



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
CARRERA DE BIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LAS GANANCIAS CROMOSÓMICAS DEL  
GENOMA DEL CÁNCER CERVICO UTERINO:  
LA GANANCIA DE LA REGIÓN 19q13.2 Y SU POSIBLE PAPEL COMO  
MARCADOR MOLECULAR.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**PABLO ROMERO MORELOS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

MÉXICO D.F.

JUNIO, 2011.



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*

A mi familia:

Mis padres por el apoyo incondicional y confianza depositada a través de todos estos años; a mi hermana, por las enseñanzas de vida que me ha transmitido y especial agradecimiento y dedicatoria a mi hija Naty, quien aunque aún no entiende muchas cosas me hizo entender la importancia de la vida y el valor del amor.

Mis tíos y primos, que aunque no están en la línea de fuego como mis padres, han estado ahí cuando los necesito, brindándome su atención y apoyo, Jorge, Rebeca, Benita, Paco, Aline y Vivis.

Mi otra familia, la que no es de sangre pero que está ahí siempre, en las buenas y en las malas, apoyándome a pesar de todo, gracias Robert, Carlos, Pezu, Oscar, Guille, Fer.

A mis amigos y hermanos de la FES-Iztacala, por el apoyo académico y personal brindado, así como de esos días de diversión con cada uno de ustedes, y gracias sobre todo por soportarme, gracias Lili, Cory, Jebuz, Mauricio, Gerardo, Leo, Carlitos, Claudia, Pancho, Ariel.

A mi mejor amigo, que hemos pasado por momentos difíciles, los cuales han forjado nuestra amistad, gracias Poot.

A mis profesores, que me demostraron la belleza de la biología y la importancia de no perder nunca la capacidad de asombro así como de buscar la respuesta a todo lo que pasa a nuestro alrededor, al profesor Luis Barbo y Ángel Lara; a las profesoras María Eugenia Heres y Laura Castañeda, por ser parte de éste trabajo como revisoras, y también por inculcarme el amor a la ciencia y la biología molecular, al igual que por mostrarme la importancia del papel servil que tenemos en esta vida.

Al Dr. Mauricio Salcedo por aceptarme en su laboratorio, brindarme su confianza y apoyarme con el presente trabajo, así como por las enseñanzas brindadas, no solo académicas sino también personales; a todo el equipo del Laboratorio de Oncología Genómica, Mony, Raúl, Perlita, Ale, Jade, Miriam, Dali, Lucero.

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b>   | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | <b>2</b>  |
| <b>CÁNCER Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO</b>                             | <b>2</b>  |
| <b>VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO</b>                                   | <b>4</b>  |
| CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS DEL PAPILOMA                            | 6         |
| PROTEÍNAS VIRALES  | 7         |
| LA PROTEÍNA E1   | 7         |
| LA PROTEÍNA E2   | 7         |
| LA PROTEÍNA E4   | 8         |
| LA PROTEÍNA E5   | 8         |
| LA PROTEÍNA E6   | 9         |
| LA PROTEÍNA E7   | 10        |
| LA PROTEÍNA E2 <sup>^</sup> E8                                     | 10        |
| LAS PROTEÍNAS L1 Y L2  | 10        |
| LA REGIÓN LARGA DE CONTROL (LCR)                                   | 11        |
| <b>INFECCIÓN POR VPH Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO</b>                  | <b>12</b> |
| <b>TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO</b>                                   | <b>13</b> |
| <b>MICROARREGLOS DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA EN CÁNCER</b> | <b>14</b> |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b>   | <b>16</b> |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b>  | <b>17</b> |
| <b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>                                      | <b>17</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | <b>18</b> |
| <b>MUESTRAS</b>  | <b>18</b> |
| <b>EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN</b>                            | <b>18</b> |
| <b>DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO</b>       | <b>19</b> |
| PCR  | 19        |
| SECUENCIACIÓN DE ADN   | 19        |
| TIPIFICACIÓN   | 19        |
| <b>HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA SOBRE MICROARREGLOS</b>        | <b>20</b> |
| VISUALIZACIÓN Y ANÁLISIS   | 20        |
| <b>RESULTADOS</b>  | <b>21</b> |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | <b>38</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>41</b> |
| <b>SUGERENCIAS PARA TRABAJOS POSTERIORES</b>                       | <b>42</b> |
| <b>REFERENCIAS</b>   | <b>43</b> |

# Resumen

**Introducción:** El cáncer cérvico uterino (CaCu) es actualmente la segunda causa de muerte en las mujeres mexicanas. Actualmente es aceptado que la infección por virus de papiloma humano de alto poder oncogénico (VPH) es uno de los principales factores asociados al desarrollo de esta neoplasia. Como en todas las neoplasias, el CaCu presenta desbalances cromosómicos (ganancias o pérdidas de material genético). Las alteraciones clásicas presentes en esta enfermedad son la ganancia de las regiones cromosómicas 1, 3q y 5p; las pérdidas del 3p y 4. Por otra parte, en estudios preliminares, nuestro grupo de investigación encontró la existencia de una alteración cromosómica de tipo ganancia en la región 19q13.2 en más del 60% de los casos estudiados de CaCu y en 2/5 de los carcinomas *in situ*; en dicha región se encuentra un grupo de genes de la familia de las glicoproteínas específicas del embarazo (PSG). Sin embargo, a la fecha existen escaso reportes en cáncer en donde se demuestre la presencia de estas proteínas.

**Objetivo:** Caracterizar las ganancias de regiones cromosómicas del genoma del Cáncer Cérvico Uterino.

**Métodos:** Treinta y nueve DNA's aislados de muestras de cáncer Cérvico uterino escamoso (CaCu) fueron analizados por medio de hibridación genómica comparativa en microarreglos (CGHa) los cuales cubren la totalidad del genoma en clonas de 1.3 megabases. Los datos obtenidos fueron analizados por una suite de programas bioinformáticos "*Sproc*" y "*Spot*" con una de significancia estadística  $p > 0.01$ . Posteriormente el enfoque fue a la detección de ganancias génicas.

**Resultados:** Las regiones cromosómicas comúnmente ganadas en las muestras invasoras fueron el 1, 3q, 8, 9q, 19q y 20. De manera interesante, la región 19q13.2 resultó ser la más significativa presentándose en más del 70% de los casos analizados; en dicha región se encuentran las glicoproteínas específicas del embarazo (PSG) no descritas en esta neoplasia.

**Conclusión:** Estos hallazgos muestran que dicha ganancia génica es un evento frecuente en CaCu.

# Introducción

## Cáncer y Cáncer Cérvico Uterino

Actualmente, el cáncer continúa siendo una de las enfermedades más frecuentes y devastadoras, ya que a nivel mundial ocupa la segunda causa de muerte en la población y de acuerdo con las estadísticas mundiales, tan solo en el año 2002, hubo 10.9 millones de nuevos casos, 6.7 millones de muertes y 24.6 millones de personas diagnosticadas del 2001 al 2006<sup>1</sup>. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, esta situación se ha tornado crítica, pues predice que la incidencia de cáncer puede incrementarse en 50% en el año 2020, y para el año 2030, se estima que se presentarían mundialmente 11.8 millones de muertes por esta causa, por lo que hoy en día se ha convertido en una prioridad encontrar herramientas efectivas para diagnosticar, tratar y curar esta enfermedad<sup>1-2</sup>.

En México, el cáncer es una de las enfermedades que han irrumpido con mayor ímpetu desde fines del siglo XX. Según cifras del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, para el año 2001 se registraron 108,064 tumores malignos, de los cuales el 35% afectaron a hombres y 65% a mujeres, si se consideran todas las edades, pero es muy importante destacar que es más frecuente en las mujeres a partir de los 20 años. Para el año 2008, de acuerdo con el proyecto GLOBOCAN las neoplasias que se presentaron con mayor frecuencia fueron: próstata (11.7%), mama (10.9%), del cérvix uterino (8%) y pulmón (7.2%). En el hombre, la mayor ocurrencia se presentó en el cáncer de próstata (24.1%), pulmón (10.2%) y estómago (7%). En mujeres: mama (21.2%), *in situ* de cuello del útero (15.5%), y estómago (5.4%)<sup>3</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina por neoplasias en todo el mundo, con unas 300,000 muertes al año. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y cerca de 500,000 nuevos casos se presentan cada año. Tan sólo en el año 2002 se presentaron 493,243 y de estos, 273,505 fueron decesos<sup>4</sup>.

En México, en el año 2008, se presentaron 10,186 nuevos casos, de los cuales 5,061, el 50% de los casos, fueron decesos. Esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, sin embargo, para el 2008, ocupó la segunda causa de muerte por neoplasias con 5,061 casos que corresponden al 12.9% del total de cánceres reportados para ese año (Figura 1)<sup>5</sup>.

## Mortalidad

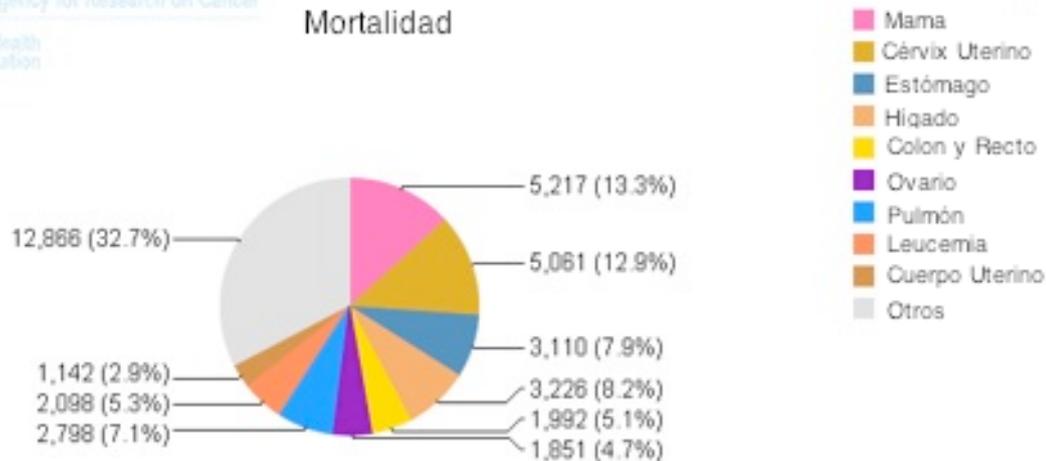


Figura 1. Mortalidad en mujeres con cáncer en México para el año 2008. El 12.9% de los casos fueron descesos por cáncer cérvico uterino (<http://globocan.iarc.fr/>).

En estudios epidemiológicos relacionados a esta neoplasia, se ha demostrado que existen diversos cofactores de riesgo para desarrollar la enfermedad, dentro de estos tenemos el inicio de la vida sexual a temprana edad, número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos hormonales, antecedentes heredo-familiares, número de embarazos y, como principal factor etiológico, la infección por el virus del papiloma humano (VPH), donde utilizando metodologías muy sensibles de detección, se ha detectado una positividad a VPH en el 98.8% de los casos de CaCu<sup>6</sup>.

La relación entre el CaCu y el VPH fue demostrada a principios de los 80's por el doctor Harald zur Hausen, quien fue el primero en demostrar, por medio de experimentos de hibridación, que las verrugas genitales y los tejidos de cáncer de cérvix, contienen el genoma del virus del papiloma humano<sup>4,7</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de los tipos virales de alto poder oncogénico (16, 18, 33, etc) en pacientes con lesiones cervicales aumentan el riesgo de producir cáncer invasor. Sin embargo, hay estudios que indican que no todos los pacientes infectados con VPH de alto poder oncogénico desarrollan cáncer invasor. Lo anterior indica que la infección por VPH de alto poder oncogénico es importante pero no suficiente para desarrollar una lesión invasora, por lo que puede haber otros mecanismos moleculares que caractericen a esta neoplasia<sup>8-10</sup>.

## Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano, o VPH, pertenece a la familia Papillomaviridae; estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles<sup>11</sup>.

La partícula viral tiene un tamaño aproximado de 55 nm de diámetro, se compone de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) que forman la cápside viral. Los capsómeros están constituidos de dos proteínas estructurales: L1 (mayoritariamente) y L2<sup>4, 6</sup>.

El genoma viral esta constituido por DNA de doble cadena circular, con un tamaño aproximado de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR), que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las regiones tardías (L1 y L2) (Figura 2)<sup>12</sup>.

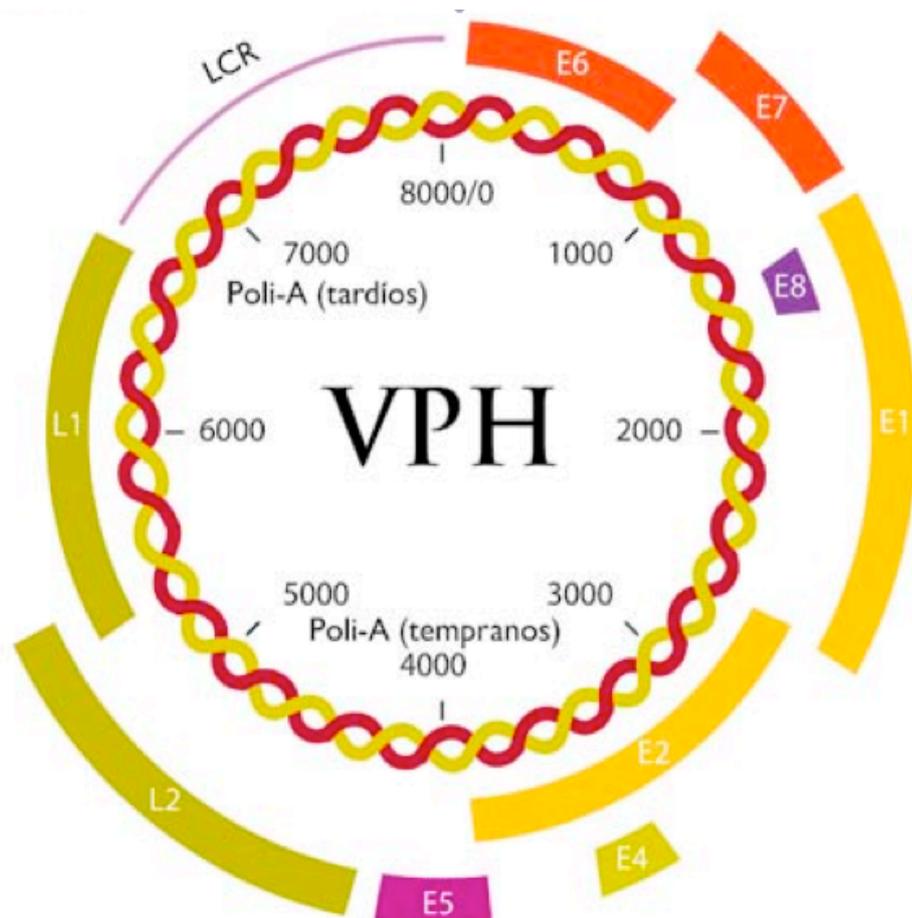


Figura 2. El genoma de VPH es una molécula de DNA circular de doble cadena. Se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR), la región temprana (E1 a E8), y la región tardía (L1 y L2), en donde la última constituye a la cápside (Tomado de López-Saavedra y Lizano-Soberon 2006).

Las infecciones por VPH generalmente se manifiestan como lesiones planas o verrugas genitales, y comúnmente este tipo de infecciones son producidas por los virus de bajo riesgo, de los cuales, los más comunes son los tipos 6 y 11; la infección por este tipo de virus se caracteriza por presentar un alto número de copias, lo cual es un tipo de infección episodal. Estos tipos virales, son transmitidos sexualmente, afectando alrededor del 1% de la población, y no son causantes de cáncer<sup>13</sup>.

Por otro lado, existe otro grupo de virus, al que se le ha denominado de alto riesgo y se le ha asociado con el desarrollo de cáncer, por su alta capacidad de transformar a las células huésped, de este tipo, los más comunes en el cáncer cervical invasor y que son responsables de aproximadamente del 70% de esta neoplasias a nivel mundial, son los tipos 16 y 18<sup>14</sup>. Se les considera de alto riesgo debido a que su DNA se rompe en las regiones control del ciclo de virus y se integra en el DNA del hospedero, evento que promueve la inestabilidad cromosómica y la transformación de las células del hospedero, por lo tanto, debido a estas características se les ha implicado directamente en el proceso que lleva al desarrollo del cáncer cérvico uterino, sin embargo, hay estudios que indican que NO todos los pacientes infectados con VPH de alto poder oncogénico desarrollan cáncer invasor<sup>9,10,15,16</sup>.

## Clasificación de los virus del papiloma

El gen *L1* es el más conservado del genoma viral y por lo tanto ha sido utilizado para identificar nuevos tipos virales, pues un nuevo tipo viral, es reconocido como tal, solo si la secuencia nucleotídica del gen *L1* difiere por poco más del 10% de aquella del tipo viral más cercano. Diferencias de 2 a 10% definen a un subtipo viral, mientras que la diferencia menor a 2% define a una variante viral. Hasta la fecha se han descrito y secuenciado completamente 118 tipos virales y se ha identificado un número mayor de posibles nuevos tipos mediante la amplificación de regiones subgenómicas<sup>4</sup>.

Los papilomavirus se clasifican en tres niveles taxonómicos: Género, Especie y Tipo. Los diferentes tipos comparten menos del 60% de identidad en la secuencia del gen *L1*; las especies de un género comparten una identidad de secuencia de 60 a 70% y los tipos virales dentro de una especie comparten una identidad de secuencia de 71 a 89%<sup>17</sup>.

Los papilomavirus que infectan tanto a humanos como a animales, forman 16 géneros que se identifican por letras griegas, 5 de estos géneros se componen exclusivamente de VPH's y VP's identificados en algunos primates, todos los otros géneros contienen tipos encontrados en varios mamíferos y aves<sup>4</sup>.

El género clínicamente más importante es el referido como los virus del papiloma- $\alpha$  o VP- $\alpha$ , que contiene a todos lo tipos de VPH asociados a lesiones en mucosas o genitales; los VP- $\beta$  incluyen todos los tipos de VPH asociados con *epidermodisplasia verruciformis* (EV), una enfermedad neoplásica cutánea con componente génico, sin embargo, en aquellos portadores que no son genéticamente predispuestos a la enfermedad, los VP- $\beta$  y los VP- $\gamma$  establecen infecciones asintomáticas, o en el peor de los casos producen pequeñas lesiones cutáneas neoplásicas benignas. Algunos de los virus de estos dos géneros también se han hallado asociados a cáncer de la piel en individuos inmuno-suprimidos<sup>4</sup>.

## Proteínas virales

### La proteína E1

El gen *E1*, es el más grande y de los más conservados en los papilomavirus, con casi 2 Kb de secuencia y de 67.5 (VPH47) a 76.2 kDa (VPH10) para la proteína nuclear de 593 (VPH48) a 681 aminoácidos (VPH10).

E1 es una 3'→5' helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del DNA viral, y que se asocia con la DNA polimerasa  $\alpha$ , así pues, las funciones de ATPasa y de helicasa, hacen de esta proteína viral la única con actividad enzimática y se hayan codificadas en el dominio carboxilo terminal.

La unión de E1 a su sitio en la LCR depende a su vez de la formación de dímeros con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice. Las interacciones E2-E1 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 a un complejo inicial E2-E1-DNA. Conforme se ensamblan oligómeros más grandes de E1, E2 es finalmente desplazado mediante una reacción dependiente de ATP. Por otro lado, se ha demostrado recientemente que el dominio de unión al DNA de E1 (E1DBD) estimula la actividad transcripcional de E2 dependiente de E1, lo que sugiere que la interacción E1DBD-E2TAD (dominio de activación), funciona más en la regulación de la actividad transcripcional que en la replicación del DNA viral<sup>4 y 6</sup>.

### La proteína E2

El producto del gen *E2*, de aproximadamente 1,100 pb, es una proteína nuclear de 45 kDa y se divide en tres dominios funcionales:

- 1) Extremo amino terminal, el cual es el dominio de activación (E2TAD), responsable de regular la transcripción y la replicación del DNA viral; promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al DNA en sitios distantes, provocando una curvatura en la molécula del DNA y otros cambios conformacionales.
- 2) Dominio de bisagra o dominio central; es el de longitud y secuencia más variable entre los papilomavirus, el cual, en VPH11 es importante para regular la función de E2 durante la transcripción del mRNA y la replicación viral, además de que estabiliza al complejo E2-DNA.
- 3) Extremo carboxilo terminal, el cual es de dimerización y de unión al DNA, de casi 100 aminoácidos.

La unión de E2 al DNA provoca la represión o activación del promotor viral que regula la expresión de los genes tempranos, y la replicación del DNA viral. Sin embargo, E2 también tiene una función antiproliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, en parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como por el consecuente aumento de p53<sup>4, 6</sup>.

### **La proteína E4**

La secuencia codificante de *E4*, aproximadamente de 260 pb, está contenida dentro del marco de lectura de E2. La proteína E4, de 10 a 44 kDa, se expresa a partir de un mRNA procesado (E1<sup>^</sup>E4) de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del DNA viral. La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales. La proteína E4 se localiza en parte en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma (IF) durante las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) causadas por VPH16, pero también se halla de manera difusa en regiones perinucleares y citoplasmáticas. E4 causa colapso de dichas queratinas y esto se ha relacionado con la liberación de los viriones. También se ha observado que cuando se expresa E1<sup>^</sup>E4 en células HeLa y SiHa, se provoca arresto en la fase G2 del ciclo celular, lo que sugiere un papel antagónico con la proliferación celular inducida por E7 durante la etapa productiva de la infección, así como del requerimiento de E1<sup>^</sup>E4 y E2 para inhibir la división celular durante el ciclo viral<sup>4, 6, 18</sup>.

### **La proteína E5**

El gen *E5*, de aproximadamente 230 a 250 pb, codifica para una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa, la cual es una proteína de membrana e hidrofóbica, que se halla principalmente en el retículo endoplasmático y Golgi, aunque también se encuentra en la membrana citoplásmica<sup>19</sup>.

La función principal de la proteína E5 es acomplejarse y sobrerregular la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como el del factor del crecimiento epidermal (EGFR) o del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), sin embargo, E5 de VPH16 y de VPB1 (Virus del papiloma bovino), se unen también a la subunidad de 16 kDa de la ATPasa vacuolar, la cual es un complejo protéico de unión a membrana, cuya subunidad de 16 kDa forma el poro por el que pasan los iones H<sup>+</sup> que acidifican el contenido de los endosomas. Se sabe que E5 de VPH16 inhibe la acidificación de los endosomas, lo que resulta en la inhibición de la maduración de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHV-II), la cual entrega péptidos antigénicos desde los

compartimentos endocíticos hasta la superficie celular, y con esto se provoca la disminución del reconocimiento inmune de los queratinocitos infectados; además de la retención del receptor, en la prolongación de su señal activa y en el reciclaje del 40% de los receptores para anclarse de nuevo en la superficie en ausencia del ligando, lo que quizá explique el incremento en el número de EGFR observado en los queratinocitos que expresan E5<sup>19, 4, 6</sup>.

Se ha visto en células de roedores que expresan E5, un aumento en la expresión de las vías de señalización mitogénicas de c-Jun y C-Fos (los cuales están involucrados en la degradación por ubiquitinación), en especial en presencia de EGF, dado que es necesario en la fase G1 del ciclo celular, así que se sugiere que la actividad de E5 estimula a las células a través de esta fase y en S<sup>6</sup>.

### **La proteína E6**

El gen *E6*, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica para una proteína de casi 150 aminoácidos, con un peso molecular de 16 a 18 kDa, que contiene dos motivos de dedos de zinc y cuya integridad es esencial para la función de E6. La proteína tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para la plena capacidad transformante e inmortalizante.

E6 es de las que se expresan muy tempranamente durante una infección por VPH, lo cual le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como por ejemplo el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, una proteína supresora de tumores, por medio de la acción de la ubiquitina ligasa Mdm2 en la ruta de la ubiquitina-proteosoma; la alteración de la transcripción de genes celulares a través de la interacción con *p300* y *CBP*, e incremento de la vida celular por la sobre activación de la telomerasa.

Para lograr lo anterior, E6 requiere de la proteína celular asociada a E6 (E6-AP), por medio de lo cual se reemplaza a la Mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a p53; este cambio reduce dramáticamente la vida de p53 (desde 3 horas hasta 20 minutos) y el nivel de la proteína en las células de CaCu a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. Cabe mencionar, que la mayoría de las proteínas E6 de los VPH's de bajo riesgo no se unen a p53 o lo hacen débilmente y no lo degradan<sup>20</sup>.

E6, también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y con esto inhibir su función independientemente de su degradación. En consecuencia E6 inhibe la capacidad de p53 para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independiente de p53, pues se ha visto que

E6 interactúa con Bak, una proteína pro-apoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación. El incremento de p53, que se daría por la proliferación inducida por el VPH, así como la consecuente inducción de apoptosis, probablemente mataría a una célula infectada por VPH antes de que la replicación de éste ocurriera, por lo que la modulación de los niveles de p53 por parte de E6 es importante para una infección productiva<sup>4, 6</sup>.

### **La proteína E7**

El gen *E7*, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica para una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa. Esta proteína tiene la mayor capacidad transformante, y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresora de tumores de la familia pRB (Control del ciclo celular), que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F<sup>21</sup>.

La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve la expresión de la ciclina E y el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular<sup>22</sup>.

E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27.

### **La proteína E2^E8**

Recientemente se ha descrito una nueva proteína, resultado de una fusión del producto del pequeño marco de lectura E8 con parte de la proteína E2. Esta proteína de 20 kDa reprime la replicación viral, así como la transcripción y por tanto se creó que es importante para el mantenimiento del estado latente observado en las células basales del epitelio infectado<sup>23</sup>.

### **Las proteínas L1 y L2**

La proteína L2 de 43 a 53 kDa, es la minoritaria de la cápside viral, que como L1, se produce en células que expresan E4. La proteína mayoritaria L1, de 57 kDa y que conforma cerca del 80% de la cápside, se expresa después de L2.

La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaedral, en donde la proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica (PML) durante el ensamble del virus y atrae a L1 hacia estos dominios; y

se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del DNA viral y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento<sup>24</sup>.

### **Región Larga de Control (LCR)**

La región larga de control (LCR) es un segmento genómico que no contiene marco de lectura alguno y que sí tiene numerosos elementos de respuesta en *cis*, que gobiernan la expresión génica y la replicación viral; el tamaño varía según el tipo viral, extendiéndose de un 7 a un 11% del genoma y de casi 850 pb en el caso de los VPH genitales.

La LCR puede dividirse en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador o “enhancer”, de alrededor de 230 pb y la región más alejada del 5’.

Numerosos factores, celulares y virales interaccionan con esta región, como las proteínas virales E1 y E2, receptores glucocorticoides que modulan positivamente la transcripción, así como otros factores que parecen intervenir en la especificidad por el tejido<sup>4, 6</sup>.

## **Infección por VPH y Cáncer Cérvico Uterino**

Los virus genitales, tanto oncogénicos como no oncogénicos, pueden causar LIEBG (lesiones intraepiteliales de bajo grado) o NIC 1 (Neoplasia intraepitelial cervical grado 1) en la zona de transformación del cuello uterino, que es la unión entre el epitelio columnar del endocervix y el epitelio escamoso del ectocervix, el cual es un sitio de continuos cambios metaplásicos, que se encuentra más activo durante la pubertad y durante el primer embarazo y declina después de la menopausia; dichas lesiones son una manifestación transitoria de la infección viral productiva, y que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio, no obstante, no todas estas lesiones se convertirán en LIEAG (lesiones intraepiteliales de alto grado) o NIC 2 ó 3, y éstas pueden desaparecer después de un cierto tiempo.

Sin embargo, cuando existe una metaplasia escamosa atípica, inducida por algún virus y que se desarrolle en esta región, puede existir una progresión a una LIEAG o NIC 3, que son las verdaderas precursoras de CaCu y que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior del epitelio. Dichas lesiones son comúnmente positivas a tipos virales oncogénicos o de alto riesgo, que evitan la maduración y diferenciación, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anormalidades genéticas que favorecen la malignidad y con ello el CaCu. Así entonces, en la progresión definitiva, el principal factor etiológico y necesario, pero no definitivo es la infección por algunos tipos de VPH's, especialmente por los de alto riesgo<sup>25</sup>.

Por otro lado, el CaCu de células escamosas es el más común, sin embargo, también pueden llegar a presentarse casos de origen glandular, que son conocidos como adenocarcinomas, y que también contienen VPH, pero la correlación es menos pronunciada y es dependiente de la edad. El adenocarcinoma invasor puede ser puro o mezclado con carcinoma de células escamosas y es denominado carcinoma adenoescamoso, que es a menudo encontrado con pacientes que ya han sido operados por carcinoma escamoso, y que su incidencia aumenta en los países desarrollados, sobre todo en mujeres jóvenes, y se cree que puede deberse al incremento en el consumo de anticonceptivos orales.

## Tratamiento y Diagnóstico

Actualmente, la escisión por medio del asa electro quirúrgica es un buen tratamiento para las lesiones escamosas no invasivas, sin embargo, cuando el cáncer comienza a invadir, el tratamiento empleado es la histerectomía o la radioterapia de alta energía, en las cuales, el objetivo es destruir células malignas en el cérvix, tejidos paracervicales y nodos linfáticos regionales; pero cuando el cáncer es localmente avanzado, el tratamiento a seguir es la radioterapia dirigida; no obstante, el diagnóstico juega un papel muy importante, pues entre más temprano se detecte la enfermedad, el tratamiento será menos agresivo para el paciente y con mejor pronóstico

Los métodos principales de diagnóstico han sido la histopatología y métodos citológicos, como el Papanicolaou, que buscan cambios en las células de la zona de transformación; sin embargo, actualmente se han introducido métodos moleculares para la detección de VPH y con fines de investigación en muestras clínicas, como lo son la genotipificación de VPH, arreglos de cDNA e hibridación genómica comparativa, en donde esta última puede ser empleada en los diferentes estadios tumorales para detectar desbalances cromosómicos específicos durante el desarrollo del CaCu. A nivel molecular, la ganancia y pérdida de material genético es característico de las células transformadas, y estas alteraciones se presentan desde los estadios tempranos y se establecen definitivamente en las etapas invasoras, por lo que la caracterización de dichas alteraciones a nivel génico, potencialmente nos arrojará el punto de partida para su detección diferencial en el torrente sanguíneo, dado que a partir de estas alteraciones de material genético, es posible encontrar biomarcadores, que son proteínas derivadas de los tumores y que son producidas solo o en mayor cantidad en la neoplasia en comparación con pacientes sanos. Tal es el caso del antígeno prostático específico (*PSA*), que se detecta en altas concentraciones en el suero de pacientes con cáncer de próstata y que actualmente es una de las pruebas más utilizadas para la detección de esta neoplasia<sup>1, 2, 10, 26</sup>.

## Microarreglos de Hibridación Genómica Comparativa en Cáncer

El uso de herramientas para la investigación del proceso de transformación celular, nos permite tener un mejor conocimiento de los procesos involucrados en la carcinogénesis; una de las herramientas ampliamente utilizadas en las diferentes etapas de la carcinogénesis y en la mayoría de los cánceres que afectan a la especie humana, es la hibridación genómica comparativa en metafase (HGCM), la cual fue reportada primeramente por Kallioniemi en 1992, y que tiene su fundamento en la comparación de dos muestras de DNA genómico, uno derivado de la muestra tumoral y el otro de una muestra de referencia cariotípicamente normal. Cada una de las muestras es marcada diferencialmente utilizando distintos fluorocromos (comúnmente el tumoral con cianina-3 para el verde y el de referencia con cianina-5 para rojo); ambas muestras marcadas diferencialmente, se mezclan en cantidades iguales y se hibridan en presencia de DNA Cot-1 no marcado (permite bloquear las secuencias cromosómicas altamente repetitivas presentes en las regiones centroméricas de los cromosomas, eliminando hibridaciones no específicas en estas regiones), sobre cromosomas en metafase de un sujeto cariotípicamente normal. La hibridación de estas sondas se lleva a cabo sobre sus secuencias complementarias en las metafases de manera competitiva, de esta forma, la cantidad de DNA normal o tumoral que se une a su secuencia blanco en los cromosomas, estará en proporción a la cantidad de esta secuencia en las muestras<sup>27</sup>.

Esta técnica nos permite monitorear en un solo experimento y de manera global el genoma completo de un individuo en cuanto a ganancia y pérdida de material genético; sin embargo, esta técnica se ve limitada por su rango de definición, ya que pueden observarse alteraciones en regiones citogenéticas muy grandes, incluso, brazos cromosómicos completos, lo que dificulta el rastreo de los genes posiblemente afectados en cada uno de los desbalances cromosómicos<sup>28-30</sup>.

Recientemente se ha reportado el uso de formatos de HGC basados en microarreglos y con mejores resultados que la HGCM. El formato que es una modificación de la HGCM y que ha venido a solucionar el problema de la resolución en la visibilidad de las diversas alteraciones presentes, es, la HGCa (Hibridación Genómica Comparativa en microarreglos)<sup>31</sup>.

La técnica es básicamente similar a la realizada en HGCM. Las muestras de DNA de interés se marca con una molécula fluorescente (comúnmente de color verde), lo mismo se hace con una segunda muestra control que se sabe tiene dos copias de DNA a lo largo de todos los cromosomas (comúnmente de color rojo). Al hibridar estas dos muestras al

soporte de vidrio que contiene los fragmentos de DNA de todo el genoma, se puede identificar aquellos fragmentos en los cuales la relación de señal entre los dos colores es mayor o menor que uno<sup>31</sup>.

En la HGCa se sustituyen las preparaciones de metafases por vectores que contienen fragmentos de los cromosomas humanos (clonas), los cuales se encuentran por lo general en cromosomas artificiales de bacterias (BAC's). Estas clonas son arregladas sobre soportes sólidos utilizando un robot microarreglador; de esta forma, la sensibilidad del método dependerá del tamaño de las sondas inmovilizadas sobre el cristal, las cuales nos permiten identificar regiones citogenéticas desde 1.5 Mpb hasta genes, brindándonos con esto, una mayor información acerca de las alteraciones moleculares asociadas al cáncer<sup>28</sup>.

Así entonces, con el desarrollo de la plataforma de hibridación genómica comparativa en microarreglos por Kallioniemi y col., se abrieron las puertas para el estudio global de las alteraciones cromosómicas en las distintas neoplasias, dado que existía la evidencia indicando que muchos oncogenes conocidos, resultaban afectados por amplificaciones en los tumores. Por otro lado, diferentes grupos de investigación, con el empleo de la HGCa y la HGCm, han logrado identificar una serie de desbalances cromosómicos presentes en CaCu, en donde las más frecuentes son, la ganancia de las regiones citogenéticas 3q, 5p, la pérdida del cromosoma 4 y la región 2q, entre otros<sup>26, 32</sup>.

En estudios recientes, nuestro grupo de investigación ha venido aplicando HGC en metafases y en microarreglos para determinar el patrón de alteraciones cromosómicas en lesiones premalignas y malignas de cuello uterino, con el objetivo de identificar diversos genes que se encuentran alterados en esta neoplasia, encontrando en los microarreglos que existen algunas alteraciones cromosómicas, como lo es la ganancia de la región citogenética 19q13.2q13.3, la cual se presentó en un estudio preliminar en más del 60% de los casos estudiados de CaCu y en 2/5 de los carcinomas *in situ*; región en la cual se encuentra un grupo de genes que forman parte de la familia de los antígenos carcinoembrionarios (CEA), sin embargo, utilizando herramientas bioinformáticas como *genome browser*, CGAP, *Source*, etc., se pudo identificar en estas alteraciones al gen *PSG1* como principal candidato en la asociación con la neoplasia<sup>6</sup>.

En cuanto a su implicación en cáncer, los primeros reportes de *PSG1* corresponden a la década de los 80's, los cuáles indican que esta proteína se encuentra en altas concentraciones en el suero sanguíneo de pacientes con cáncer de mama, sin embargo no existe en la actualidad reportes que establezcan la asociación entre la ganancia de copias extras del gen *PSG1* o de su expresión en CaCu<sup>33</sup>.

## Justificación

El cáncer cérvico uterino representa actualmente en nuestro país la segunda causa de muerte entre las mujeres adultas mayores de 30 años, con cerca de 14 muertes al día, lo que lo hace uno de los principales problemas de salud, además de que la incidencia de esta neoplasia en mujeres jóvenes cada vez es más común, al igual que la infección por VPH, lo que provoca un mayor interés hacia la enfermedad.

Por otro lado, a nivel molecular, la ganancia y pérdida de material genético es característico de las células transformadas; estas alteraciones se presentan desde los estadios tempranos y se establecen definitivamente en las etapas invasoras, lo cual hace importante la caracterización de dichas alteraciones genéticas, pues éstas, potencialmente nos arrojarán un punto de partida para su detección diferencial en el torrente sanguíneo, dado que a partir de estas alteraciones de material genético, será posible encontrar biomarcadores, que son proteínas derivadas de los tumores y que son producidas sólo o en mayor cantidad, en la neoplasia en comparación con pacientes sanos. Y dado que en la actualidad no se cuenta con potenciales marcadores moleculares para el pronóstico, diagnóstico y posible tratamiento de la enfermedad, el estudio a nivel molecular de los genes asociados al proceso carcinogénico para su mejor entendimiento, resulta de amplia importancia.

Por otra parte, dado que en estudios preliminares se reportó una amplificación en la región citogenética 19q13.2 en más del 70% de los casos estudiados por medio de hibridación genómica comparativa en microarreglos, es de gran importancia corroborar la existencia de dicho amplicón, así como su asociación con el CaCu.

## **Objetivo General**

- Caracterizar las ganancias de regiones cromosómicas del genoma del cáncer cérvico uterino.

## **Objetivos particulares**

- Determinar los desbalances en las regiones cromosómicas comúnmente asociadas a CaCu.
- Rastrear los genes asociados a las regiones comúnmente ganadas en el genoma del CaCu
- Obtener por medio de herramientas bioinformáticas la expresión diferencial normal vs cáncer, de los genes asociados a las regiones comúnmente ganadas en el genoma del CaCu.

# Materiales y Métodos

## Muestras

Se obtuvieron un total de 39 muestras de carcinoma cervical escamoso en el Servicio de Patología del Hospital General de Mexico, SS.

## Extracción y purificación de ADN

El ADN de las muestras se purificó utilizando el kit *Wizard SV Genomic* (Promega Co.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tejido fue homogenizado en Trizol y depositado en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se separaron las fases de RNA, DNA y proteínas con 200 $\mu$ l de cloroformo y centrifugación a 13,000g por 10 min. Para precipitar el ADN, se agregaron 300 $\mu$ l de etanol y se centrifugó a 2,000g por 5 min. Para separar el Trizol, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 1 ml de citrato de sodio en etanol 10% con centrifugación a 2,000g por 5 min., este procedimiento se realizó tres veces. Para lavar la pastilla, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 2,000g por 5 min. Para lisar las células del tejido, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 600 $\mu$ l de amortiguador de lisis (incluido en el kit), más 20 $\mu$ l de proteinasa K (20mg/ml) y se incubó durante 72 horas a 56°C. Una vez digerido el tejido, se adicionaron 200 $\mu$ l de la solución de precipitación de proteínas y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se centrifugó a 13,000g por 3 min., y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo con 600 $\mu$ l de isopropanol frío para precipitar el DNA. El DNA se centrifugó durante 1 min. a 13,000g, y las pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%, para ser finalmente rehidratada en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril. La calidad del DNA fue determinada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y la concentración fue determinada mediante espectrofotometría.

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

### **PCR**

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

### **Secuenciación de ADN**

El producto de la PCR con los iniciadores GP5/GP6(+), se purificó con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Co.). Para marcar la secuencia amplificada, se utilizó el kit *BigDye Terminator* de Perkin Elmer Applied Biosystems, y un iniciador (GP6+). Se siguieron las condiciones de reacción indicadas en el kit, 0.5µl de terminador Reddy reaction, amortiguador Mix 2µl, 1-3 ng de la secuencia amplificada por PCR, 3.2 pmol de iniciador y agua destilada para aforar a 20µl. La reacción de marcaje se realizó por PCR, con las siguientes condiciones: 94°C por 3 min. para desnaturalización, 25 ciclos de 94°C por 30s para abrir las cadenas; 55°C por 30s para alinear los iniciadores y 72°C por 45s para la elongación. Posteriormente, las muestras marcadas fueron purificadas utilizando las columnas del kit *DyeEx 2.0 Spin* de Quiagen y secuenciadas en un secuenciador *ABI PRISM 100*.

### **Tipificación**

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

## **Hibridación Genómica Comparativa sobre microarreglos**

Con ayuda del Doctor Alfredo Hidalgo Miranda, se realizó CGH en microarreglos a las muestras invasoras obtenidas, los análisis de CGHa se llevaron a cabo utilizando microarreglos de la Universidad de San Francisco California los cuales cubren la totalidad del genoma en clonas de 1.3 megabases.

### **Visualización y análisis**

La captura de imagen y análisis se llevó a cabo usando el sistema de lectura que captura de manera automatizada las imágenes del arreglo para los tres fluorocromos (Cy5, Cy3 y DAPI), crea la imagen compuesta, normalizada, obtiene los valores de intensidad de fluorescencia entre el ADN tumoral y el normal, y crea un reporte de las regiones de ADN que presentan cambios en el número de copias. El sistema reconoce como ganancias aquellas regiones donde la relación de fluorescencia tumoral/normal (T/N) sea mayor a 1.25 ( $\log_2=0.32$ ) y como pérdidas a las regiones con una relación menor a 0.75 ( $\log_2= -0.41$ ). Se consideró amplificación a las regiones con una relación superior a 2 ( $\log_2=1$ ), en base a parámetros previamente establecidos para experimentos de HGC sobre microarreglos<sup>34</sup>.

Los datos obtenidos fueron analizados por una “suite” de programas bioinformáticos Sproc y Spot con una de significancia estadística  $p>0.01$ . Posteriormente el enfoque fue a la detección de ganancias génicas.

Para la visualización gráfica de los datos generados por HGC sobre microarreglos, se utilizó la herramienta de visualización de datos de experimentos de (a)CGH de progenetix, el cual esta disponible en la dirección. <http://www.progenetix.com>.

## RESULTADOS

De las 39 muestras colectadas, 23 fueron positivas a VPH16 (INV HPV16), 12 fueron positivas a HPV, sin embargo, estas muestras no fueron genotipificadas (INV X), y las 4 restantes fueron positivas a VPH's 30's, 40's y 50's (INV 30's, 40's y 50's).

Los resultados obtenidos nos indican ciertos desbalances de interés: las ganancias cromosómicas o génicas más frecuentes son en el 1, 3q, 5p, 7p, 8q, 9q, 19q y 20 (Tablas 1, 2 y 3), en tanto las pérdidas cromosómicas en 3p, 4, 11 y 13q, sin embargo, las alteraciones con mayor frecuencia en este estudio fueron la pérdida del 16q23 y la ganancia del 19q13.2 (Gráficos 2 y 4), las cuales no han sido reportadas en este tipo de neoplasia, no obstante, esta última está presente en la mayoría de los casos estudiados, como se observa en las figuras 3, 4, 5 y 6, los cuales corresponde a aquellos positivos a VPH16, VPH inespecífico y VPH 30s, 40s y 50s, respectivamente, mientras que la pérdida 16q23, solo se observa en los casos positivos a VPH16 e inespecífico, y que corresponden a las figuras 3, 4 y 6, de las cuales, en los casos positivos a VPH inespecífico (Figura 4) es en donde la alteración resulta ser más consistente presentándose en más del 50% de los casos.

Por otro lado, para determinar la clona y los genes involucrados en la ganancia de la región 19q13.2, se obtuvieron las frecuencias de las clonas que hibridaron en el cromosoma 19, de las cuales, en todos los casos de invasoras estudiados (INV HPV16, INV X e INV 30s, 40s y 50s), la más frecuente resultó ser la *RP11-18J23* (Gráficos 1, 3 y 5), la cual corre desde las 43,384,059 pb, hasta las 43,384,171 pb; dicha clona se sometió a un análisis *in silico* mediante el software disponible en la pagina de [www.genomebrowser.uscs.edu](http://www.genomebrowser.uscs.edu) para determinar cuales eran los genes involucrados en esta alteración, y que como se muestra en la figura 10, estos genes son 5 miembros de la familia de las *PSG's* (Proteínas Específicas del Embarazo) y que corresponden a la *PSG1*, *PSG2*, *PSG3*, *PSG7* y *PSG11*; proteínas que, tal cual como se muestra en las figuras 11 a 15, no se expresan en ningún otro tejido más que en la placenta, a excepción de las *PSG's* 2 y 11, que como se observa en las figuras 12 y 15, respectivamente para cada una de estas *PSG's*, ambas son expresadas ligeramente en cáncer de riñón, sin embargo, ninguna de las otras *PSG's* (*PSG1*, *PSG3* y *PSG7*) han sido reportadas en alguna neoplasia, incluyendo la del cérvix uterino, para la cual, ninguna de estas proteínas ha sido descrita.

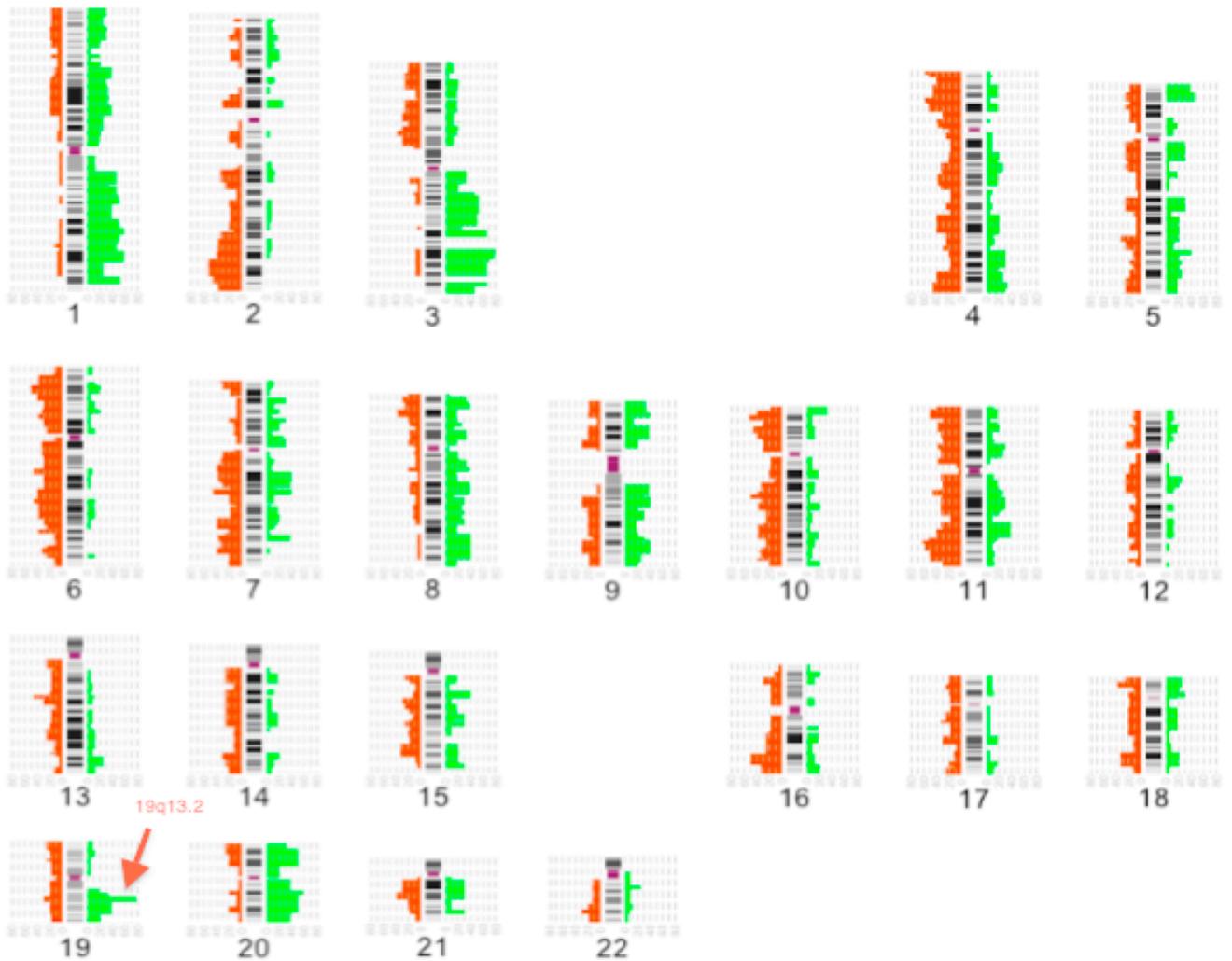


Figura 3. Cariograma de las muestras invasoras INV\_VPH16, en donde se observa que la ganancia más frecuente se encuentra en el cromosoma 19, región q13.2.

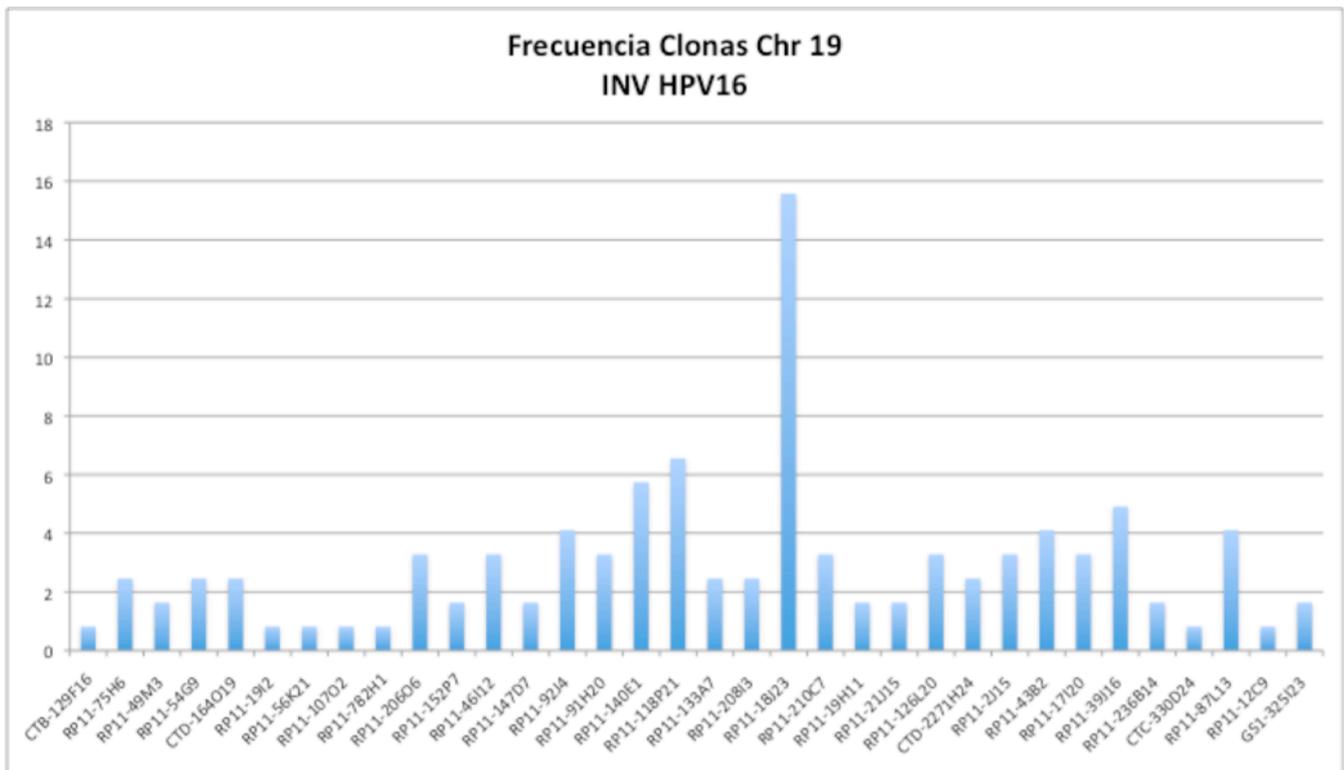


Gráfico 1. Se observa las frecuencias de las clonas que se alinearon con el cromosoma 19, mostrándose que la clona *RP11-18J23* es la más frecuente, con un 15% del total de las clonas con hibridación de tipo ganancia para este cromosoma.

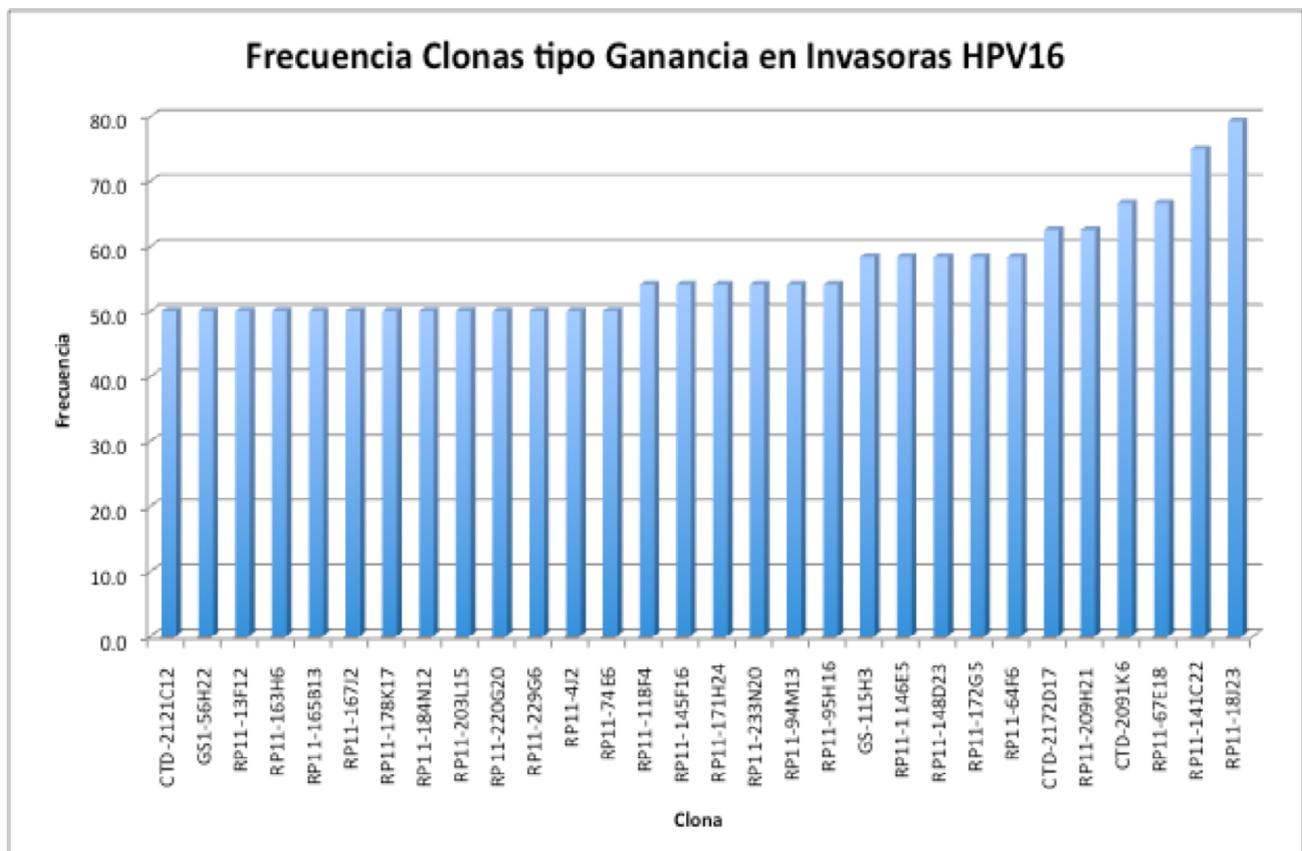


Gráfico 2. Frecuencia de clonas hibridadas de más del 50% en los casos de tipo ganancia, correspondientes a las muestras INV\_VPH16. La clona más frecuente en estos casos fue *RP11-18J23* con un 79.2%.

| Clona       | Región       |
|-------------|--------------|
| CTD-2121C12 | 3q22         |
| GS1-56H22   | 17ptel       |
| RP11-13F12  | 20q12        |
| RP11-163H6  | 3q26.2-q26.3 |
| RP11-165B13 | 3q13.3       |
| RP11-167J2  | 1q32         |
| RP11-178K17 | 3q28         |
| RP11-184N12 | 1q24         |
| RP11-203L15 | 3q25-q26.1   |
| RP11-220G20 | 3q13.3       |
| RP11-229G6  | 3q24         |
| RP11-4J2    | 1q23         |
| RP11-74E6   | 1q32-q41     |
| RP11-118F4  | 3q26.3-3q27  |
| RP11-145F16 | 3q24         |
| RP11-171H24 | 1q22-23      |
| RP11-233N20 | 3q29         |
| RP11-94M13  | 8q24.2       |
| RP11-95H16  | 3q21         |
| GS-115H3    | 3q21-q28     |
| RP11-1146E5 | 3q24         |
| RP11-148D23 | 3q26.2       |
| RP11-172G5  | 3q26.3       |
| RP11-64F6   | 3q24-3q25    |
| CTD-2172D17 | 3q26         |
| RP11-209H21 | 3q24-3q25    |
| CTD-2091K6  | 3q27-3q28    |
| RP11-67E18  | 3q28         |
| RP11-141C22 | 3q26.1       |
| RP11-18J23  | 19q13.2      |

**Tabla 1. Se muestran cada una de las clonas presentes en el gráfico 2, así como la región de hibridación de cada una de ellas.**

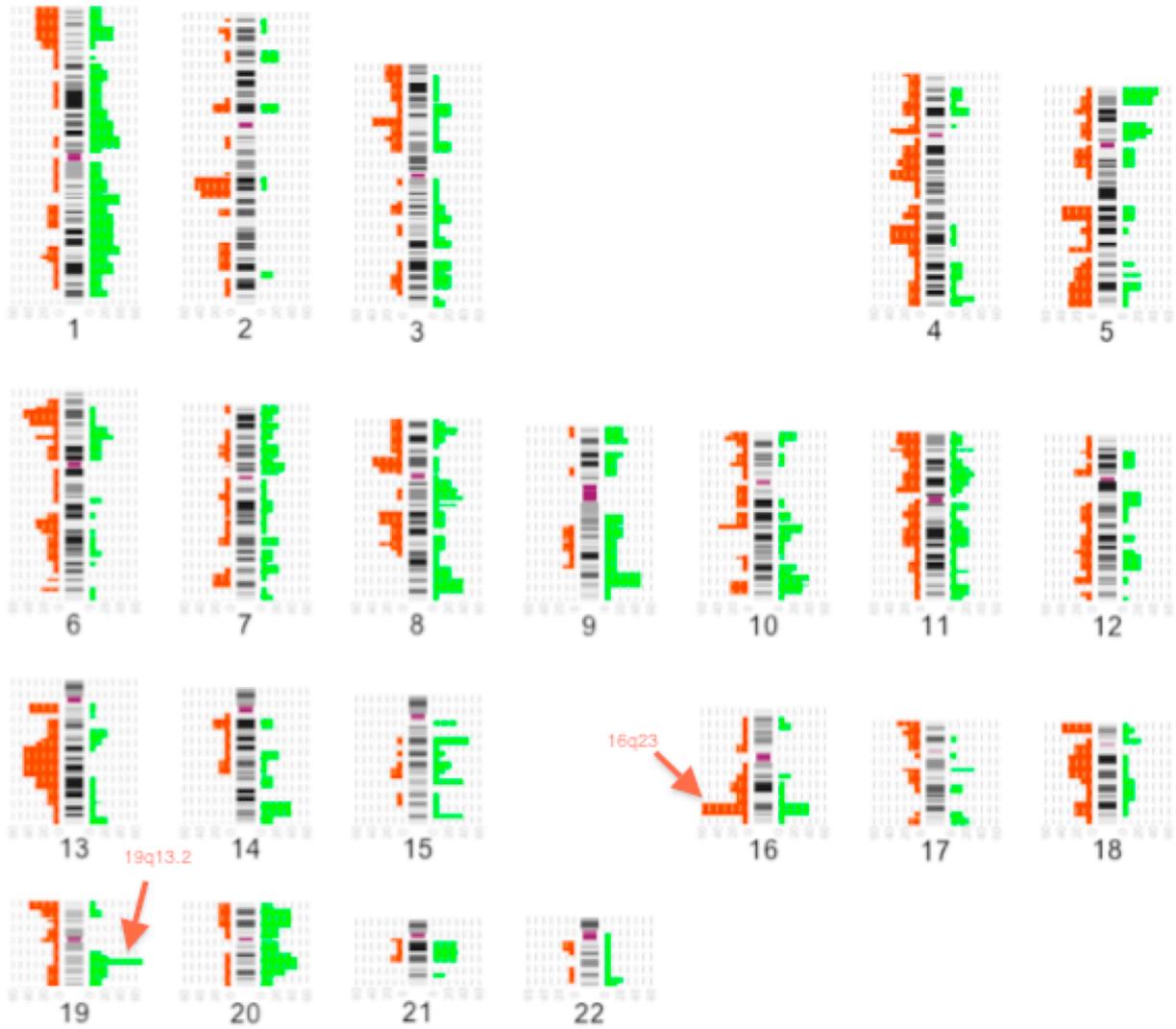


Figura 4. Cariograma correspondiente a las muestras INV\_X, en la cual podemos observar que la region 19q13.2 es la ganancia más frecuente, sin embargo también se observa un alt porcentaje de pérdida en la region 16q23.

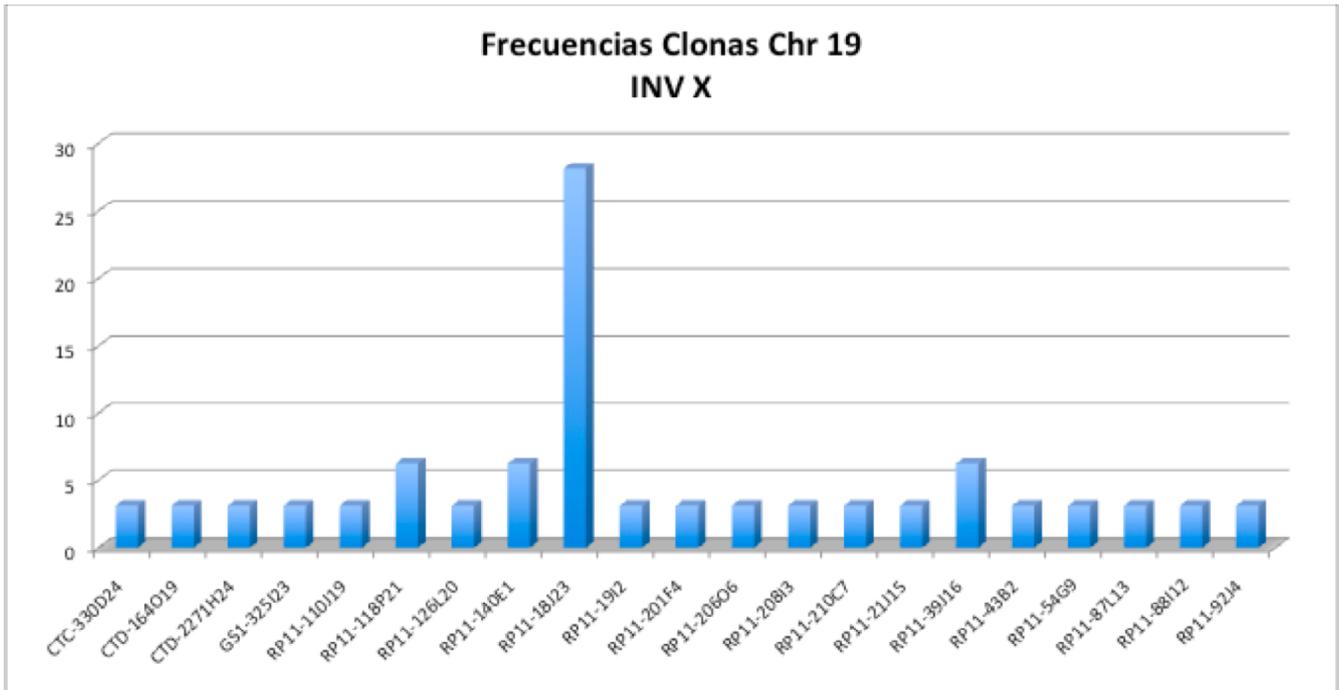


Grafico 3. Frecuencia de las clonas alineadas en el cromosoma 19 correspondientes a los casos INV\_X, en donde la clona *RP11-18J23* es la más frecuente, con un 28.12% del total de las clonas hibridadas de tipo ganancia para este cromosoma.

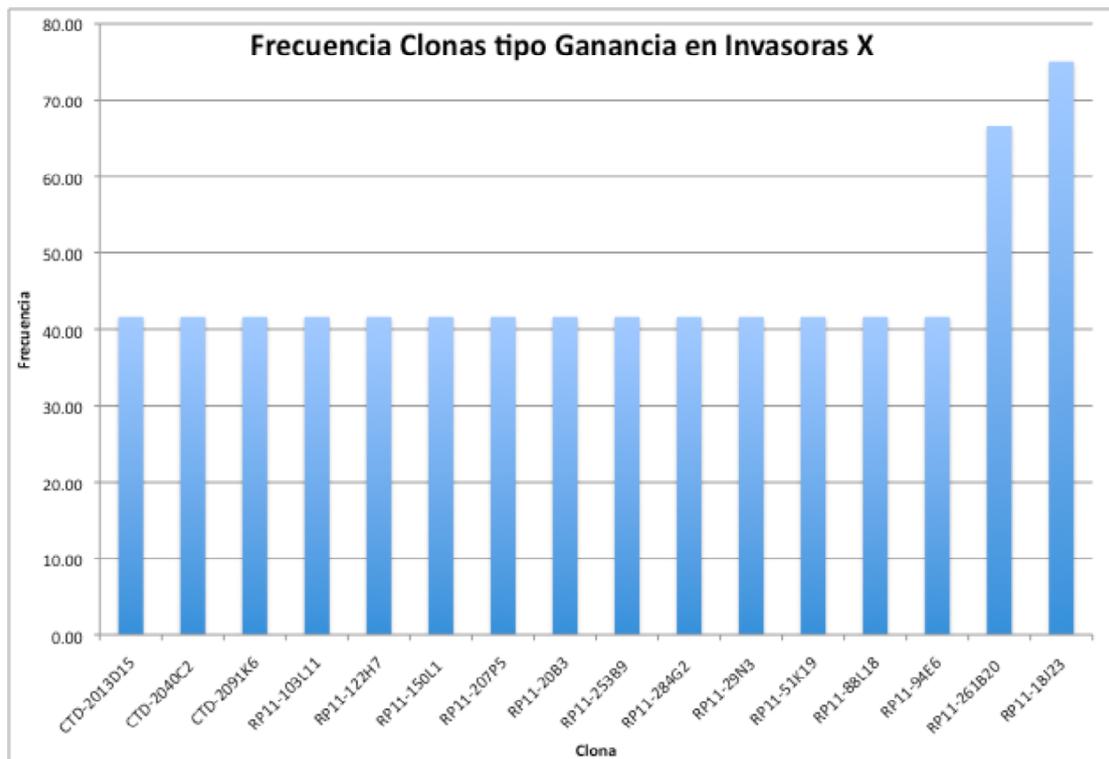


Grafico 4. Se muestra la frecuencia de las clonas hibridadas con más del 40% de los casos de tipo ganancia, correspondientes a las muestras invasoras positivas a VPH sin especificar, en donde la clona *RP11-18J23* es la más frecuente con un 75% del total de los casos.

| Clona       | Región        |
|-------------|---------------|
| CTD-2013D15 | 20p12         |
| CTD-2040C2  | 5p15.2        |
| CTD-2091K6  | 3q27-3q28     |
| RP11-103L11 | 5p15.3        |
| RP11-122H7  | 8q24.2        |
| RP11-150L1  | 9q33          |
| RP11-207P5  | 1p33-1p34.1   |
| RP11-20B3   | 5p15.3        |
| RP11-253B9  | 5p13.2        |
| RP11-284G2  | 16q23         |
| RP11-29N3   | 5p15.2        |
| RP11-51K19  | 20q13.1       |
| RP11-88L18  | 5p14.3-5p15.1 |
| RP11-94E6   | 5p13          |
| RP11-261B20 | 5p15.2        |
| RP11-18J23  | 19q13.2       |

**Tabla 2.** Se muestran cada una de las clonas presentes en el gráfico 4, así como la región de hibridación de cada una de ellas, correspondientes a las muestras INV\_X.

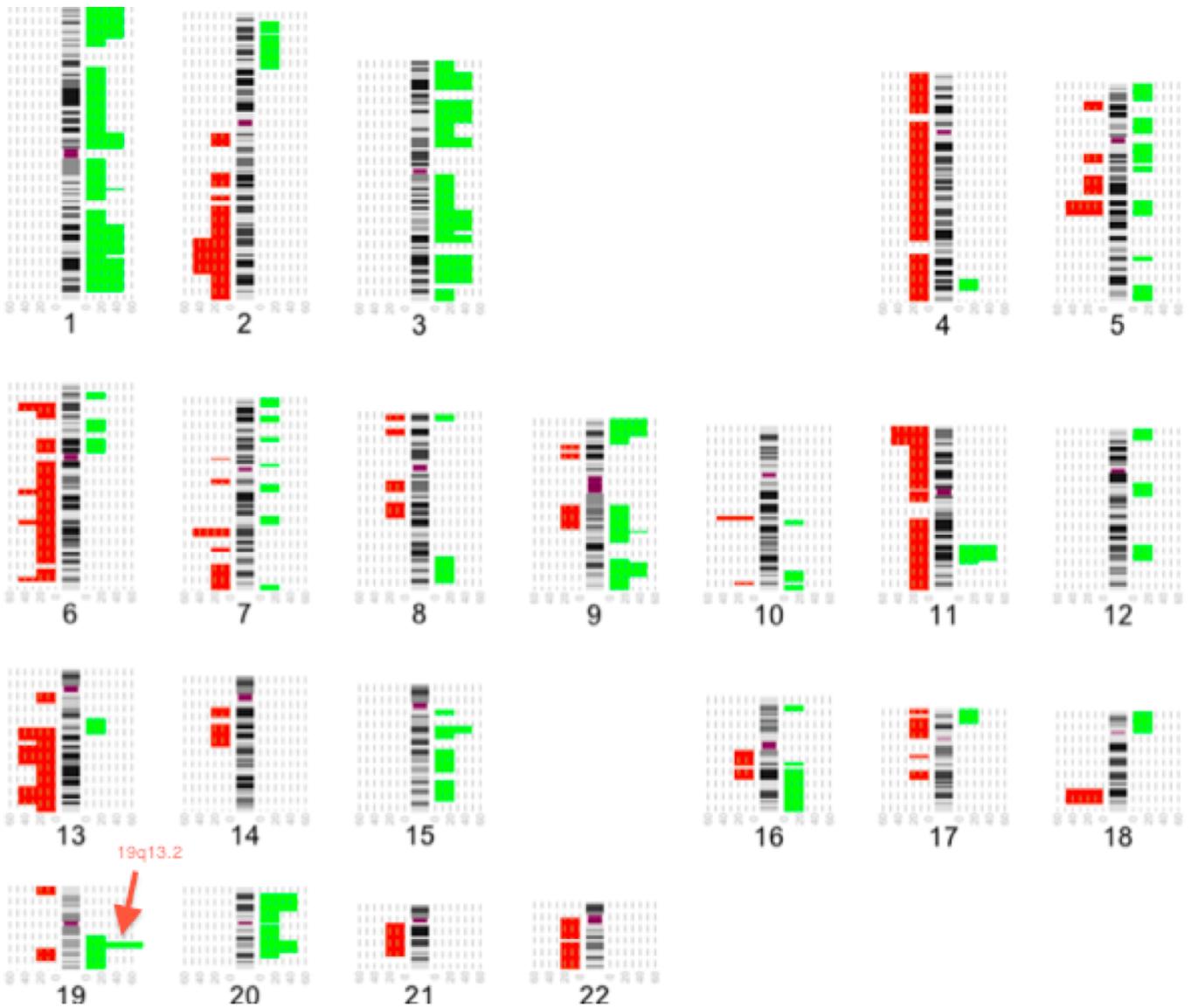


Figura 5. Cariograma correspondiente a las muestras INV\_VPH 30's, 40's y 50's, en el cual la ganancia que se presenta en el mayor porcentaje de los casos corresponde a la region 19q13.2.

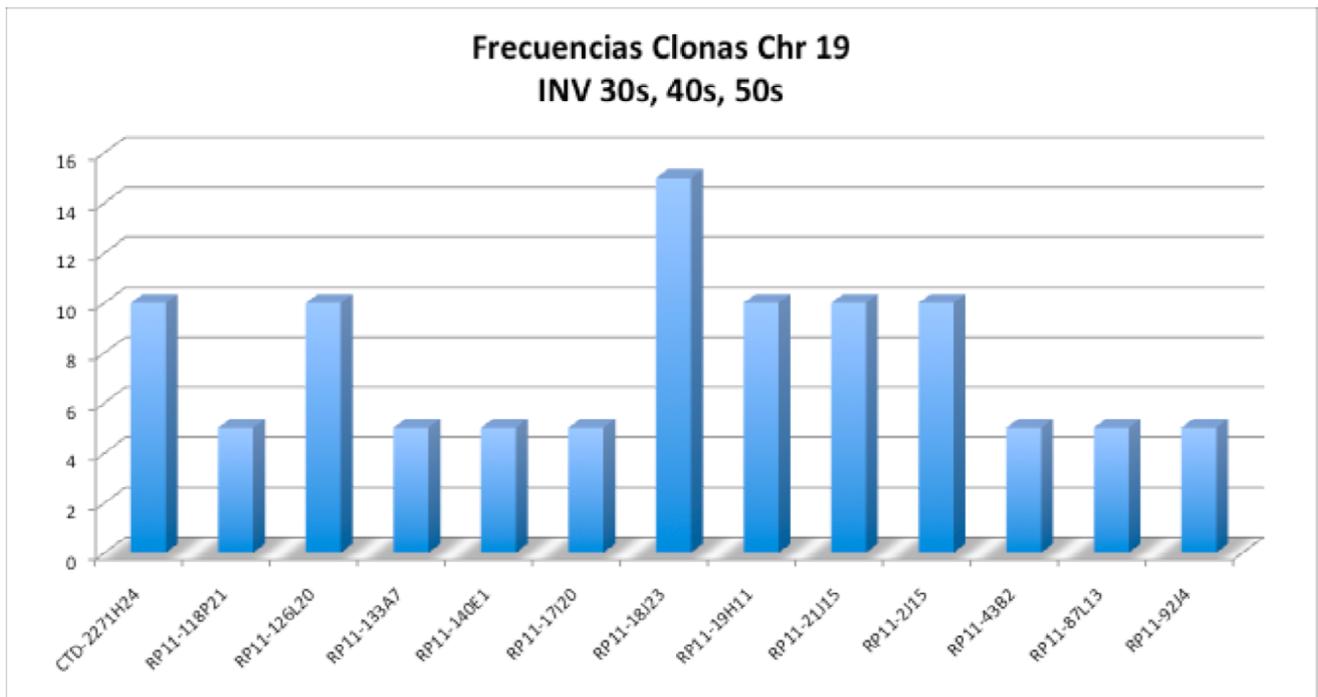


Gráfico 5. Frecuencia de las clonas alineadas con el cromosoma 19 para los casos correspondientes a las muestras INV\_VPH's 30's, 40's y 50's, siendo la clona *RP11-18J23* la más frecuente para este cromosoma.

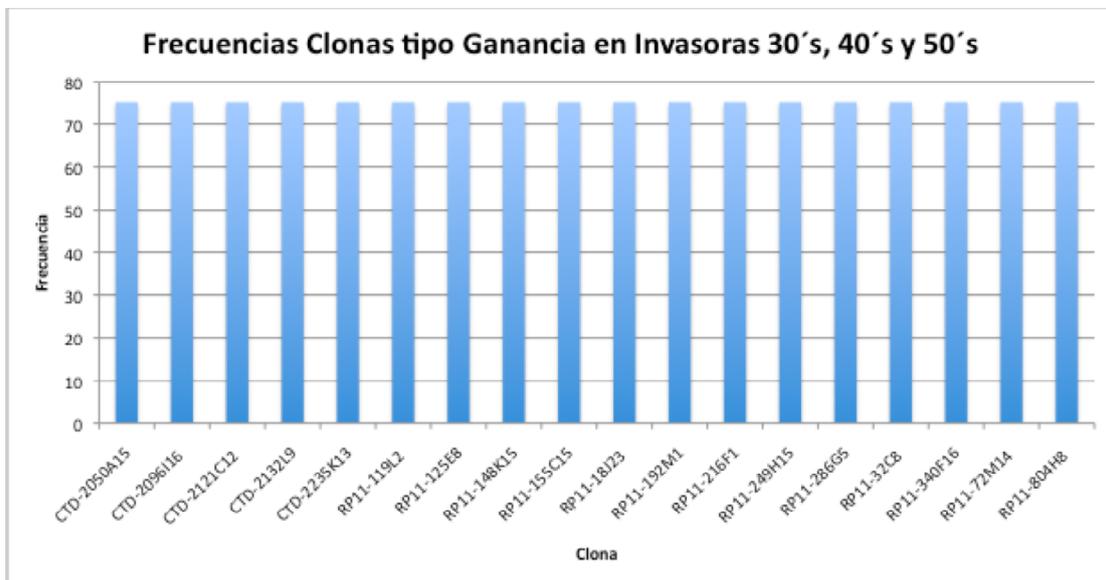


Gráfico 6. Se muestra la frecuencia de las clonas hibridadas con un 75% del total de los casos correspondientes a las muestra INV\_VPH's 30's, 40's y 50's. No se observa diferencia entre cada una de las clonas.

| Clona       | Región      |
|-------------|-------------|
| CTD-2050A15 | 1p12        |
| CTD-2096I16 | 1q21-22     |
| CTD-2121C12 | 3q22        |
| CTD-2132L9  | 3p21.3-3p22 |
| CTD-2235K13 | 1q41        |
| RP11-119L2  | 3p21-3p22   |
| RP11-125E8  | 3q26.3-3q27 |
| RP11-148K15 | 1q31        |
| RP11-155C15 | 1q42-43     |
| RP11-18J23  | 19q13.2     |
| RP11-192M1  | 1q42        |
| RP11-216F1  | 1q32.2      |
| RP11-249H15 | 1q32.1      |
| RP11-286G5  | 3p22        |
| RP11-72M14  | 1p13        |

**Tabla 3. Se muestran cada una de las clonas presentes en el gráfico 6, así como de la región de hibridación de cada una de ellas. Corresponden a las muestras INV\_VPH's 30's, 40's y 50's.**

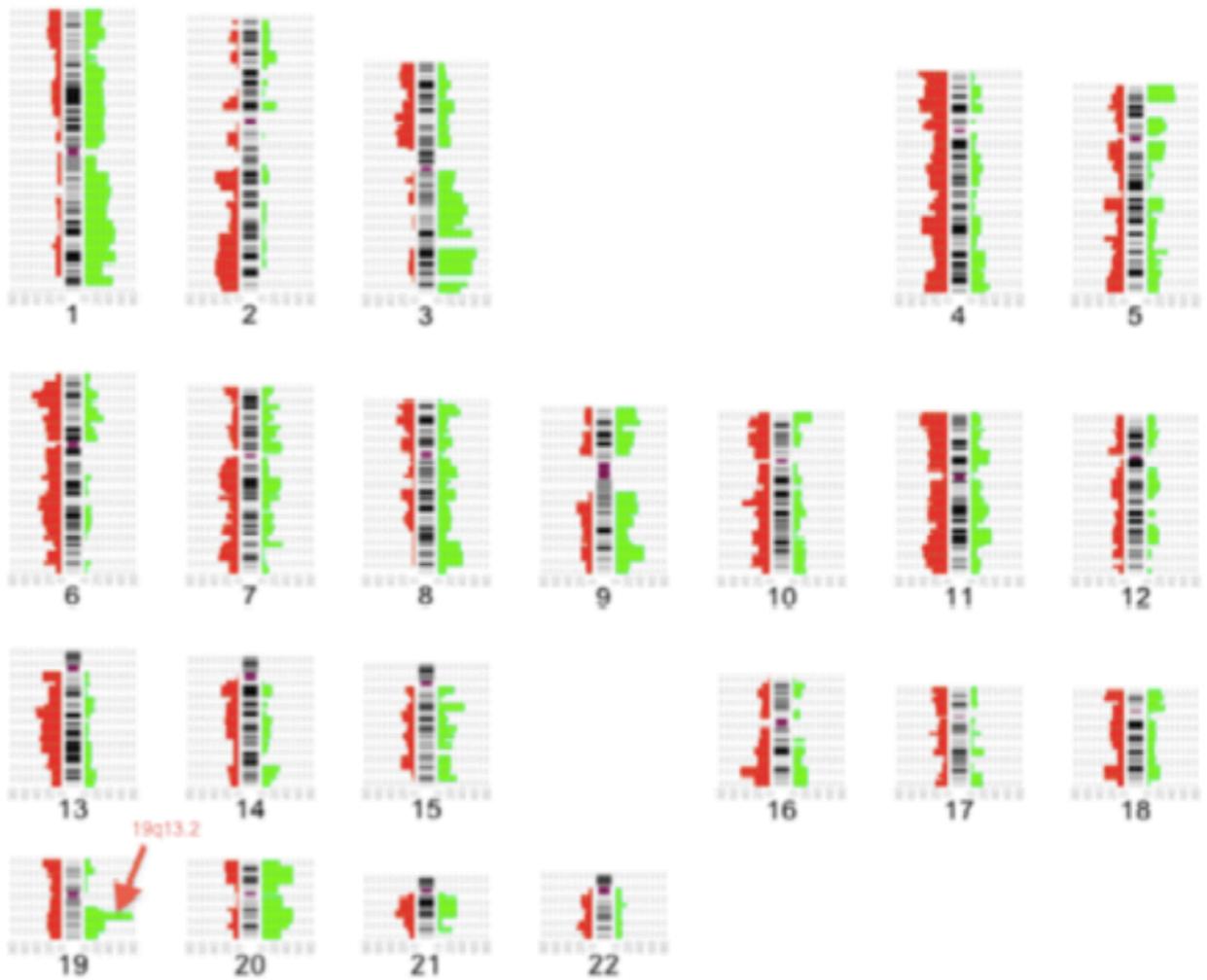


Figura 6. Cariograma en el cual se agrupan todos los casos (INV\_VPH16, INV\_X e INV\_30's, 40's y 50's), en donde la ganancia de la region 19q13.2 resultó ser la más frecuente en las lesiones invasoras.

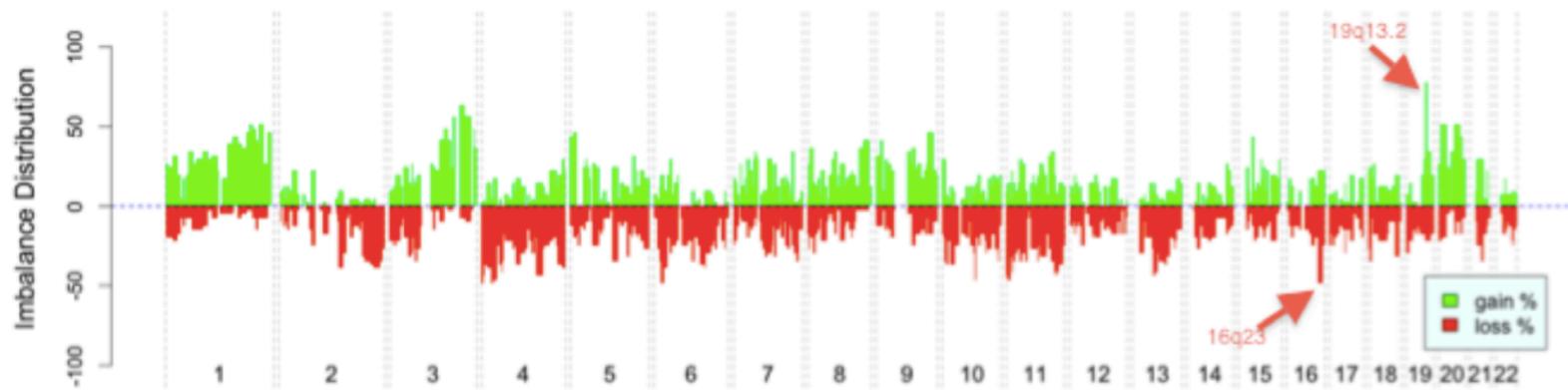


Figura 7. Se muestra la distribución de desbalances presentes en todos los casos de invasoras, desde el cromosoma 1 al 22, en el cual se evidencia que en el caso de las ganancias, la región 19q13.2 es la que presenta un mayor porcentaje, sobresaliendo de todas las demás; para el caso de las pérdidas, la región 16q23 es la que sobresale de todas las demás.

## UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

move <<< << < > >> >>> zoom in 1.5x 3x 10x base zoom out 1.5x 3x 10x

position/search chr19:43,384,091-43,384,139 gene  jump clear size 49 bp. configure

chr19 (q13.2) 19p13.3 19p13.2 13.11 19p12 19q12 19q13.2 13.33

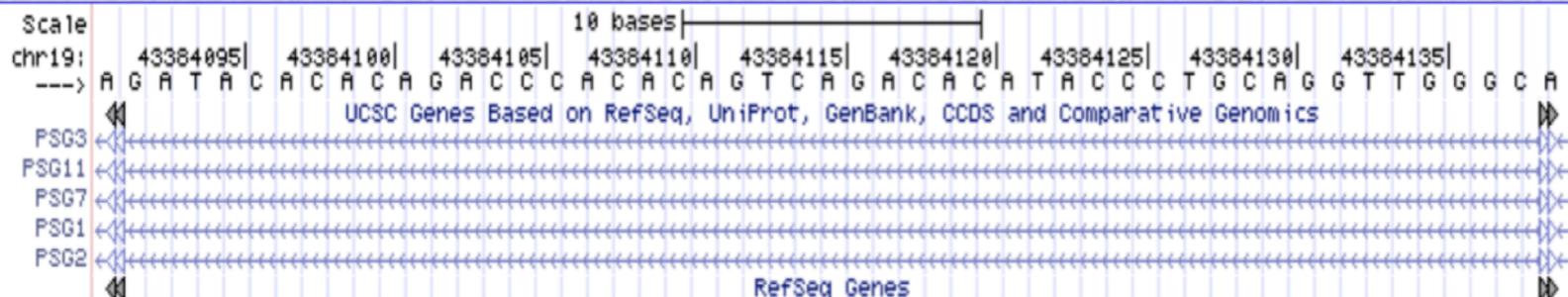


Figura 8. Exploración de los genes que contiene la clona *RP11-18J23* en el cromosoma 19, en donde se observa la presencia de 5 *PSG*'s (*PSG 1, 2, 3, 7 y 11*).

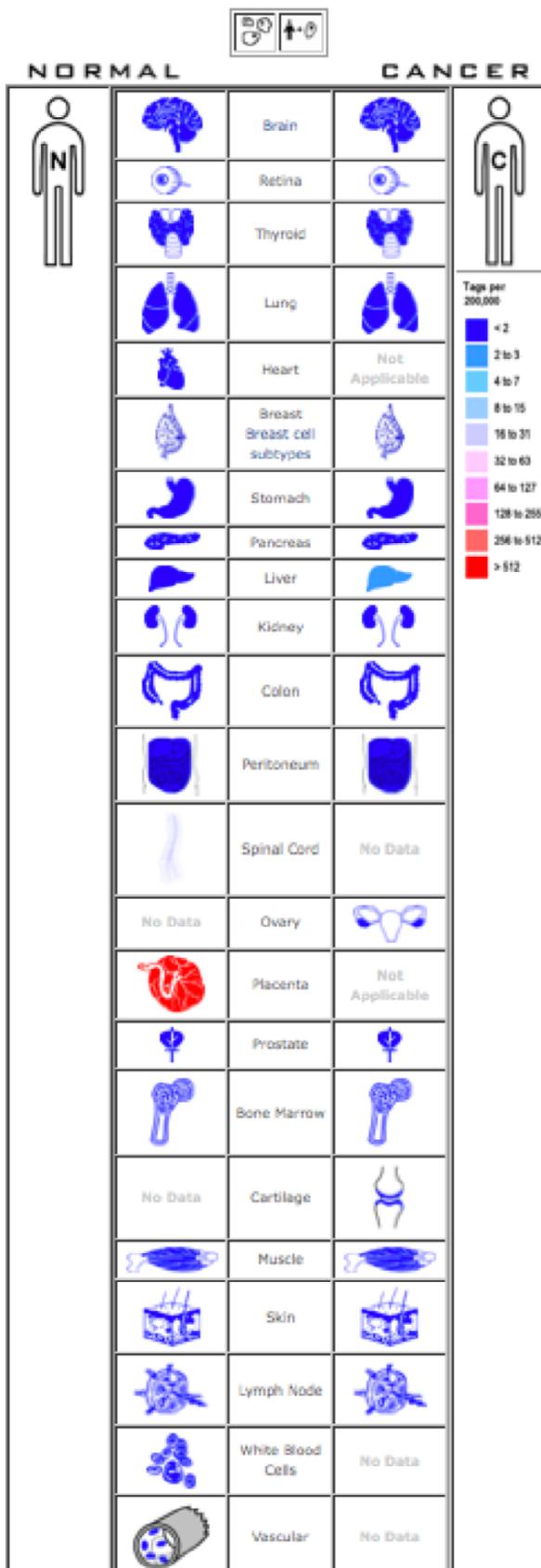


Figura 9. Visualizador anatómico SAGE correspondiente a la PSG1, en donde la expresión de esta proteína es exclusiva, en condiciones normales, de la placenta, mientras que en cáncer, no existe una expresión importante.

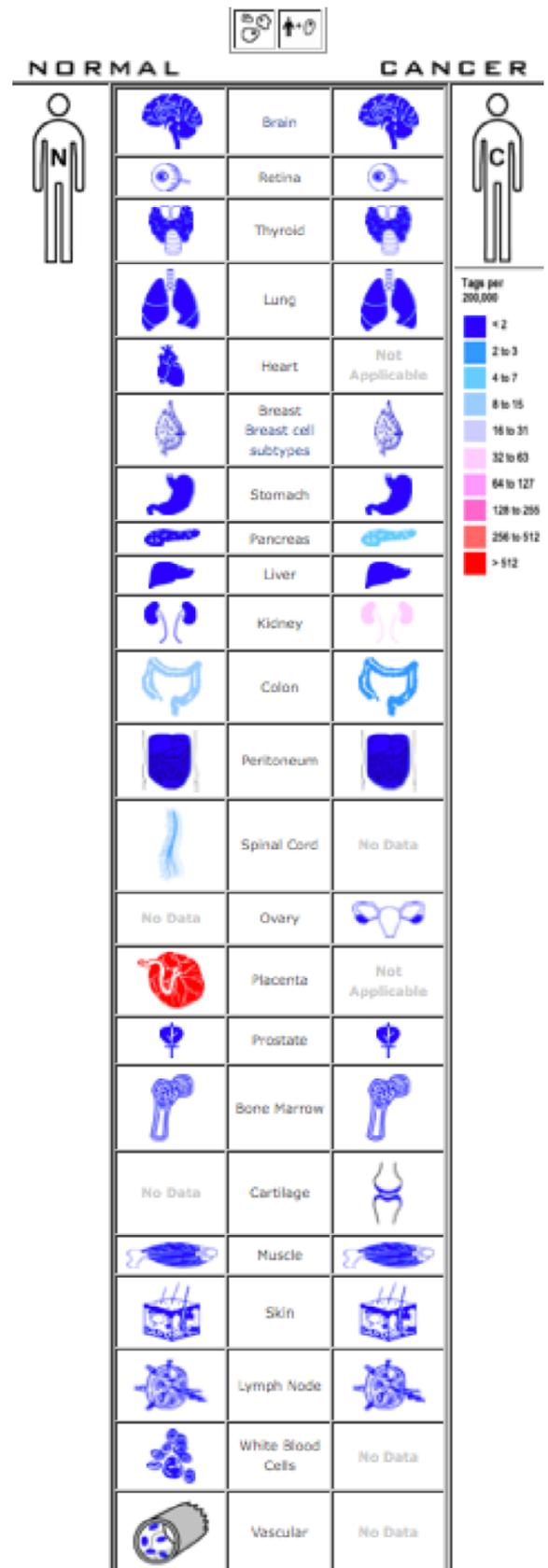


Figura 10. Visualizador anatómico SAGE correspondiente a PSG2, en donde se observa que esta proteína se expresa en condiciones normales en la placenta; en el cáncer de riñón se observa una importante expresión.

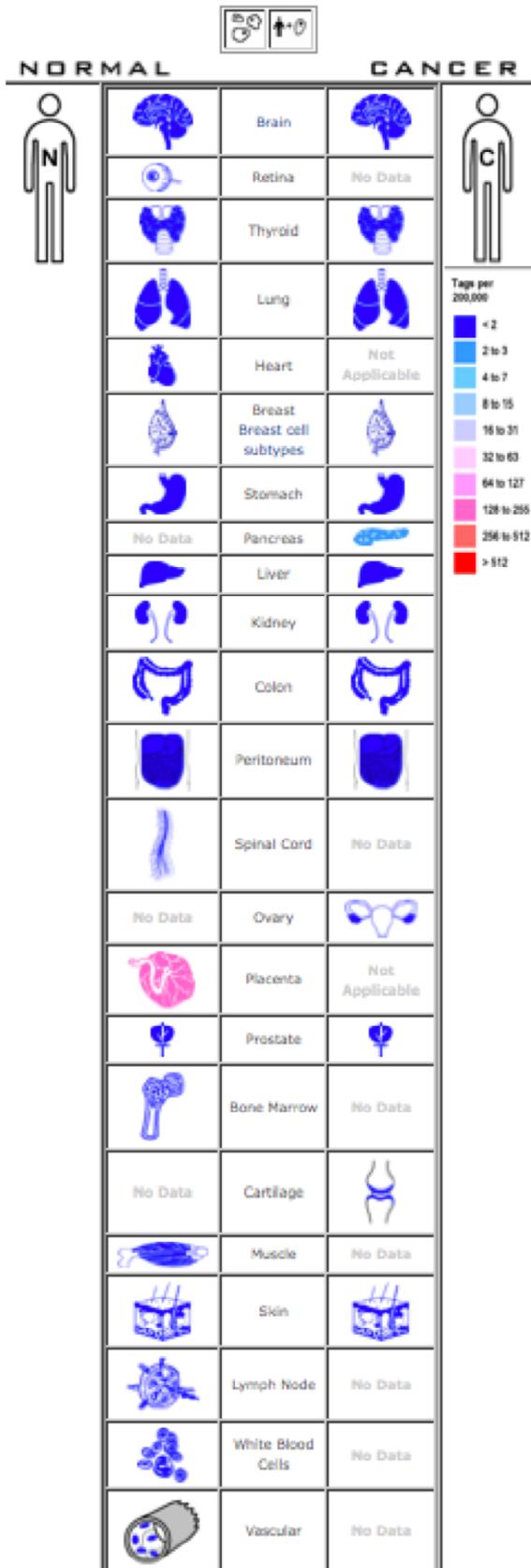


Figura 11. Visualizador anatómico SAGE correspondiente a la PSG3, en donde la expresión de esta proteína está restringida a la placenta en condiciones normales.

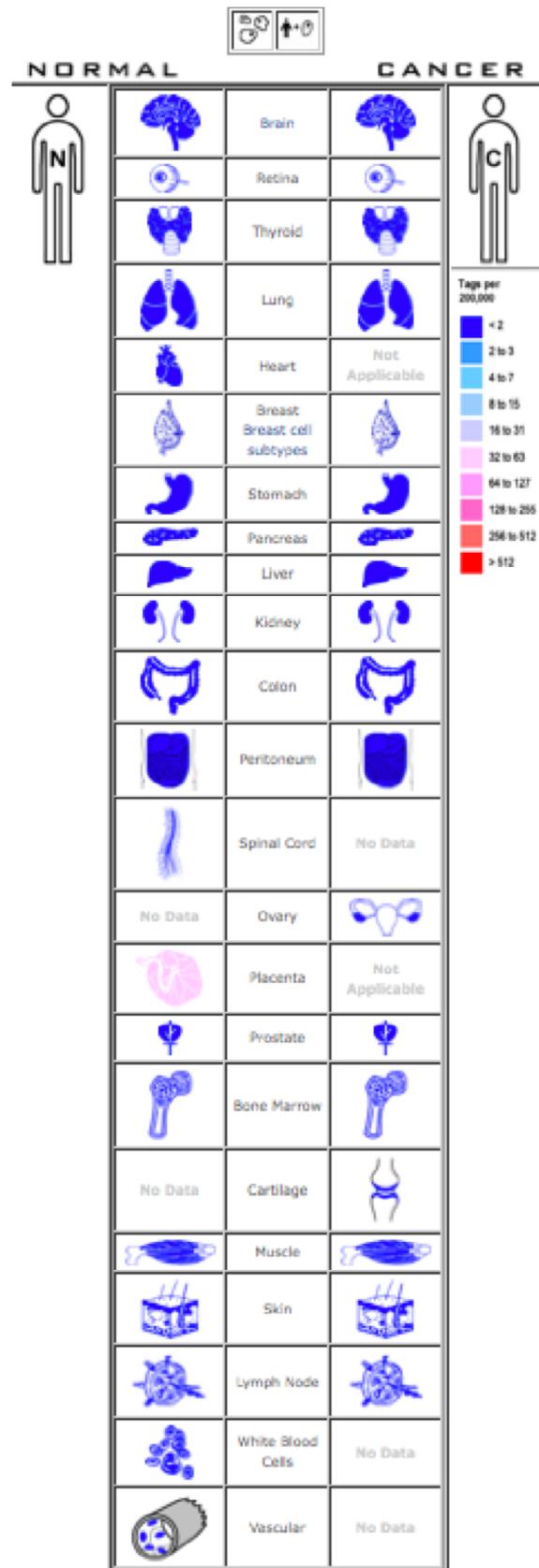


Figura 12. Visualizador anatómico SAGE correspondiente a las PSG7, su expresión, a diferencia de los otros miembros PSG, es débil en la placenta, sin embargo, no se expresa en otro tejido, tanto en condiciones normales como en cáncer.

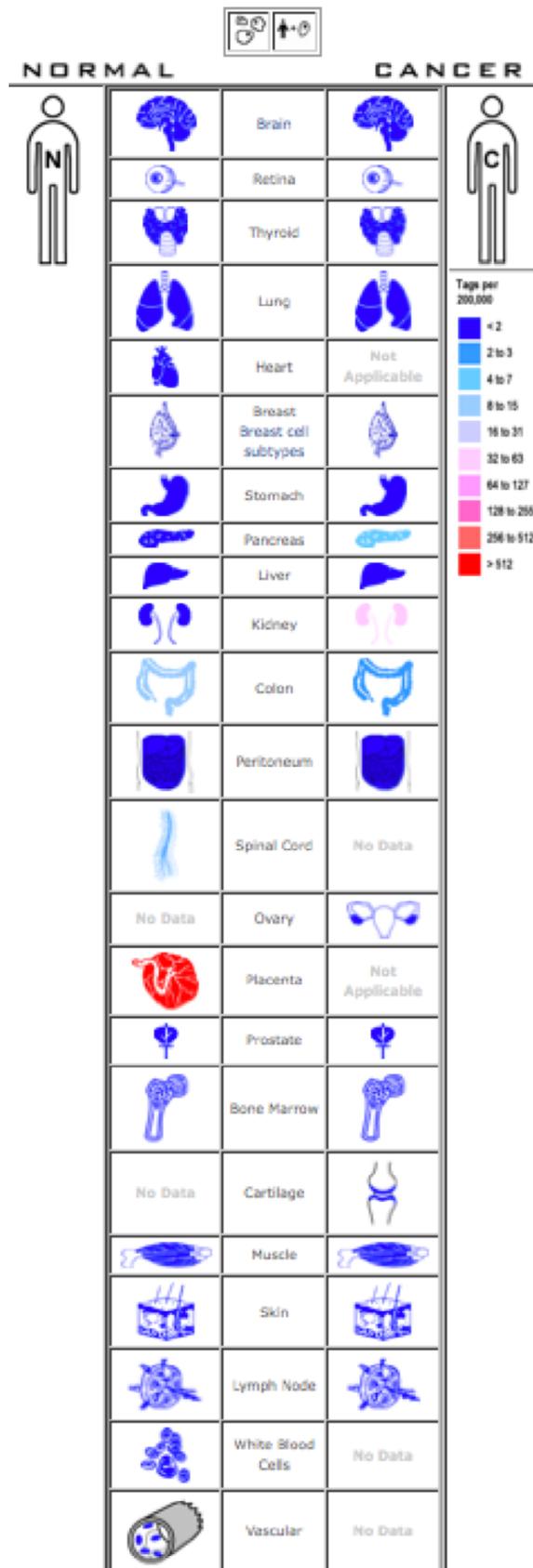


Figura 13. Visualizador anatómico SAGE correspondiente a la PSG11, en donde la expresión de esta proteína solamente se encuentra en placenta en condiciones normales y en cáncer no existe expresión de la misma.

Para la pérdida de la región 16q23, la clona correspondiente es la RP11-253O10, la cual muestra la región del cromosoma 16 que corre desde las 75,543,600 pb hasta las 75,543,980 pb (Figura 8) y que contiene las EST's (*Expressed sequence tag* o marcador de secuencia expresada) para la proteína transmembranal 231 (*TMEM231*), que se ha encontrado en microarreglos de expresión para cáncer de mama, colon y principalmente en leucemia (Figura 9); para la proteína transmembranal 170A (*TMEM170A*), ambas proteínas son integrales, sin embargo, su función aún no es conocida.

## SOURCE

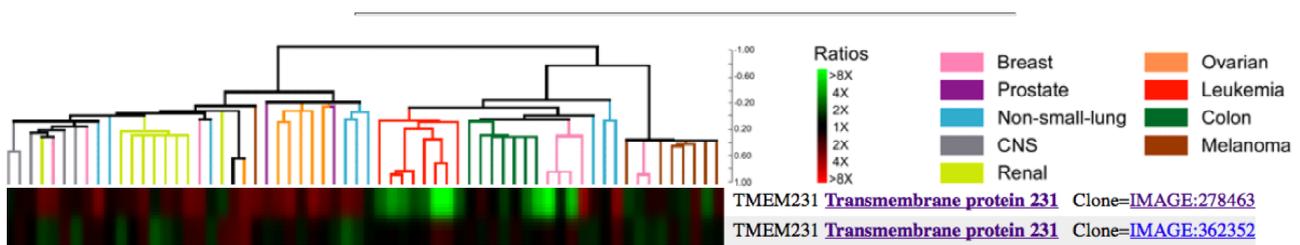


Figura 14. Se muestran los clusters obtenidos de un microarreglo de expresión en donde se puede observar en color verde, aquellos clusters que contienen la secuencia de expresión, que en el caso de la proteína transmembranal 231, corresponden principalmente para los cánceres de mama, colon y mayoritariamente en leucemia (<http://www.smd.stanford.edu>)

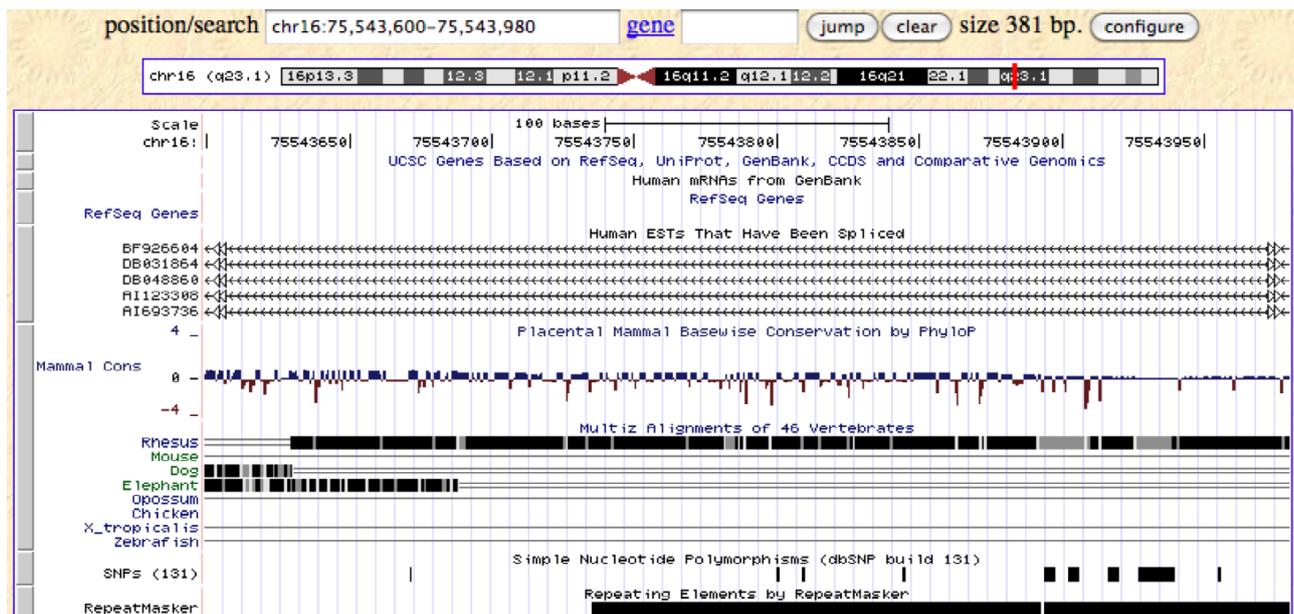


Figura 15. Exploración de genes para la clona RP11-253O10, que como se observa en la figura, corresponde al cromosoma 16. La presencia de 4 EST's, corresponden a las proteínas transmembranales 231 y 170A (*TMEM 231* y *170A*).

## DISCUSIÓN

Se sabe que las alteraciones genéticas que se encuentran en cualquier tipo de tumores son variadas, sin embargo, para cada neoplasia existen alteraciones cromosómicas características, y en el caso del cáncer cérvico uterino, no es diferente, pues las alteraciones encontradas en este estudio son similares a las reportadas en otras publicaciones, como es el caso de los reporte hechos por Hidalgo *et al.* 2003, Hidalgo *et al.* 2005 y Rao *et al.* 2004, en los cuales se observa que las regiones comúnmente ganadas son: 1, 3q, 5p, 9q y 20; en el caso de las regiones comúnmente perdidas son: 3p, 4, 11 y 13q, lo cual es coincidente con lo encontrado en este estudio, sugiriendo que estas regiones pueden ser consideradas como zonas con genes asociados al cáncer (como oncogenes o genes supresores de tumores, respectivamente), sin embargo, se ha reportado que uno de los eventos genéticos más importantes en la progresión a CaCu, es la ganancia en el 3q y que ha sido encontrada desde lesiones precursoras a CaCu con un importante rol en el desarrollo tumoral<sup>36</sup>, alteración para la cual se han propuesto diversos genes que pudieran estar participando en dicha progresión tumoral, como son *CRBP1*, *CRBP2*, *Tp63*<sup>26</sup> y *PIK3CA*<sup>36</sup>. Por otro lado diversos estudios han demostrado un valor pronóstico de algunas de las alteraciones cromosómicas en el CaCu, como lo es la pérdida del 11p, 18q y la ganancia y sobreexpresión de *EGFR* (Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal) en 17q con mal pronóstico<sup>26</sup>, la pérdida del 9q con metástasis, y la pérdida del cromosoma 4, para un papel decisivo en la progresión al CaCu, por la inactivación de uno o varios genes desde las primeras etapas de la neoplasia, así como de la prevalencia de la pérdida del 13q y la subsecuente inactivación de *RB1* (gen supresor de Retinoblastoma) por la ausencia de este gen<sup>37-39</sup>, no obstante, en este estudio, las pérdidas 11p, 18q y 9q no se encontraron de manera significativa.

Se ha observado que el aumento de la dosis génica mediante la amplificación del DNA, es un mecanismo común en varios tipos de tumores relacionados con la sobreexpresión de algunos genes, especialmente los oncogenes, y que su amplificación ha sido asociada a variantes tumorales más agresivas y resistentes a quimioterapia<sup>40</sup>, lo cual hace importante la exploración de cada una de las ganancias cromosómicas, con fines de encontrar oncogenes de interés, o posibles marcadores tumorales.

Por otra parte, en el presente estudio, una de las alteraciones más consistentemente observadas, y presente en el 70% de los casos, es una ganancia en el brazo largo del cromosoma 19, y que fue mapeada en la región 19q13.2, la cual, se sometió a un análisis *in silico* utilizando diversas bases de datos como *genome browser*, *gene cards*, *CGAP* y *source Stanford*; mediante el cual se identificó a un grupo (*cluster*) de genes de la familia

de las proteínas específicas del embarazo (*PSG1*, *PSG2*, *PSG3*, *PSG7* y *PSG11*), las cuales están relacionadas directamente con el embarazo<sup>41</sup> y que son sintetizadas en la placenta preferencialmente en el sincitiotrofoblasto<sup>42</sup>. Ya sintetizada, la proteína es liberada al torrente sanguíneo<sup>43</sup>, sin embargo a la fecha su función aún es poco conocida, no obstante un miembro de esta familia, el gen *PSG6* se le ha asociado con la mola hidatiforme<sup>44</sup> y se ha sugerido que la proteína *PSG1* se encuentra participando de forma activa como un inmunomodulador, de tal forma que suprime ciertos genes del sistema inmune de la madre, permitiendo la implantación del embrión, invasión del endometrio y formación de la placenta de manera controlada<sup>45</sup>, además de funcionar también como inductor de factores de crecimiento pro-angiogénicos<sup>46</sup>. Por otro lado ha sido reportado que la deficiencia de esta glicoproteína durante el periodo de gestación, provoca diversas patologías asociadas al embarazo, dentro de ellas se encuentran: preeclampsia, aborto espontáneo y desarrollo retardado, entre otras<sup>47</sup>, cabe mencionar que estas glicoproteínas son de las más abundantes en la sangre durante el embarazo y tan solo la *PSG1* es detectada a la segunda y tercera semana de gestación a concentraciones de 200 a 400 µg/ml<sup>48</sup> y conforme el embarazo progresa, los niveles de la molécula aumentan<sup>49</sup>.

Por otra parte, es de especial interés mostrar que entre la célula transformada (cáncer) y el embarazo existe una gran similitud en los mecanismos de invasión, tolerancia de la respuesta inmune, proliferación e incluso angiogénesis<sup>50</sup>. Con lo cual es posible sugerir una clara asociación de los *PSG*'s con el desarrollo de la neoplasia del cérvix uterino, así como de algunas otras, y que pudieran considerarse como posibles marcadores tumorales. Esto es soportado por una primera evidencia de esta asociación en un reporte de la década de los 80's, donde se detectaron altas concentraciones de la *PSG1* en el suero de pacientes con cáncer de mama<sup>51</sup>, así como de posteriores en donde se ve implicado como potencial marcador a las *PSG*'s en cáncer de colon y recto y de pulmón<sup>52</sup>. Diversos estudios han sido realizados para definir el papel de las *PSG*'s durante el embarazo. Quizá uno de los trabajos que muestran el papel de inmunomodulador es el de Snyder *et al.* 2001, donde demostraron que las *PSG*'s pueden inducir la producción de citocinas anti-inflamatorias como *IL10*, *IL6*, *TGFB* sugiriendo una modulación de la respuesta inmune innata<sup>53, 54</sup>.

Por otro lado, el papel del sistema inmune en la eliminación de la infección por el VPH no es claro aún, pero hay evidencias que muestran que la respuesta mediada por células es importante en el control de la infección viral. Así, se ha demostrado que la supresión de la respuesta inmune en los tumores es principalmente mediada por la *IL10*. El papel de *IL10* en la desregulación de la respuesta inmune específica para tumores puede presentarse

en los siguientes mecanismos: 1) suprimiendo directamente la producción de *IFN-γ* e *IL12* evitando la activación de los linfocitos T citotóxicos y por las células NK; 2) reduciendo la expresión de moléculas del sistema *HLA* sobre la superficie de las células tumorales y 3) inhibición de la presentación de antígenos tumorales por las células profesionales presentadoras de antígeno<sup>55</sup>.

Se ha observado también que en sueros de pacientes con CaCu existe altos niveles de *IL10*, en tanto en pacientes con lesiones precursoras de alto grado también es posible encontrar altos niveles de esta *IL10*, pero menores a los de pacientes de CaCu, sugiriendo así que uno de los mecanismos por los cuales estos pacientes no presentan una respuesta inmune celular adecuada es debida en parte a la presencia de la citocina anti-inflamatoria *IL10*.

Por otra parte, tanto en los mecanismos de embarazo, como en cáncer, la inmunomodulación no es el único proceso que se lleva a cabo, y tampoco el único en el que las *PSG's* podrían estar actuando, pues, también se ha reportado que estas proteínas pueden tener un papel importante en los procesos de implantación y activación de la angiogénesis, actuando en este último por la capacidad de las *PSG's* para inducir la expresión de *TGFB1* en diferentes tipos celulares, como en los monocitos primarios y células endoteliales primarias; y por la habilidad de esta citocina para regular a la familia *VEGF* (factor de crecimiento vascular endotelial), que incluyen a *VEGFA*, *B*, *C*, *D* y *PGF* (factor de crecimiento placentario); sin embargo, también se ha observado que la *PSG1* induce la formación de tubos celulares endoteliales en presencia o ausencia de *VEGFA*<sup>56</sup>, en donde, por medio de la unión de la *PSG1* a algunos proteoglicanos y de la habilidad de esta para inducir a *TGFB1* y *VEGFA*, ésta puede mediar la actividad angiogénica de éstas proteínas y la formación de tubos incluso por sí misma<sup>57</sup>; por lo que el papel de estas proteínas específicas de embarazo en el cáncer puede ser de vital importancia para el desarrollo de la neoplasia.

Así pues, el rol de las *PSG's* tanto para inmunomodulación por medio de la inducción de *IL10*, y como mediador de la angiogénesis por la activación de *TGFB1* y *VEGFA*, arrojará el punto de partida para su posible identificación como potencial marcador molecular en los pacientes con CaCu y sus lesiones precursoras.

## CONCLUSIONES

- Las alteraciones cromosómicas comúnmente asociadas al CaCu fueron la ganancia del cromosoma 1, 3q, 5p, 9q y 20 y la pérdida de 3p, 4, 11 y 13q.
- La alteración cromosómica de tipo ganancia en el 3q es una de las alteraciones más frecuentes y características de la neoplasia del cérvix uterino.
- La alteración de tipo ganancia más frecuente en el presente estudio fue la correspondiente a la región 19q13.2, siendo consistente con lo anteriormente reportado.
- Se identificó una alteración de tipo pérdida para la región 16q23 no reportada previamente para la neoplasia del cérvix uterino, y que los genes involucrados en esta región probablemente sean supresores de tumores.
- Se determinaron los genes asociados a la ganancia 19q13.2 y su posible papel en el CaCu en los procesos de inmunomodulación y angiogénesis tumoral.

## SUGERENCIAS PARA TRABAJOS POSTERIORES

- Detectar la expresión de las *PSG*'s mediante *Western Blot (WB)* y/o métodos inmunoenzimáticos como ELISA, en pacientes con CaCu y lesiones precursoras.
- Determinar la presencia de las *PSG*'s en sueros de pacientes con CaCu.
- Identificar los transcritos de los genes de las *PSG*'s por medio de RT-PCR en tiempo real en biopsias de pacientes con CaCu y de sus lesiones precursoras.

## REFERENCIAS

1. Rangel-López, A., Piña-Sánchez, P. y Salcedo, M. 2006. Variaciones genéticas del gen supresor de tumores *TP53*: relevancia y estrategias de análisis. *Revista de Investigación Clínica*. 58(3):254-264.
2. Douda, J., Calva, P. A., Torchynska, T. V., Peña-Sierra, R. y de la Rosa-Vázquez, J. M. 2008. Marcadores Cuánticos para la detección de cáncer. *Superficies y Vacío*. 21(4):10-17.
3. Rizo R. P., Sierra C. M. I., Vázquez P. G., Cano G. M., Meneses A. G. y Mohar A. 2007. Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000-2004. *Cancerología* 2:203-287.
4. López-Saavedra y Lizano-Soberon. 2006. Cáncer cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La historia que no termina. *Cancerología* 1(2006):31-55.
5. <http://globocan.iarc.fr/>
6. Juárez S. 2007. Determinación de copias extras de la *Glicoproteína Específica del Embarazo* en lesiones del cérvix. Tesis de Maestría. UNAM. México D.F.
7. de Villiers, E. M., Gissmann, L. y zur Hausen, H. 1981. Molecular cloning of viral DNA from Human genital warts. *J. Virol.* 40(3): 932-935.
8. Mariani, L., Monfulleda, N., Alemany, L., Vizza, E., Marandino, F., Vocaturo, A., Benevolo, M., Quirós, B., Lloveras, B., Klaustermeier, J. E., Quint, W., de Sanjosé, S. y Bosch, f. X. 2010. Human Papiloma Virus prevalence and type-specific relative contribution in invasive cervical cancer specimens from Italy. *BMC Cancer*. 10:259.
9. Krüger-Kjaer, S., van den Brule A. J., Svare El., Engholm G., Sherman M. E., Poll P. A., Walboomers J. M., Bock, J. E. y Meijer C. J. 1998. Different risk factor patterns for high-grade and low-grade intraepithelial lesions on the cervix among HPV-positive and HPV-negative young women. *Int. J. Cancer*. 76(5):613-619.
10. Frega A, Stentella P, De Ioris A, Piazzè JJ, Fambrini M, Marchionni M, Cosmi EV. 2003. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. *Cancer Lett*. 196(2):127-134.
11. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324(1):17-27.
12. Prendiville, W. y Davis, P. 2004. *The Health Professional's HPV Handbook: Volume 1: Human Papillomavirus and cervical cancer*. Taylor and Francis Group. España. 96p.

13. Brentjens, M. H., Yeung-Yue, K. A., Lee, P. C. y Tyring, S. K. 2002. Human Papillomavirus: a review. *Dermatol. Clin.* 20(2):315-31.
14. Cox, J. T. 2006. Epidemiology and natural history of HPV. *J. Fam. Pract. Suppl.*:3-9.
15. Brisson, J., Morin, C., Fortier, M., Roy, M., Bouchard, C., Leclerc, J., Christen, A., Guimont, C., Penault, F. y Meisels, A. 1994. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol.* 140:700-710.
16. Palefsky, J. 2006. Biology of HPV in HIV Infection. *Adv. Dent. Res.* 19:99-105.
17. Hans-Ulrich, B. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* 32(Supp):1-6.
18. Davy, C. E., Jackson, D. J., Raj, K., Peh, W. L., Southern S, A., Das, P., Sorathia, R., Laskey, P., Middleton, K., Nakahara, T., Wang, Q., Masterson, P. J., Lambert, P. F., Cuthill, S., Millar, J. B. A. y Doorbar, J. 2005. Human Papillomavirus Type 16 E1<sup>E4</sup>- Induced G<sub>2</sub> Arrest Is Associated with Cytoplasmic Retention of Active Cdk1/Cyclin B1 Complexes. *J. Virol.* 79(7):3998-4011.
19. Sparkowski, J., Anders, J. y Schlegel, R. 1995. E5 oncoprotein retained in the endoplasmic reticulum/cis Golgi still induces PDGF receptor autophosphorylation but does not transform cells. *EMBO Journal.* 14(13):3055-3063.
20. Mantovani, F. y Banks, L. 2001. The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progresión. *Oncogene.* 20(54):7874-7887.
21. Boyer, S. N., Wazer, D. E. y Band, Vimla. 1996. E7 Protein of human Papillomavirus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein Through the Ubiquitin-Proteosomo Pathway. *Cancer Res.* 56(20):4620-4624.
22. Münger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzales, S. L., Grace, M. y Zacny, V. L. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene.* 20(54):7888-7898.
23. Stubenrauch, F., Zobel, T. y Iftner, T. 2001. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8<sup>E2C</sup> protein of high-risk Human Papillomavirus type 31. *J. Virol.* 75(9):4139-4149.
24. Day, P. M., Roden, R. B. S., Lowy, D. R. y Schiller, J. T. 1998. The Papillomavirus minor capsid protein, L2, Induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral trascription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* 72(1):142-150.

25. Bosch, F. X. y de Sanjosé, S. 2003. Chapter 1: Human Papillomavirus and Cervical Cancer-Burden and Assessment of Causality. *Journal of the National Cancer Institute Monographs.* (31):3-13.
26. Hidalgo, A., Baudis, M., Petersen, I., Arreola, H., Piña, P., Vázquez-Ortiz, G., Hernández, D., González, J.L., Lazos, M., López, R., Pérez, C., García, J., Vázquez, K., Alatorre, B. y Salcedo, M. 2005. Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma. *BMC Cancer.* 5:77-81.
27. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F. y Pinkel, D. 1992. Comparative Genomic Hybridization for molecular cytogenetic análisis of solid tumors. *Science.* 258(5083):818-21.
28. Albertson, D. G. y Pinkel, D. 2003. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 12(2):R145-R152.
29. Bryandorf, T., Kirchhoff, M., Rose, H., Maahr, J., Gerdes, T., Karhu, R., Kallioniemi, A., Christensen, B., Lundsteen, C. y Philip, J. 1985. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am. J. Hum. Genet.* 57(5):1211-1220.
30. Heselmeyer, K., Schihock, E., Du-Manior, S., Blegon, H., Shah, K., Steinbeck, R., Aver, G. y Ried, T. 1996. Gain of chromosome 3q define the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of uterine cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(1):479-84.
31. Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T. y Lichter, P. 1997. Matrix-Based comparative genomic Hybridization: Biochips to screen for genomic imabalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 20(4):399-407.
32. Hidalgo A, Schewe C, Petersen S, Salcedo M, Gariglio P, SchluÈ K, Dietel M, Petersen I. 2000. Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumour cell lines. *Eur J Cancer.* 36(4):542-548.
33. Monteiro, J. C. M. P., Biswas, S., Al-Awqati, M. A., Greening, W. P. McKinna, J. A. y Neville, A. M. 1982. Serum Levels of Human Placental Lactogen and Pregnancy-Specific  $\beta_1$ -Glycoprotein in Breast Cancer. *Br. J. Cancer.* 46(2):279-82.
34. Snijders, A. M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A. K., Huey, B., Kimura, K., Law, S., Myambo, K., Palmer, J., Ylstra, B., Yue, J. P., Gray, J. W., Jain, A. N., Pinkel, D. y Albertson, D. G. 2001. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nature Genet.* 29(3):263-264.

35. Hidalgo, A., Monroy, A., Arana, R. M., Taja, L., Vázquez, G. y Salcedo, M. 2003. Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma derived cell lines. *BMC Cancer*. 3:8.
36. Rao, P. H., Arias-Pulido, H., Lu, Xin-Yan., Harris, C. P., Vargas, H., Zhang, F. F., Narayan, G., Schneider, A., Terry, M. B. y Murty, V. V. V. S. 2004. Chromosomal amplifications, 3q gain and deletions of 2q33-q37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma. *BMC Cancer*. 4:5.
37. Dellas, A., Torhorst, J., Jiang, F., Proffitt, J., Schultheiss, E., Holzgreve, W., Sauter, G., Mihatsch, M. J. y Moch, H. 1999. Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 59(14):3475-9.
38. Kersemaekers, A. M., Fleuren, G. J., Kenter, G. G., Van den Broek, L. J., Uljee, S. M., Hermans, J. y Van de Vijver, M. J. 1999. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 5(3):577-86.
39. Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J. C. y Howley, P. M. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(13):5523-7.
40. Savelyeva, L. y Schwab, M. 2001. Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. *Cancer Lett*. 167(2):115-23.
41. Bohn H. 1971. Detection and characterization of pregnancy proteins in the human placental and their quantitative immunochemical determination in sera from pregnant women. *Arch. Gynec*. 210:440.
42. Zhou, Y., Ficher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M. y Damsky, C. H. 1997. Human cytotrophoblast adopt a vascular phenotype as the differentiate. A strategy for successfully endovascular invasion. *J. Clin. Invest*. 99(9):2139-2151.
43. Ismail, A. A. y Fahmy, E. I. 1992. Pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP) and its relation to fetal birth weigh at term pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol*. 45(1):13-7.
44. Leslie, K. K., Watanabe, S., Lei, K. L., Chou, D. Y., Plouzek, C. A., Deng, H. C., Torres, J. y Chou, J. Y. 1990. Linkage of two human pregnancy-specific beta 1-glycoprotein genes: one is associated with hyaditiform mole. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 87(15):5822-5826.

45. Motran, C. C., Díaz, F. L., Gruppi, A., Slavin, D., Chatton, B. y Bocco, J. L. 2002. Human pregnancy specific glycoprotein 1 (PSG 1) induce alternative activation in human and mause monocytes and suppresses the accessory cell-dependent T cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.* 72(3):512-521.
46. Ha, T. C., Wu, J. A., Imark, S., Lisboa, F. A., Dizon, A. M., Warren, J. W., Ergum, S. y Dveksler, G. S. 2010. Human Pregnancy Beta-1-Glycoprotein (PSG1) Has a Potential Role in Placental Vascular Morphogenesis. *Biol. Reprod.* 83(1):27-35.
47. Lei, K. J., Sartwell, A. D., Pan, C. J., Chou, J. Y. 1992. Cloning and expression of genes encoding human pregnancy-specific glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 267(23):16371-16378.
48. Lin, T. M., Galbert, S. P., Kiefer, D., Spellacy, W. N. y Gall, S. 1974. Characterization of four human pregnancy-associated plasma protein. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 118(2):223-236.
49. Khan, W. N., Frangsmyr, L., Teglud, S., Israelsson, A., Bremer, K. y Hammarstrom, S. 1992. Identificaction of three new genes and estimation of the size of the carcinoembryonic antigen family. *Genomics.* 14(2):484-390.
50. Shernan G, Holtan MD, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. 2009. Cancer and pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. *Mayo Clin Proc.* 84:985-1000.
51. Monteiro JCMP, Biswas S, Al-Awqati MA, Greening WP, McKinna JA, Neville AM. 1982. Serum levels of human placental lactogen and pregnancy-specific Beta-1-Glycoprotein in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 46:279.
52. Stodkowska J, Szturmowicz M, Giedronowicz D, Rudzinski P, Sakowicz A, Kupis W. 1997. Trophoblastic markers and CEA in non-small cell lung cancer: the comparision studies of tumour cells expression and serum concentration. *Rocz Akad Med Bialymst.* 42:190-198.
53. Snyder SK, Wessner DH, Wessells JL, Waterhouse RM, Wahl LM, Zimmermann W, Dveksler GS. 2001. Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF-beta1 by human monocytes. *Am J Reprod Immunol.* 45:205-216.
54. Ha, C. T., Waterhouse, R., Wessells, J., Wu, J. A. y Dveksler, G. S. 2005. Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE<sub>2</sub>, and TGF-β<sub>1</sub>. *J. Leukoc. Biol.* 77:948-957.
55. Vinuselvi P, AbiramiVeena R, Vani V, Sanjay P. 2008. Ying Yang effect of IL10 in the incidence of cervical cancer. *Advanced Biotech.* 8:26-28.

56. Ha, C. T., Wu, J. A., Irmak, S., Lisboa, F. A., Dizon, A. M., Warren, J. W., Ergun, S. y Dveksler, G. S. 2010. Human Pregnancy Specific Beta-1-Glycoprotein (PSG1) has a potencial role in placental vascular morphogenesis. *Biology of Reproduction*. 83:27–35.
57. Lisboa FA, Warren J, Sulkowski G, Aparicio M, David G, Zudaire E, Dveksler GS. 2011. Pregnancy-specific Glycoprotein 1 Induces Endothelial Tubulogenesis through Interaction with Cell Surface Proteoglycans. *J Biol Chem*. 286(9):7577-86.