezcla se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y se centrifugo a 14, 000 rpm por 45 minutos a 4°C. Se descarto el sobrenadante y se dejo secar al aire libre la pastilla de ADN durante 15 min. y se resuspendió el pellet en 7 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 14 $\mu$ l SDS 20%, y 49  $\mu$ l de solución de hibridación. Las sondas fueron desnaturalizadas 13 min. a 73°C y finalmente incubadas a 37°C durante 2hrs. Durante esta prehibridación se calienta el arreglo a 37°C y una vez terminado el tiempo de incubación se ponen las sondas en el arreglo, se pone rubber cement en los límites del arreglo y se cubre con una cubierta de silicón (gasket). La hibridación se lleva a cabo en una cámara de incubación a 37°C durante 68hrs, después de las cuales las laminillas con los arreglos se lavaron en formamida al 50%, 2x SSC (pH7) durante 15 min. a 45°C, seguido de un

lavado en buffer PN ( fosfato de sodio 0.1 M, 0.1% nonidet p-40, pH8.0) por 15 min. a temperatura ambiente. Las laminillas fueron almacenadas a 4°C en la oscuridad hasta la captura de imágenes.

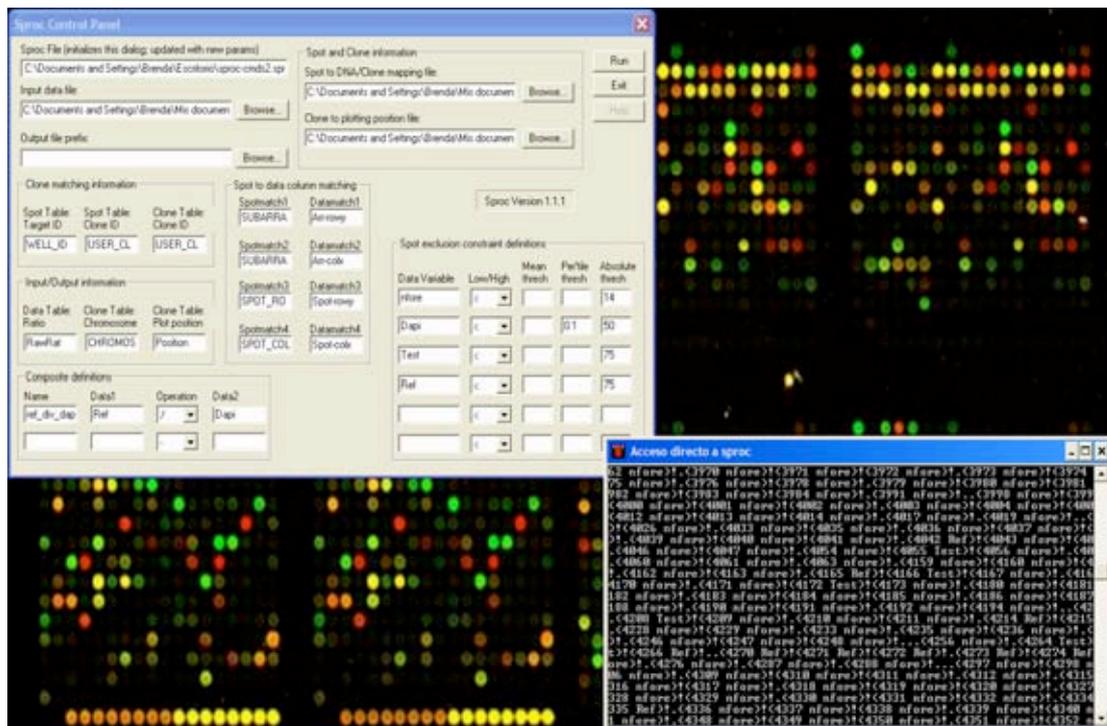
### **10.5 Captura digital de imágenes y análisis**

La visualización y captura de imagen se llevo a cabo de inmediato usando un scanner láser (Axon 4000B), que captura de manera automatizada las imágenes del arreglo para los dos fluorocromos (Cy3 y Cy5), crea una imagen compuesta, normalizada, así como las imágenes de cada fluorocromo en escala de grises para su posterior análisis por medio de los programas diseñados exclusivamente para dichos arreglos. Una vez obtenidas las imágenes en escala de grises se cargaron en el programa SPOT <http://www.jainlab.org/downloads.html> que se encuentra disponible en la red. SPOT se encarga de medir las intensidades de fluorescencia de las imágenes obtenidas en los diferentes canales, elimina el ruido y fondo y convierte los colores (rojo y verde) y da una imagen integrada de la hibridación (figura 9), así como generar un archivo con extensión txt con los valores numéricos de la hibridación, para cargarse en el segundo programa SPROC, donde se cargan también las bases de datos de la información del los arreglos con la ubicación de las clonas dentro de los arreglos para que de esta forma se le brinde el contenido a cada punto de la hibridación (figura 10), así como la representación gráfica del patrón de desbalanes por hibridación (figura 11).



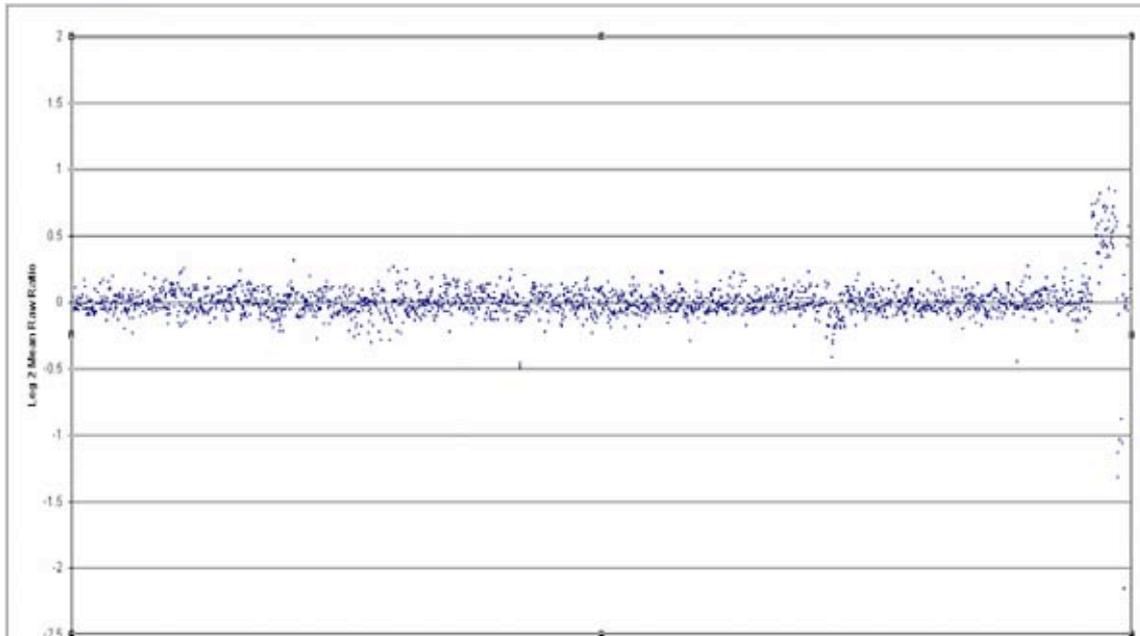
**Figura 9**

Imagen integrada de los valores del arreglo, generada por el programa SPOT. Se usan los valores integrados para encontrar los subarreglos. Los espacios en negro indican el fondo de la imagen.



**Figura 10**

Imagen representativa del programa de SPROC, donde realiza el análisis dando como resultado una base de datos de los desbalances cromosómicos por arreglo.



**Figura 11**

Representación esquemática de la base de datos generada por SPROC ubicando todas las clonas a lo largo de los cromosomas, para identificar aquellas clonas que se están ganando o perdiendo.

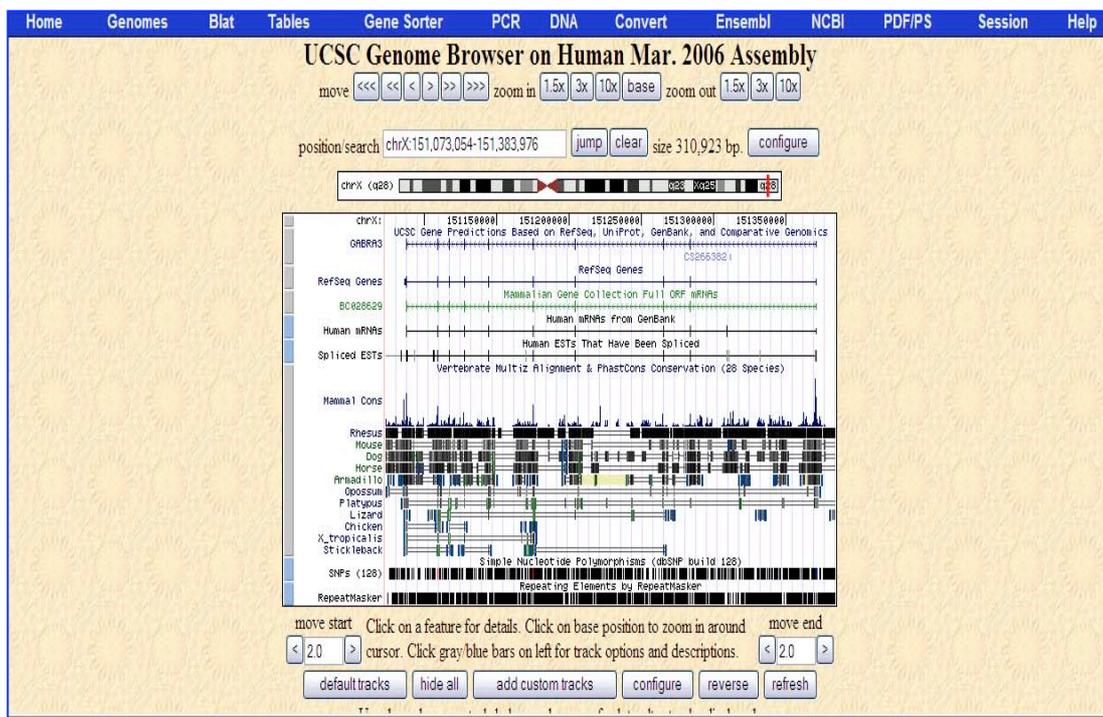
Asimismo con el programa SPROC se construyó una base de datos por cada hibridación con el valor numérico de los desbalances, identificando aquellas clonas que se estaban ganando o perdiendo de manera significativa (figura 12), y con las herramientas bioinformáticas de GEO y Genome Browser UCSF (figura 13), se ubicó la región cromosómica que contiene dichas clonas para

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Clona	Target	Chromosome	Position	Bad_P	Log2Rat	RawRat	Log2StdDev	NRreplic	FISH	Wt_cR	Wt_cM	WLRN	G3	GB4
2	RP11-2000	HA3 1H16_T	7	1020	0	-1.763158	0.264803	0	1 7q33				6999	
3	RP11-11E14	HA3 1H16_D	16	1990	0	-0.769737	0.686524	0.341847	2 16q13.16q21				2112	
4	RP11-62F14	HA3 1H16_I	2	187	0	-0.727935	0.603767	0	1 -				1333	
5	RP4-747G16	HA3 1H16_E	7	975	0	-0.619872	0.653726	0.050537	3 7q21-q31					
6	RP11-49A12	HA3 1H16_M	16	2021	0	-0.582926	0.667909	0.004804	3 16q24				3264	
7	RP11-49M3	HA3 1H14_G	19	2185	0	-0.575071	0.671253	0.017029	3 19q13.3					
8	RP11-11709	HA3 1H16_E	7	943	0	-0.573458	0.672004	0.016637	3 7 q11.23					
9	RP11-140E1	HA3 1H14_B	19	2203	0	-0.568457	0.674338	0	1 19q13.2				1620	
10	CTD-2173J2	HA3 1H16_T	13	1766	0	-0.566365	0.674371	0.145476	2 13q14.2					
11	RP11-78P4	HA3 1H16_F	20	2227	0	-0.538196	0.688637	0.027649	2 20q13					
12	RP11-85A19	HA3 1H16_S	11	1539	0	-0.528421	0.693313	0.013915	3 11q11.1-11q11.2				2242	
13	CTD-2059H6	HA3 1H16_K	12	1735	0	-0.512937	0.700794	0.103057	3 12q24.1					436.9
14	CTD-2271H4	HA3 1H15_B	19	2212	0	-0.501362	0.706439	0.005242	3 -					
15	RP11-110L13	HA3 1H16_O	12	1730	0	-0.499927	0.707142	0.012288	3 -				4554	
16	RP11-170H2	HA3 1H16_E	11	1475	0	-0.479301	0.717967	0.201459	2 11q15.2				422	
17	RP11-154N7	HA3 1H15_M	16	1996	0	-0.477911	0.719016	0.004588	3 16q21.16q22				2488	
18	RP11-162I8	HA3 1H15_P	16	2018	0	-0.474962	0.719635	0.052703	3 16q24				3181	
19	RP1-308F9	HA3 1H15_E	17	2039	0	-0.471391	0.721269	0.017886	3 17 p13					
20	RP11-136E2	HA3 1H16_O	7	893	0	-0.468921	0.722565	0	1 7p14				1523	
21	RP11-1807	HA3 1H15_M	4	626	0	-0.468474	0.720729	0.136825	3 4q35				9654	
22	CTD-2076G2	HA3 1H16_N	4	587	0	-0.467006	0.723464	0.021046	3 4q31.2					621.62
23	RP11-154M9	HA3 1H15_C	9	1240	0	-0.465741	0.724099	0.077151	3 9q13					
24	RP11-58E13	HA3 1H16_P	11	1538	0	-0.464455	0.724745	0	1 11q11.2				2220	
25	RP11-238L4	HA3 1H16_P	14	1874	0	-0.463577	0.725186	0.043104	3 -				3437	
26	RP11-68K21	HA3 1H14_E	19	2191	0	-0.463038	0.725457	0.009817	3 19q13.12				443	82.38
27	RP11-112P4	HA3 1H16_E	7	1002	0	-0.461922	0.726019	0.024547	3 7q31.3				6928	
28	GS1-53F14	HA3 1H14_O	7	1043	0	-0.454949	0.729536	0.013164	3 7q36.3q					
29	RP11-153M1	HA3 1H14_I	20	2226	0	-0.451141	0.731464	0.002164	3 20q13					
30	RP11-15M15	HA3 1H15_L	20	2306	0	-0.447695	0.733213	0.048678	3 20q13.2					
31	RP11-79H6	HA3 1H14_W	19	2184	0	-0.446204	0.733971	0.073913	3 19q13.3					14.62
32	RP11-36F11	HA3 1H14_A	11	1551	0	-0.438699	0.7378	0.006128	3 11q12				2725	
33	RP1-238C15	HA3 1H16_T	22	2363	0	-0.436574	0.738887	0.011193	3 22q11					

identificar aquellos genes que se están alterando.

**Figura 12**

Base de datos que describe las alteraciones cromosómicas presentes en cada caso. En la columna A se indica cada clona contenida en el microarreglo para su identificación.



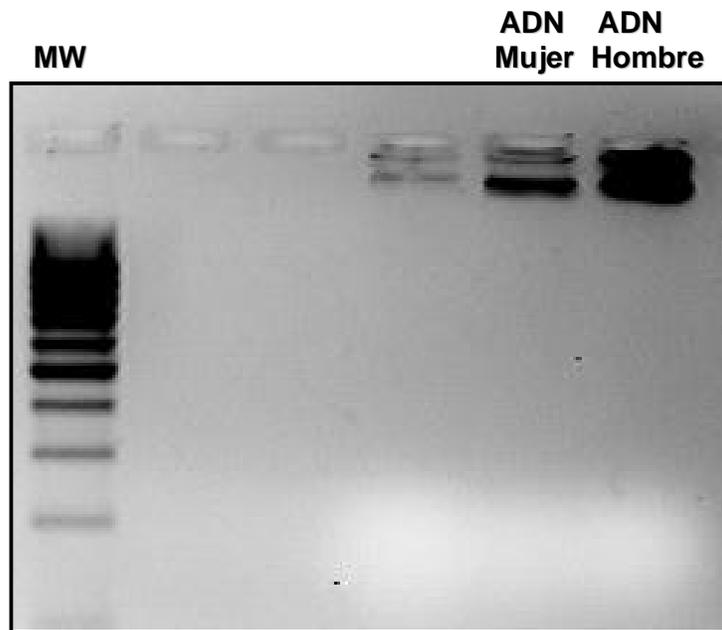
**Figura 13**

Mediante las herramientas de GEO y Genome Browser UCSF, se identificaron las clonas que se estaban ganando o perdiendo de manera diferencial, ubicando la región cromosómica e identificando los genes contenidos en dichas regiones.

## **XI. RESULTADOS**

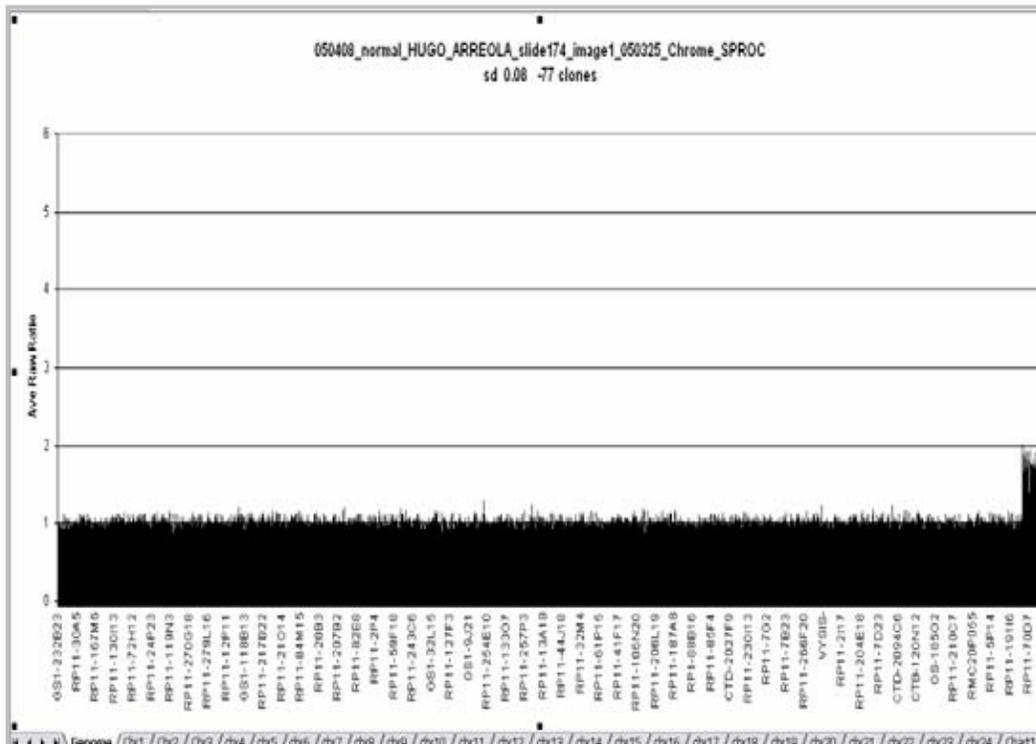
Con la finalidad de determinar el papel que juegan las alteraciones cromosómicas durante la progresión del carcinoma cervico uterino, llevamos a cabo experimentos con microarreglos de hibridación genómica comparativa para determinar el patrón de desbalances en lesiones precursoras del cervix uterino. Creamos una base de datos por medio de herramientas bioinformáticas que contiene información de las pérdidas y ganancias de material genético en las lesiones precursoras de alto grado.

Se realizó el experimento control de los arreglos de HGC, para estandarizar las condiciones de hibridación para los experimentos. En este experimento control se hibridan el ADN genómico de una mujer cariotípicamente normal, contra el ADN genómico de un hombre cariotípicamente normal (figura 14), donde no debe haber pérdida ni ganancia de material genético, salvo en el cromosoma Y, como se muestra en la figura 15. Se hibridaron en cantidades equimolares los ADNs. Para ADN extraído en muestras en fresco se marcan de 300 a 600 ng/ml de nuestro ADN (40, 41), y para ADN extraído de muestras embebidas en bloque de parafina se debe de marcar 800 ng/ml de ADN, debido a la degradación del ADN sufrida al ser embebido en parafina (40, 42).



**Figura 14**

Comprobación de la buena integridad del ADN a usar en el experimento control. La concentración del ADN de la mujer fue 645 ng/ml, y la del ADN del hombre 585 ng/ml.

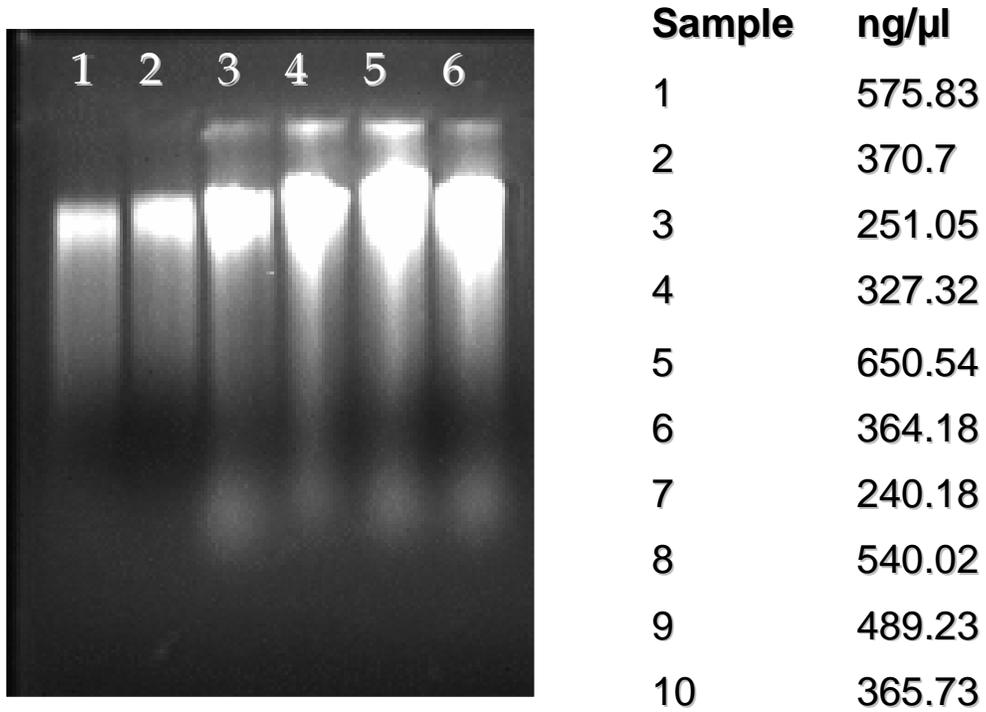


**Figura 15**

Gráfica de la hibridación del experimento control, donde se comprueba las óptimas condiciones para las hibridaciones. Se muestra como la única zona amplificada es la correspondiente al cromosoma Y.

### 11.1 Extracción de ADN

En la figura 16 se muestra la calidad del ADN purificado a partir de los tejidos embebidos en parafina, con aquellas que se realizaron las hibridaciones.



**Figura 16**

Ejemplos de ADN purificados y cuantificados por Nanodrop a partir de tejidos embebidos en parafina.

Para considerar como ganancia o pérdida de material genético (una copia extra o pérdida de la clona), se cuentan ya con valores previamente establecidos, donde tenemos todos aquellos valores que se encuentran de 0.2 a 0.75, en función de una normalización en log2, se considera ganancia de material genético, aquellos valores de -0.2 a -0.75, son pérdida de material genético. Aquellos valores mayores por encima de 0.75, o su contraparte negativa -0.75, se consideran amplificaciones o deleciones (material genético ganado o perdido en cuando menos dos copias) (40, 41). Bajo este criterio los resultados mostraron un patrón global de desbalances de 2618 alteraciones. (tabla1), donde se encuentran clonas que están alteradas en cuando menos una hibridación.

<b>CLONE</b>	<b>Log2Rat</b>
RP11-82D16	-0.259818
RP11-111O5	0.850561
RP11-60J11	-0.283125
RP11-813J5	-0.264226
RP11-178M15	0.836102
CTD-2128D14	0.760042
RP11-4O6	0.789337
RMC01P057	1.162398
CTD-2051J11	-0.282882
RP11-104J13	-0.200928
CTD-2098K5	0.868075
RP11-4P6	-0.365727
RP11-51A20	0.774777

RP11-192A12	-0.213633
RP11-8F24	0.86105

**Tabla 1**

Ejemplo de algunas de las clonas ganadas o pérdidas, donde se observa el número de identificación de la clona, así como su valor en  $\log_2 \text{Rat}$  que nos dice si dicha región cromosómica contenida en la clona, se esta ganando o perdiendo.

Mediante las herramientas de GEO y Genome Browser UCSF, fue posible la creación de una base de datos con todas las alteraciones presentes en las 10 hibridaciones (apéndice), donde se observa las alteraciones por hibridación, que clona es y el cromosoma en el que se encuentra. Del total de hibridación encontramos tenemos un total de 61 clonas que están representadas en al menos el 40% de nuestras hibridaciones entre ganancia y pérdida de material genético, de donde seleccionamos sólo aquellas representadas en más del 50% de las hibridaciones para la búsqueda de posibles genes que se alteran en LIEAG (tabla 2).

<b>CLONA</b>	<b>MAT. GENÉTICO</b>	<b>POS. CITO.</b>	<b>%</b>
CTB-141D22	PERDIDO	7q21.13b	50
RP11-49N15	PERDIDO	7q21.3	60
RP11-11L13	PERDIDO	10p13	50
RP11-660B16	PERDIDO	11q12.3-q13.1	60
RP11-548G17	PERDIDO	11q13.1	50
RP11-31A19	PERDIDO	12q22	50
CTD-2003I23	PERDIDO	12q24.2	60
RP11-30C8	PERDIDO	13q21-13q22	70
RP11-31C6	PERDIDO	13q22	50

RP11-120G8	PERDIDO	13q14.2	50
CTD-2371A5	PERDIDO	16 p tel	60
RP11-141E3	PERDIDO	16p12	50
RP11-165M24	PERDIDO	17q25.3	50
RP11-49M3	PERDIDO	19p13.3	50
RP11-75H6	PERDIDO	19p13.3	50
RP11-48M7	GANADO	20p12	50
RP11-208I3	GANADO	19q13.2	50

**Tabla 2**

Clonas más representativas, es decir, aquellas que están alteradas en al menos el 50% de nuestras hibridaciones.

Asimismo, estas clonas encontramos que se ganan o pierden en la mayoría de las mismas junto con otras clonas (bloques) que también están alteradas, pero no en la misma proporción (entre el 20 y 30%). En la figura 17 se muestran las alteraciones encontradas en el presente estudio donde se engloban tanto las alteraciones más representativas, así como, aquellas alteraciones que las acompañan (alteraciones en bloques), es decir, alteraciones donde se observó que había un comportamiento que la clona se ganaba o se perdía acompañada de otra u otras, ofreciéndonos un nuevo panorama de alteraciones en LIEAG. Posteriormente se realizó la búsqueda de posibles genes alterados, teniendo como criterios de inclusión, aparte del ya mencionado:

- Que ya este reportado
- Poco o nada descrito en cervix
- Función conocida
- Función en carcinogénesis

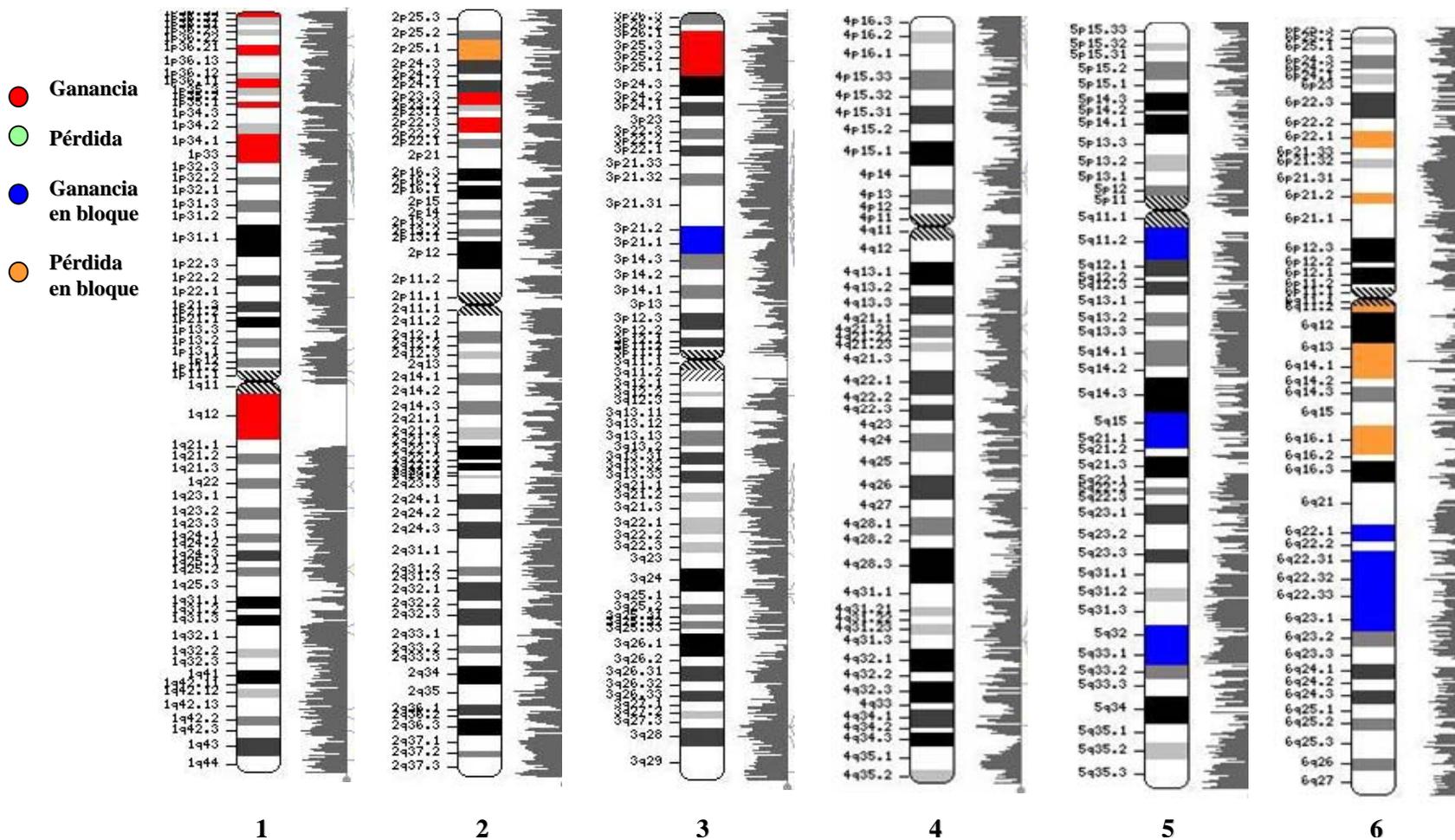
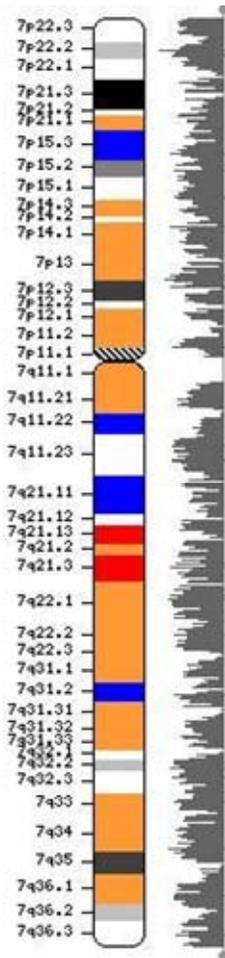
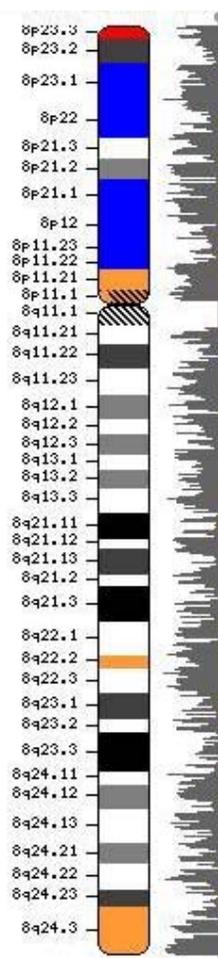


Figura 17

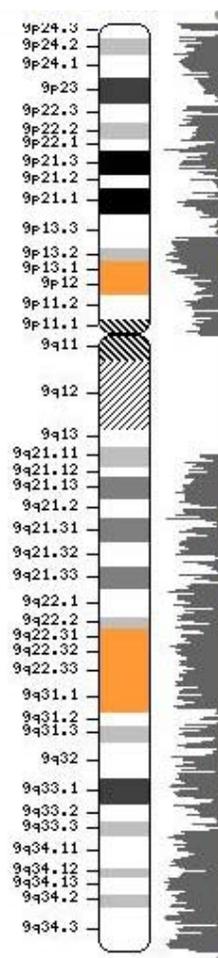
Alteraciones encontradas a lo largo de los cromosomas en LIEAG por medio de microarreglos de HGC.



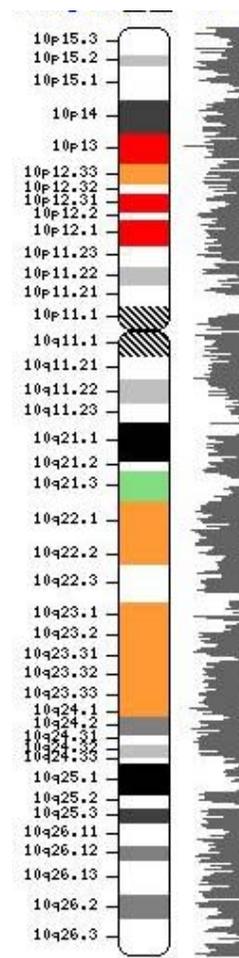
7



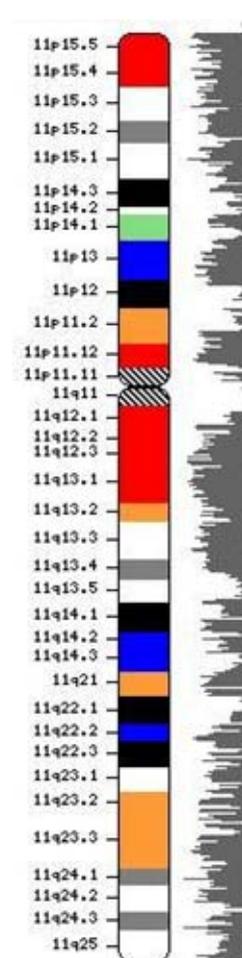
8



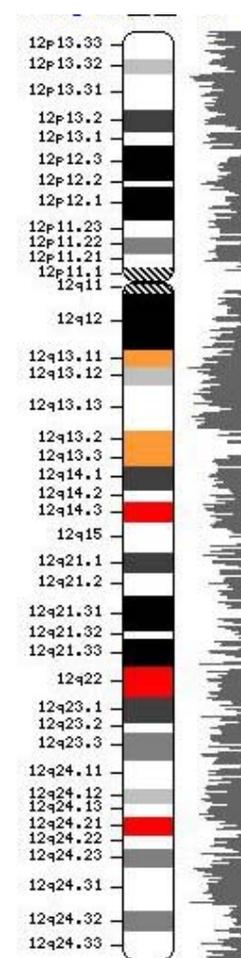
9



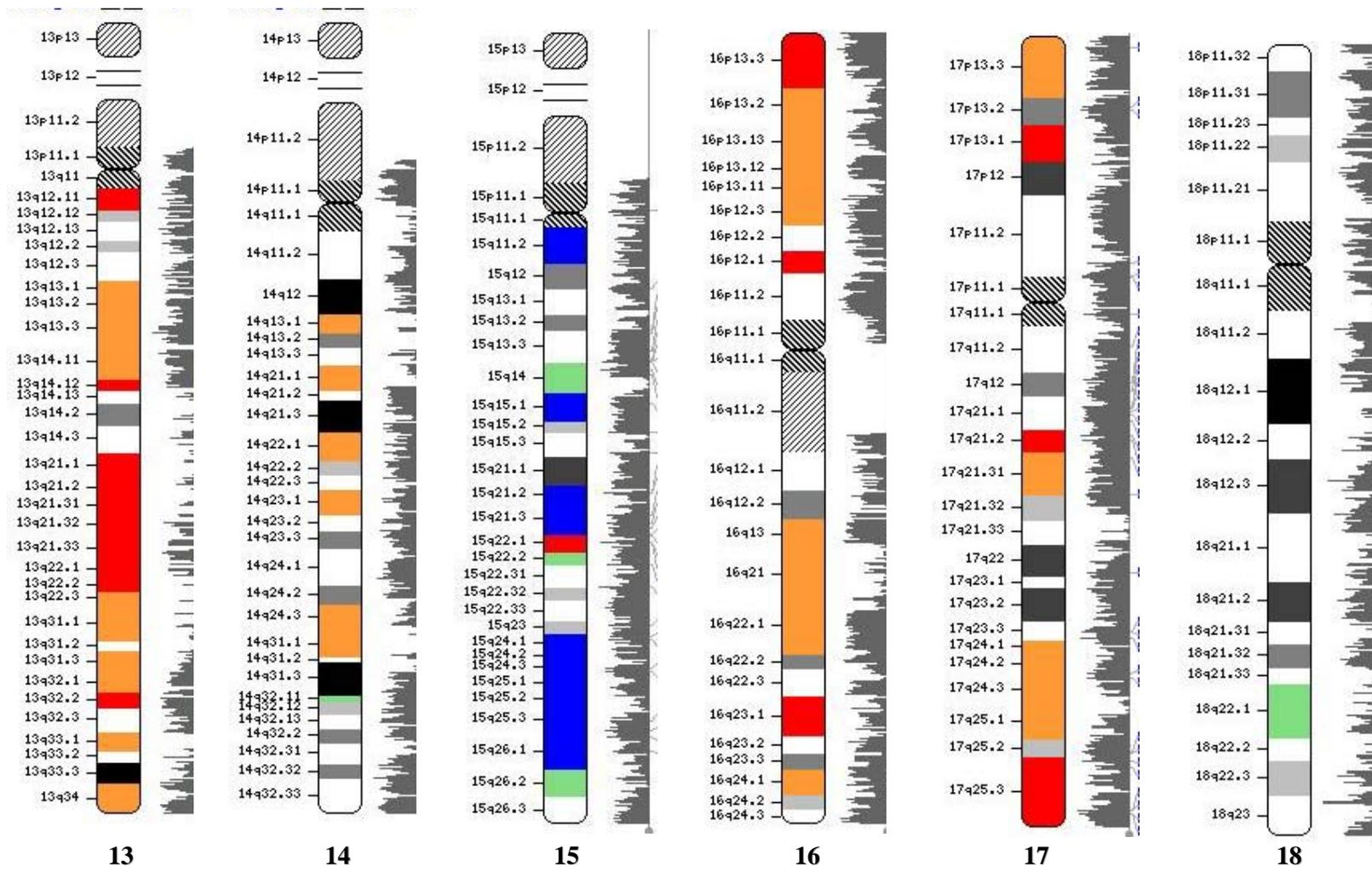
10

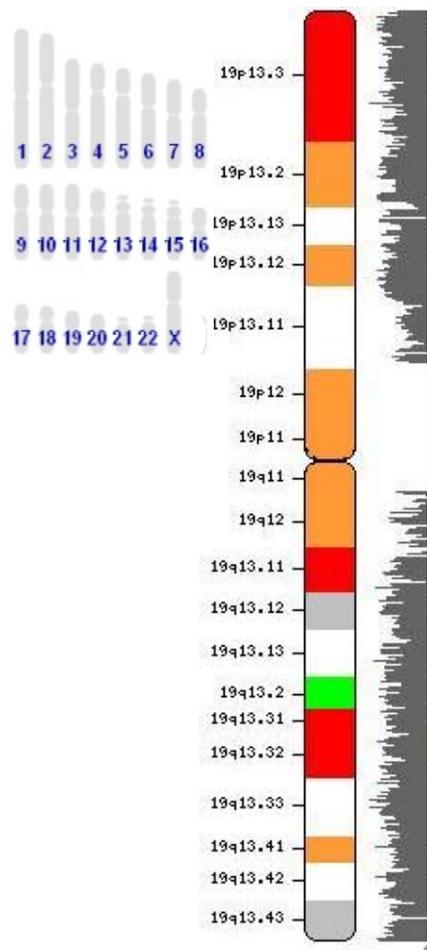


11

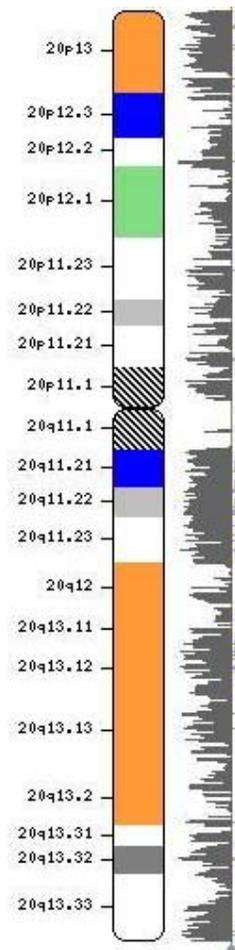


12

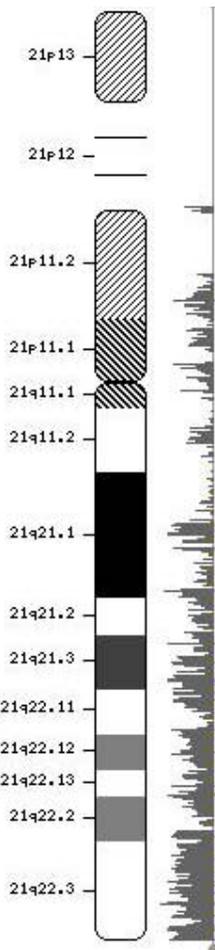




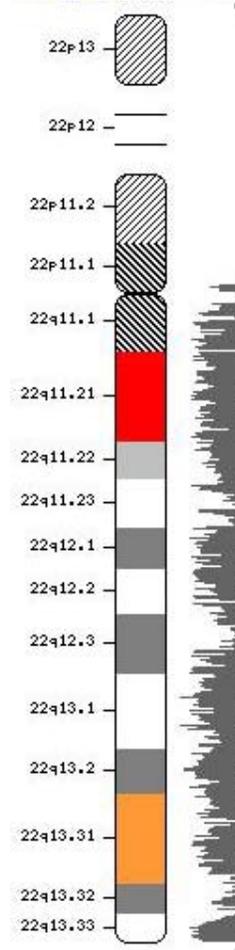
19



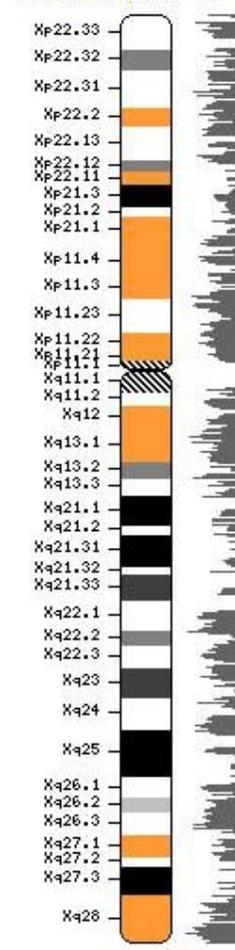
20



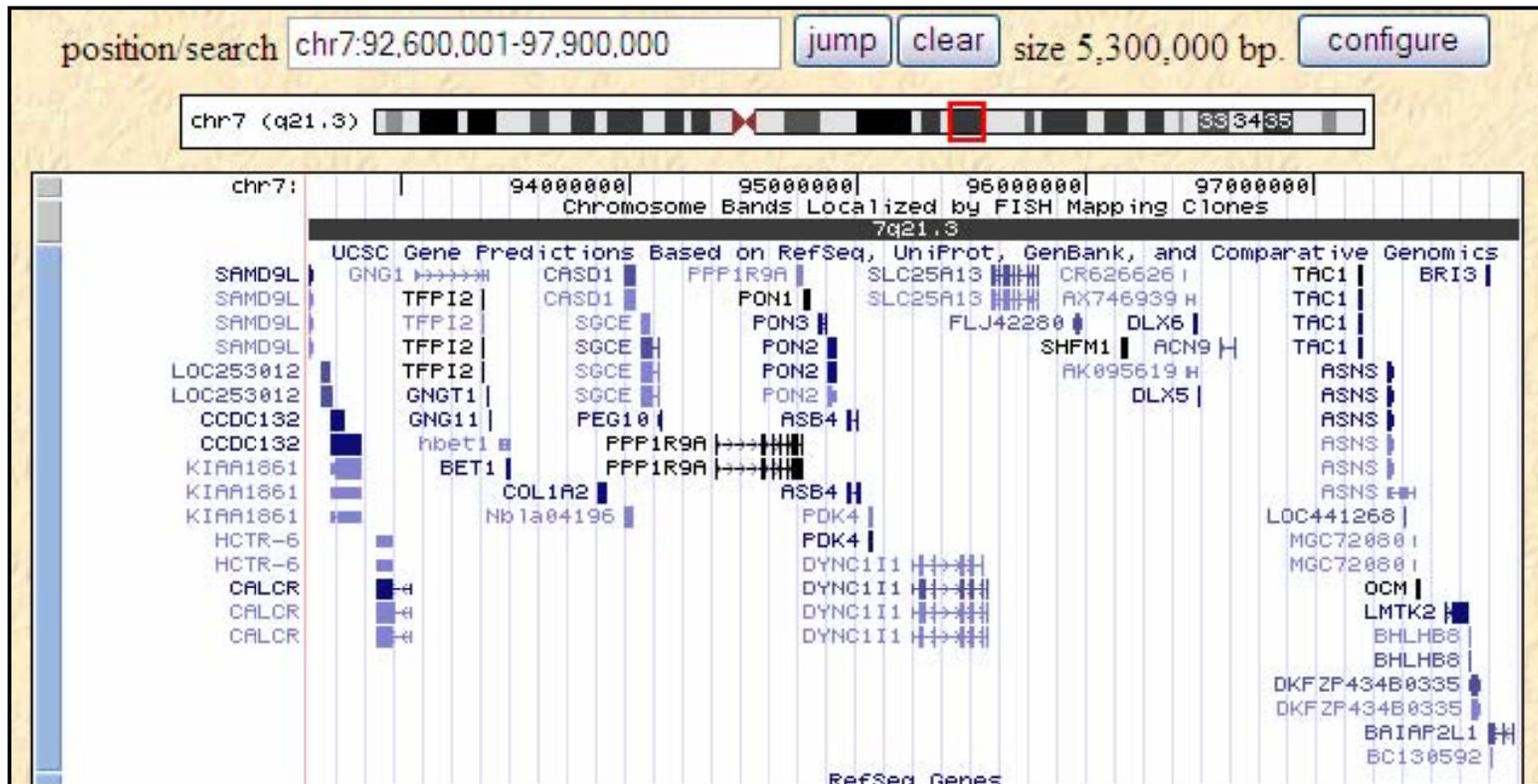
21



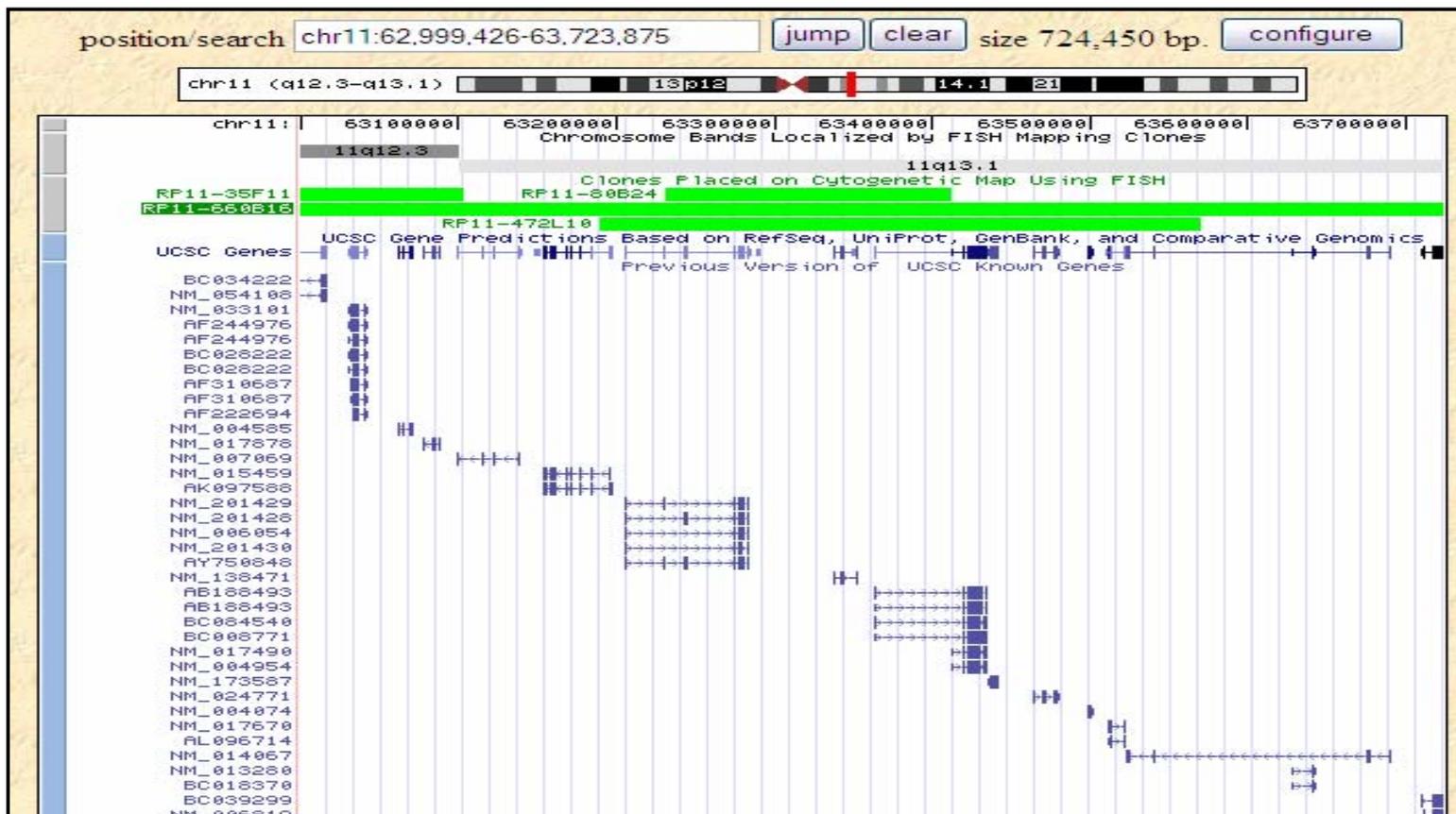
22



X

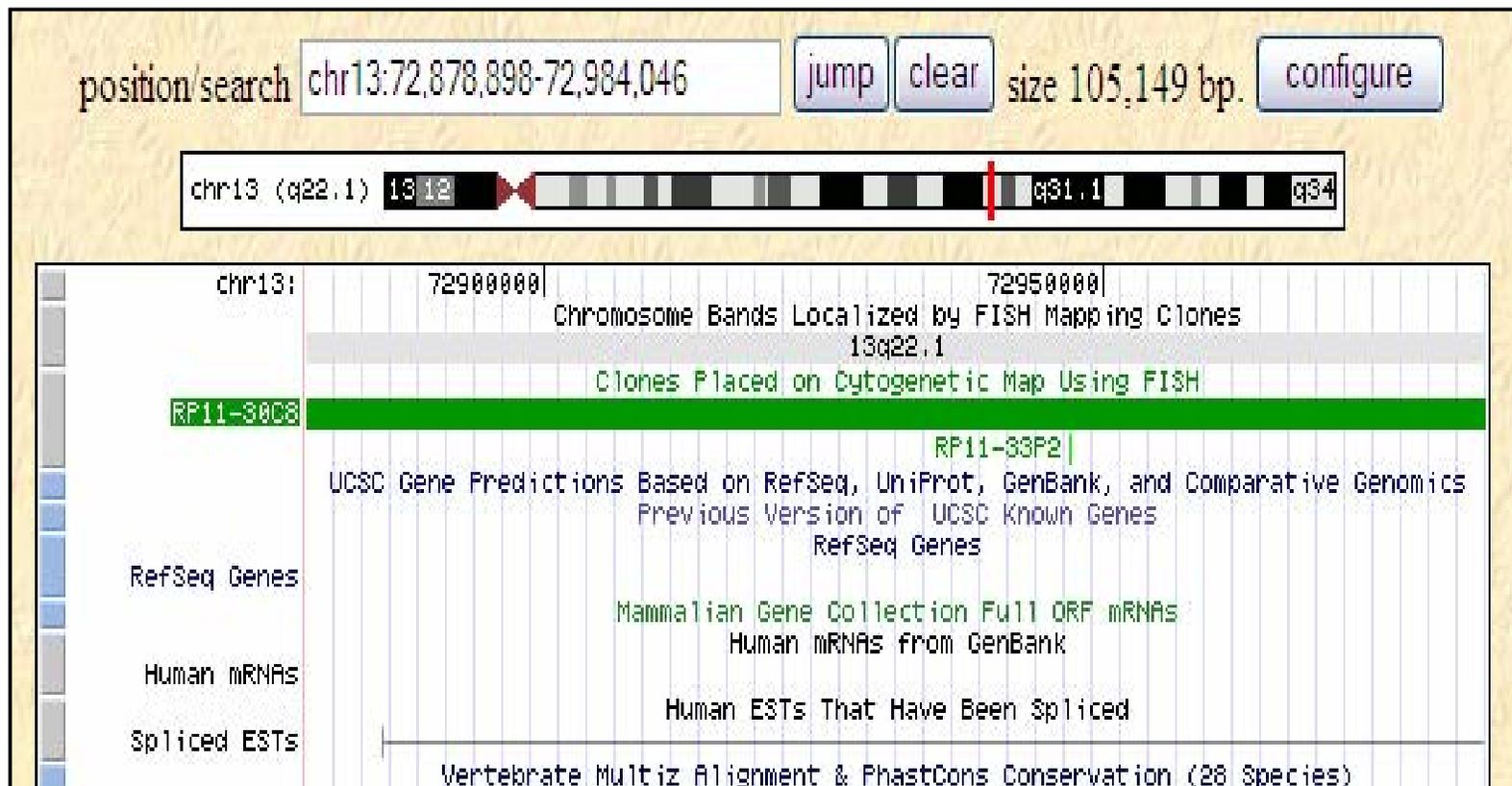


**Figura 18**  
Genes ubicados en la región 7q21.3



**Figura 19**  
Genes ubicados en la región 11q12.2-q13.1





**Figura 21**  
Genes ubicados en la región 13q21



Una vez realizada la búsqueda utilizando herramientas de libre acceso en la red como Genome browser, NCBI, Genecard, etc., y teniendo en consideración los criterios de inclusión antes mencionados, se llegó a la siguiente lista de posibles genes que se alteran en LIEAG (tabla 3).

<b>Gene</b>	<b>Localización</b>
CALCR	7q21.3
GNG11	7q21.3
RARRES3	11q12.3-q13.1
MARK2	11q12.3-q13.1
SBA2	12q24.2
TDRD3	13q21-q22
ER alpha	16 p tel

**Tabla 3**  
Lista de probables genes que se alteran en las LEIAG

## **XII. Discusión**

En este trabajo de tesis se encontró un nuevo conjunto de alteraciones en lesiones precursoras de alto grado del cervix, utilizando microarreglos de hibridación genómica comparativa. El carcinoma cervico uterino es una neoplasia que se caracteriza por presentar un alto grado de inestabilidad cromosómica. Asimismo el desarrollo de este tipo de inestabilidad es un evento crucial que se da en etapas muy tempranas de la transformación celular (44). Los cariotipos de los tumores cervicales, presentan alteraciones complejas, incluyendo alteraciones numéricas tales como ganancia y pérdida de regiones cromosómicas o de cromosomas complejos y aberraciones estructurales, como translocaciones cromosómicas (45-52). Gracias a este tipo de estudios ha sido posible determinar el patrón de alteraciones cromosómicas que están definiendo a este tumor.

En análisis de la base de datos de los microarreglo de HGC permitió definir alteraciones que no estaban descritas previamente, así como el hecho de que hay una tendencia a perder de material genético, así mismo, es notable que las alteraciones en LIEAG son mínimas, ya que no se encontró ninguna amplificación o delación, es decir, las alteraciones se quedan en sólo ganancia o pérdida de material genético; que contrasta con lo ya reportado en estudios con muestras con CaCu, donde hay alteraciones muy características y representativas, cabe mencionar que es el primer estudio con LIEAG con microarreglos de HGC, donde estamos cubriendo el genoma en su totalidad, haciendo necesario más estudios con LIEAG para poder empezar a caracterizar un posible perfil de alteraciones y que de esta manera las estén definiendo con una mayor credibilidad.

Hubo una clona ganada que se encuentra en la región 19q13.2 (50%), que no cumplió con nuestros criterios de inclusión, donde se encuentra mapeado el gen PSG1, que es un gen del desarrollo de placenta que se tiene que estar activo solamente durante el desarrollo embrionario, el cual se ha visto amplificado en muestras con CaCu, y que se está viendo ganado desde lesiones precursoras (artículo en preparación), sugiriendo que pueda estar jugando un papel importante en el proceso de carcinogénesis cervical.

En la literatura los estudios con lesiones precursoras reportan alteraciones entre un 30 ó 40% como algo ya representativo, como es el caso con la ganancia del 3q donde en lesiones precursoras lo encuentran solamente en un rango del 30 al 35%, mientras que ya en muestras con CaCu alcanza cuando menos un 75% de las muestras como ganadas, ó simplemente no se encuentra. Asimismo, lo muestran como una alteración persistente desde etapas tempranas de la progresión, dejando de considerar otras alteraciones que en conjunto puedan estar determinando la progresión hacia un carcinoma invasor (23, 24, 49), y que nosotros simplemente encontramos una clona alterada ubicada en el brazo corto de dicho cromosoma, sugiriendo que debe haber otro conjunto de alteraciones que puedan estar determinando la progresión a un carcinoma invasor.

El gen CALCR, es un receptor de calcitonina, donde la positividad de su RNAm lo han relacionado con el grado de tumor en cáncer de próstata, donde esta a la fecha no hay nada descrito en cérvix (53). El gen GNG11, implicado en senescencia, donde su sobreexpresión activa ERK 1/2 de las MAP's, pero no ha RAS, ya que RAS activa la vía ERK de las MAP's, ya que esta vía está involucrada en la proliferación y la supervivencia celular, y donde se ha visto

que el uso de inhibidores que afectan esta vía se ha detenido el desarrollo de ciertos tumores (54-56).

Para el caso de las alteraciones en la región telomérica del cromosomas 16, en tumores invasores también se han visto alteraciones cromosómicas en las regiones teloméricas y sub-teloméricas, lo que podría ser evidente que estén jugando un papel importante en la generación de alteraciones cromosómicas durante la progresión del carcinoma cérvico uterino. Recientemente se han llevado a cabo estudios que analizan los diferentes componentes de la maquinaria de mantenimiento de telómeros (expresión temporal de la telomerasa, largo telomérico y respuesta en diferentes puntos de control durante el ciclo celular), durante la progresión de lesiones precursoras a carcinoma invasor del cervix (57). Los telómeros mostraron un acortamiento significativo en todas las muestras precursoras y no se observaron mayores acortamientos en los tumores invasores. La presencia de telómeros muy cortos se asoció con una actividad constitutiva de la vía de respuesta de daño a ADN y a una proliferación celular incrementada (57).

Para el caso del gen RARRES3, el cual es un receptor del ácido retinóico, donde se ha visto que su producción esta asociada con la diferenciación tumoral, teniendo un rol importante en la carcinogénesis (58).

MARK2, es un gen involucrado con la estabilidad de los microtúbulos, y también lo han asociado con cáncer (56), que se encuentra en la misma región citogenética que RARRES3, donde se tendría que estudiar si de alguna manera tendrían alguna relación en la progresión a CaCu.

El gen SAB2, su sobreexpresión en estudios con líneas celulares de cáncer de colon tiene un papel importante en la diferenciación del mismo (59), donde lo

proponen como un posible biomarcador de diferenciación en cáncer haciendo necesarios más estudios al respecto

Por otra parte, los genes seleccionados como posibles blancos en lesiones precursoras, se encuentran en las clonas alteradas más representativas, pero dichas clonas son de las que se están alterando en bloques, donde nos pudiera estar sugiriendo una posible regulación entre los genes seleccionados y los que se encuentra en las otras clonas, que estén jugando un papel relevante en la progresión hacia el cáncer.

El patrón de desbalances presentes en lesiones precursoras no ocupa grandes regiones cromosómicas como las reportadas en la literatura en trabajos con muestras de CaCu (9, 21-23), sugiriéndonos que los desbalances son mínimos y que en estas regiones se ubiquen genes que jueguen un papel importante en los primeros eventos de la transformación del epitelio cervical. Los desbalances descritos no han sido todavía estudiados en CaCu, por lo que representan importantes blancos que abren nuevas perspectivas de investigación para comprender el proceso de carcinogénesis de este tejido. Asimismo, existe ciertas alteraciones que si se comparten con las muestras con CaCu, como es el caso de la pérdida de material genético en los cromosomas 1p, 16, 17 y 19 que se presenta desde lesiones precursoras, y lo vemos más evidente en muestras con CaCu, así como, la ganancia de casi todo el cromosoma 15.

### **XIII. Conclusiones**

- Son mínimas las alteraciones presentes en lesiones precursoras de alto grado
- Hay una tendencia a perder material genético.
- Las alteraciones presentes desde etapas precursoras es la pérdida del cromosoma 1p, 15, 16, 17 y 19.
- Las alteraciones encontradas en LIEAG podría ser un indicio de que cuales de estas estarían determinando la progresión hacia un CaCu.

#### XIV. LITERATURA CITADA

1. World health Organization, 2007. Control integral del cancer cervico uterino, Suiza.
2. [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/hpv/en/](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hpv/en/)
3. Programa de prevención y control del cáncer-uterino. Secretaria de salud. 2007
4. Asociación Mexicana de Colposcopia y Patología Cervical A. C.
5. Brisson J, Morin C, Portier M, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high grade lesions. *American Journal of Epidemiology* 1994; 140: 700-710.
6. Castellsague X, Bosch F, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Reserch.* 2002; 89: 191-99.
7. Schiffman M, Castle PE, Jeromino J, et al. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370: 890-907.
8. De la Cruz E, Contreras A, Lizano M. Hacia la prevención del cáncer cérvico-uterino: estrategias empleadas en el desarrollo de vacunas contra el VPH. *Revista de Investigación Clínica.* 2006; 58: 586-597.
9. Atkin BN. Cytogenetics of carcinoma of the Cervix Uteri: a Review. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997; 95: 33-39.
10. Walboomers, JM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathology.* 1999; 189: 12-19.
11. W, Tindle R. Immune evasion in human papillomavirus associated cervical cancer. *J Nature Reviews.* 2002; 2: 59-70.
12. Griffiths, TR, et al. Human papillomavirus and urological tumors. *Basic Science and role in Penil Cancer.* 1999; 84: 579-86.

13. Alani, RM & Münger K. Human papillomavirus and associated malignancies. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 330-337
14. [cinvestav.mx/.../Papillomavirus/PAPgeno.htm](http://cinvestav.mx/.../Papillomavirus/PAPgeno.htm)
15. Woo R, Poo R. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev.* 2004; 18: 1317-1330.
16. Montoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14: 11-16.
17. Dravian V, Xie S, Sorgen P. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14: 120-125.
18. Mazibrada J, Gariglio M, et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecologic Oncology.* 2008; 108: 112-120.
19. López S, Lizano M. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología.* 2006; 1: 31-55.
20. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J. Infect. Dis.* 1994; 169(2): 235-240.
21. Niels BA. Cytogenetics of Carcinoma of the cervix uteri: a review. *Cancer Genetic Cytogenet.* 1997; 95: 33-39.
22. Hidalgo A, Petersen I, et al. Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines. *European Journal of Cancer.* 2000; 36: 542-548.

23. Heselmeyer K, et al. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93:479-484.
24. Aubele M, et al. Distinct Cytogenetic Alterations in Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix Reveled by Laser-Assisted Microdissection and Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Cytopathology*. 1998; 84(6): 375-379.
25. Halder A, et al. A preliminary investigation of genomic screening in cervical carcinoma by comparative genomic hybridization. *Indian J. Med Res*. 2004; 122: 434-446.
26. Kirchhoff M, Rose H, et al. Comparative genomic hybridization reveals non-random chromosomal aberrations in early preinvasive cervical lesions. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001; 129(1): 47-51.
27. Kirchhoff M, Rose H, Petersen BL, et al. Comparative genomic hybridization reveals a recurrent pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma in situ of the cervix and in advanced-stage cervical carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999, 24(2): 144-150.
28. Hidalgo A, Baudis M, Petersen I, Arreola H, Piña P, Vázquez-Ortiz G, Hernandez D, González J, Lazos M, López R, Pérez C, García J, Vázquez K, Alatorre B, Salcedo M. Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma. *BMC Cancer*. 2005; 5: 77.
29. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Walkman F, Pincel D. Comparative Genome Hibridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992; 258: 818-821.

30. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genome hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; 20: 399-407.
31. Snijders, A. M, Nowak N, Seagraves R, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat. Genet*. 2001; 29: 263-264.
32. Albertson D, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human Molecular Genetics*. 2002, Vol. 12, Review Issue 2.
33. Wessendorf S, Schwaenen C, Kohlhammer H, et al. Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene*. 2003; 22: 1425-1429.
34. Monni O, Barlund M, Mousses S, et al. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 5711-5716.
35. Goldstein M, Rennert H, Bar-Shira A, Burstein Y, Yaron Y, and Orrurtreger A. Combined cytogenetic and array-based comparative genomic hybridization analyses of Wilms tumors: amplification and overexpression of the multidrug resistance associated protein 1 gene (MRP1) in a metachronous tumor. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003; 141: 120-127.
36. Snijders A. N, Nowe M. E, Fridlyand J, Piek J. M. J, Dorsman J. C, Jain A. N, Pinkel D, van Dieke P. J, Verheijen R. H. M, and Albertson D. Genome-wide array based comparative genomic hybridization reveals genetic homogeneity and frequent copy number increases

- encompassing CCNE1 in Fallopian tube carcinoma. *Oncogene*. 2003; 22: 4281-4286.
37. Wilhelm M, Veltman J, Olshen A, Jain A, Moore D, Presti J, Kovacs G, and Walkman F. Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res*. 2002; 62: 957-960.
38. Pollack J, T. Sorlie, et al. Microarrays analysis reveals a major direct role of copy number alterations in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(20): 12963-12968.
39. Kanehisa M, Bork P. Bioinformatics in the post-sequence era. *Nat Genet*. 2003; 33: 305-310.
40. Pinkel D, Albertson D. Comparative Genomic Hybridization. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2005; 6: 331-354.
41. Monni O, Kallioniemi P, et al. From Chromosomal alterations to target genes for therapy: integrating cytogenetic and functional genomics views of the breast cancer genome. *Cytogenetic and functional genomic views of cancer genomics*. 2001; 11: 395-401.
42. Frantz G, Pham T, Franklin V, and Hillan J. Detection of novel gene expression in paraffin-embedded tissue by isotopic in situ hybridization in tissue microarrays. *J. Pathol*. 2001; 195: 87-96.
43. Jain A, Tokuyasu T, Snijders A, Segreaves R, Albertson D, and Pinkel D. Fully Automatic Quantification of Microarray Image Data. *Nature Methods*. 2002; 12: 325-332.
44. Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*. 1991; 254: 1167-1173.

45. Heselmeyer K, Macville M, Schröck E, Blegan H, Hellström A, Shah K, Auer G, Ried T. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chrom Cancer*. 1997; 19: 233-240.
46. Dellas A, Torhorst J, Jiang F, Proffit J, Schultheiss E, Holzgreve W, Sauter G, Mihatsch M, Moch H. Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma stage IB detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 1999; 59: 3475-3479.
47. Ried T, Heselmayer-Haddad K, Blegan H, Schrock E, Auer G. genomic changes defining the genesis, progression and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chrom. Cancer*. 1999; 25: 195-204.
48. Allen D, White D, Hutchins A, Surry J, Tabrizi S, Garland S, Armes J. Progressive genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer*. 2000; 83: 1659-1663.
49. Umayahara K, Numa F, Suehiro Y, Sakata A, Nawata S, Ogata H, Suminami Y, Sakamoto M, Sasaki K, Kato H. Comparative Genomic Hybridization detects genetic alterations during early stages of cervical progression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 33: 98-102.
50. Harris C, Lu X, Narayan G, Singh B, Murty VV, Rao P. Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003; 36: 233-241.

51. Narayan G, Pulido H, Koul S, Lu X, Harris C, Yeh T, et al. Genetic analysis identifies putative tumor suppressor sites at 2q35-q36.1 and 2q36.2-q37.1 involved in cervical cancer progression. *Oncogene*. 2003; 22: 3489-3499.
52. Rao P, Arias-Pulido H, Lu X, Harris C, Vargas H, et al. Chromosomal amplifications, 3q gain and deletion of 2q33-q37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma. *BMC Cancer*. 2004, 4: 5.
53. Thomas H, Chiriva-Internati M, Shad G. Calcitonin receptor-stimulated migration of prostate cancer cells is mediated by urokinase receptor-integrin signaling. *Clin Exp Metastasis*. 2007; 24(5): 366-377.
54. Carloni V, Mazzocca A, Ravichandran K. Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene*. 2004; 23(8): 1566-1574.
55. Hossain M, Sakemura R, Fugii M, Ayusawa D. G-protein gamma subunit GNG11 strongly regulates cellular senescence. *Biochem Biophys Res*. 2006; 351(3): 645-650.
56. Downward J. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(1): 11-22.
57. Zhang A, Wang J, Zheng B, Fang X, Angstrom T, Liu C, Li X, Eriandsson F, Bjorkholm M, Nordenskjord M, Gruber A, Wallin K, Xu D. Telomere attrition predominantly occurs in precursor lesions during in vivo carcinogenic process of the uterine cervix. *Oncogene*. 2004; 23: 7441-7447.
58. Jiang S, Chou J, Leu F, Hsu Y, Shih Y, Yu J, Lee M, Shyu R. Decreased expression of type II tumor suppressor gene RARRES3 in tissues of

hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(7): 948-953.

59. Li X, Song J, Wang Y. Differential expression of a novel colorectal cancer differentiation-related gene in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2001; 7(4): 551-554.