



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DE COPIAS EXTRAS DE LA
GLICOPROTEÍNA ESPECÍFICA DEL EMBARAZO EN
LESIONES DEL CÉRVIX

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

BIOL. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

MÉXICO, D.F

NOVIEMBRE, 2007



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.

APOYOS

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Proyecto sectoriales 7114 y también al Fondo de fomento a la investigación IMSS .

Durante el desarrollo de este trabajo fui becario de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Agradecimientos

Agradezco a los miembros del comité tutorial: Dr. Alfonso Dueñas González, Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y al Dr. Mauricio Salcedo Vargas, por todos los comentarios realizados para el buen desarrollo de este trabajo, y por toda la paciencia que me han tenido.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio por todo el apoyo que me brindaron y por todos los comentarios hacia el desarrollo del trabajo, especialmente al Dr. Mauricio por toda la confianza depositada en mí.

Agradezco a Guela por todas las enseñanzas y por su apoyo.

Agradezco al Dr. Constantino por la facilitarme el uso de su equipo de tiempo real.

Agradezco a toda mi familia por su confianza, especialmente a mi madre por su cariño.

Agradezco a todos mis amigos por sus consejos y apoyo.

A mí Madre

Josefa Méndez Mellado

Gracias por esta gran oportunidad al permitirme existir.

A mí abuela y tía

Osbelia Mellado Parra

Rocío Méndez Mellado

Pos su apoyo y confianza, desafortunadamente ya no están entre nosotros.

A mí abuelo

José Méndez Benítez

Por todos sus consejos que nunca son tarde y siempre serán bienvenidos.

Gracias Flaca.

Índice

1. Resumen	4
2. Abstract	7
3. Introducción	9
3.1. Cáncer	9
3.2. Cáncer cérvico uterino	10
3.3. Virus del papiloma humano.	11
3.4. Genes virales	14
3.5. Hibridación genómica comparativa	17
3.6. Glicoproteína específica del embarazo 1	24
4. Justificación	28
5. Objetivo General	29
5.1. Objetivos particulares	29
6. Materiales y Métodos	30
6.1. Selección del área de interés	30
6.2. Cuantificación del DNA genómico	31
6.3. Diseño de los oligonucleótidos para la PCR en tiempo real	31
6.4. Condiciones de amplificación	32
6.5. Análisis para la PCR en tiempo real	33
7. Resultados	35
7.1. Análisis de los resultados	47
7.2. Comparación de la amplificación del Gen PSG1 vs hi- bridación genómica comparativa en microarreglos.	51

8. Discusión	53
8.1. PCR en tiempo real	56
8.2. Curva estándar	57
9. Conclusiones	60
10.Sugerencias para trabajos futuros	61

Índice de figuras

1.	Estructura clásica del virus del papiloma humano . . .	13
2.	Esquema general de método de hibridación genómica comparativa en metafases y microarreglos	19
3.	Dendrograma de las alteraciones cromosómicas en CaCu	21
4.	Dendrograma de la alteración del gen PSG1 en lesiones del cérvix	23
5.	Isoformas del la proteína PSG1	25
6.	Integridad del DNA genómico	35
7.	Curva de calibración para la lectura del DNA	36
8.	Producto de PCR del gen PSG1 y B2M	37
9.	Curva de amplificación del gen PSG1 y B2M	38
10.	Curva de fusión para del gen PSG1 y B2M	40
11.	Curva de eficiencia del gen PSG1	42
12.	Curva de eficiencia del gen B2M	43
13.	Amplificación del gen PSG1 y B2M	45
14.	Curva fusión para los genes PSG1 y B2M en las lesiones del cérvix	46
15.	Amplificación del gen PSG1	49
16.	Amplificación del gen PSG1 y su localización en el genoma	52

1. Resumen

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en las mujeres en todo el mundo, mientras que en nuestro país, esta neoplasia ocupa la primera causa de muerte, actualmente se acepta que el virus del papiloma humano (VPH) es el factor etiológico más importante para el desarrollo de esta neoplasia; ya que se encuentra en más del 95 % de las lesiones del cérvix.

Actualmente se han desarrollado métodos de estudio global (genómica, proteómica, interactómica, metaboloma) con la finalidad de visualizar los eventos celulares, moleculares y funcionales de las células en momentos determinados y eventualmente entender los mecanismos por los cuales la célula es transformada. Recientemente utilizando la hibridación genómica comparativa (HGC) en metafases y microarreglos, se han logrado identificar regiones cromosómicas alteradas presentes en las células transformadas de muchos tejidos, no obstante, en el CaCu se han logrado identificar una gran cantidad de regiones citogenéticas alteradas, principalmente la ganancia del 3q, 5p y la pérdida del 4 y 2q, entre otros, nuestro grupo aplicando la HCG en metafases y microarreglos en lesiones y tumores del cérvix logró identificar la alteración consistente en ganancia de la región q 13.2-13.3 del cromosoma 19. En el cromosoma 19 en la región citogenética q13.2 - 13.3 se en-

cuentra la familia de genes de la glicoproteína específicas del embarazo (PSG) constituidos por 11 miembros, siendo el más relevante el gen PSG1 por su participación como inmunomodulador en el desarrollo embrionario, el gen PSG1 estructuralmente se encuentra constituido por 6 exones y se presentan 5 isoformas de la proteína, se ha observado que su expresión es exclusiva para la placenta y preferencialmente en el sincitiotrofoblasto, aumentando los niveles de la proteína conforme progresa el embarazo.

En este trabajo se propone el estudio del gen PSG1 mediante la técnica de PCR en tiempo real relativa utilizando los cebadores D-Lux, para validar los resultados obtenidos mediante HGC en microarreglos. Podemos mencionar que dentro de los resultados obtenidos observamos amplificaciones variables del gen en las diferentes muestras de estudio, de la siguiente manera: 6/33 (18.18 %) presentaron la ganancia del gen PSG1, mientras que el 22/33 (66.6 %) presentaron la amplificación del gen. En general observamos la alteración del gen en el 84.84 % de las lesiones cervicales, lo que van desde 1.2 a 18 veces más carga génica que los normales, mientras que todas las líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino presentaron la amplificación del gen, encontrándose en ellas los mayores niveles de amplificación, lo que van de 5 a 18 veces más copias.

Es de suma importancia detectar los genes alterados en los proce-

sos neoplásicos; ya que nos brindan potenciales marcadores moleculares pronósticos de la enfermedad, tal es el caso del gen PSG1 que se ha logrado identificar como alterado, en más del 80 % de los casos estudiados y presenta ganancia en lesiones premalignas, malignas e invasoras del cérvix.

2. Abstract

Uterine cervical cancer (CC) is the second cause of death in women world-wide, while in our country, this neoplasm occupies the first place. At the moment, it is accepted that human papilloma virus (HPV) is the main etiological factor for CC, this is mainly due to this virus is present in more than 95 % of the cervical lesions.

At the moment, high throughput technology (genomics, proteomics, interactomics, methabolomics) has been developed with the purpose of characterize the cellular, molecular and functional events in a particular moment and also to understand the cellular mechanisms by which the cell is transformed. Recently, by means of comparative genomic hybridization (metaphases and microarrays), particular genomic alterations have been identified in tumoral cell and its normal counterparts in numerous types of tissues. In cervical cancer several citogenetic regions have been detected, one of the most important is the gain of the 3q, 5p and the loss of the cromosoma 4 among others. Our group, by using microarrays and metaphase CGH detected the consistent gain of the citogenetic region in the q13.2-13.3 in chromosome 19. In this region, the family of genes that codify for pregnancy specific proteins (PSG), which is conformed by 11 members, is located.

The most relevant gene of the family is the PSG1, this, mainly due to its participation as an immunomodulator in embryonic development. The PSG1 gene is formed by 6 exons and it may present 5 isoforms, its expression is confined to placenta (syncytiotrophoblast) and the protein increases during pregnancy. In this work, the study of the PSG1 gene by relative real time PCR with D-Lux primers is proposed to validate the previously obtained results by a microarray CGH. The results were: PSG1 gene gain in 6/33 (18.18 %) of the samples while an amplification was present in the 22/33 (66.6 %) of the samples. In general we observed an alteration of the gene in the 84.84 % of the CC samples which means that there is a range of 1.2 to 18 extra genetic charge in this samples than in the normal ones. All the cell lines displayed the higher amplification of the PSG1 gene with 5 to 18 more copies than normal tissues.

The detection of altered genes in neoplastic processes is very important due to these genes could be potential prognostic molecular markers of the disease, this could be the case for PSG that it was detected in more than 80 % of the studied cases and also show gains in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix.

3. Introducción

3.1. Cáncer

El cáncer es un problema de salud; ya que a nivel mundial ocupa la segunda causa de muerte en la población. El cáncer es una de las enfermedades que ha preocupado a la secretaria de salud (SSA) ya que desde a finales del siglo XX se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, ésto se debe a sus manifestaciones clínicas y su alta letalidad, pero además por la gran variedad de factores de riesgos tanto individuales como ambientales asociados a la enfermedad [1]. En nuestro país por ejemplo se han registrado 102,657 tumores malignos que corresponden a 101.6 casos por 100,000 habitantes. De acuerdo al sexo, se presenta en el 34.8% en hombres, mientras que en las mujeres es del 65.2% si se consideran en todas las edades, pero es muy importante destacar que es más frecuente en ellas, a partir de los 20 años [1]. El cáncer más frecuente es el de pulmón con el 17.6% del total de los tumores, es seguido del de estómago y el de mama. El más frecuente en las mujeres es el de mama, representando el 19.1%, siendo seguido por el cáncer cérvico uterino con 437,300 nuevos casos por año [2].

3.2. Cáncer cérvico uterino

El cáncer cérvico uterino (CaCu) en nuestro país y en muchos otros en vías de desarrollo, representa un problema de salud; ya que ocupa la primera causa de muerte entre la población femenina mayor de 30 años, mientras que a nivel mundial ocupa el segundo lugar de muertes por ésta neoplasia.

Se estima que anualmente se presentan aproximadamente 500,000 casos nuevos en el mundo, pero el 80 % de estos casos ocurren en países en vías de desarrollo, como lo es el nuestro, por ejemplo en el año 2001 la tasa anual de mortalidad fue de 19 por 100,000 y la incidencia de 50 por 100,000 mujeres mayores de 25 años [3].

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 temprana, número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos hormonales, antecedentes heredo-familiar, número de embarazos y la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Este último es que es considerado como el factor etiológico más importante [4, 5]; ya que se encuentra en más del 95 % de los casos.

3.3. Virus del papiloma humano.

Este virus pertenece a la familia papillomaviridae [6], tiene un tamaño aproximado de 55 nm de diámetro, se compone de 72 capsómeras que forman la cápside viral y su genoma está constituido por DNA de doble cadena circular con un tamaño aproximado de 8 Kb, además de que se encuentra asociado a proteínas del tipo histonas.

Al preservar el VPH la forma cíclica de su DNA, en una infección se manifiesta generalmente como lesiones planas o verrugosa genitales exofíticas [7, 8], generalmente este tipo de infecciones son producida por los virus de bajo riesgo y dentro de ellos, los más comunes son los tipos 6 y 11, por otra parte este tipo de infecciones presentan un alto número de copias del virus y a esta forma cíclica se le denomina episomal. Estos tipos virales son transmitidos sexualmente afectando alrededor del 1 % de la población [9]; podemos mencionar que este tipo de infecciones no causan cáncer, sin embargo, existe otro grupo de virus a los que se les ha denominado de alto riesgo y se les ha asociado con el desarrollo del cáncer por su alta capacidad de transformar a las células huésped.

Se les considera como virus de alto riesgo debido a que su DNA se rompe en las regiones control del ciclo del virus y se integra en el DNA

del huésped, evento que promueve la transformación de las células del hospedero y por estas características se le ha implicado directamente en el proceso que lleva al desarrollo del cáncer cérvico uterino [10].

La infección por el VPH es una de las infecciones sexualmente transmitidas más prevalentes, además la causada por los virus de alto riesgo es responsable de un alto índice de morbilidad y mortalidad; ya que es necesaria la infección de este virus para el desarrollo del cáncer cervical invasor [11].

Al VPH también se le ha implicado sustancialmente en infecciones de algunas otras áreas del cuerpo como la boca, ano, pene y piel, entre otros, sin embargo, la infección del cérvix es la que provoca la mayor mortalidad. Los virus 16 y 18 son los tipos más comúnmente encontrados en el cáncer cervical invasor y son responsables de aproximadamente el 70 % de este cáncer [11].

Estructuralmente el DNA del virus se encuentra dividido en tres regiones principales; la región reguladora que controla la transcripción de sus genes, denominada región control no codificante (LCR), la región donde se encuentran los genes involucrados en la transcripción

(E1, E2, E4, E5, E6, E7) y la región estructural que codifica para las proteínas de la cápside, denominados como L1 y L2 (figura 1) [12].

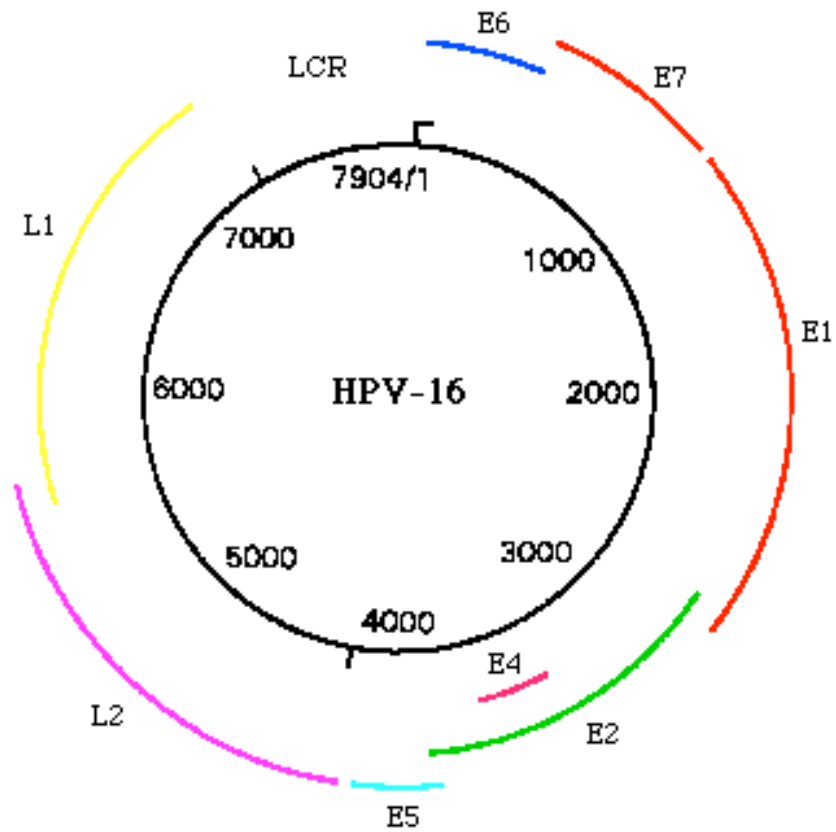


Figura 1: Estructura clásica del virus del papiloma humano tipo 16, en el centro se muestra el tamaño del genoma viral, mientras que en la parte externa a los diferentes genes que constituyen al DNA del VPH (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2).

3.4. Genes virales

Como se mencionó, el virus está constituido de 10 genes virales y una región control no codificante, a continuación se mencionarán brevemente las funciones de las proteínas de estos genes [12]:

- E1: Este gen participa activamente en la replicación del DNA viral actuando como un factor de alargamiento, además de que se asocia con un componente de la maquinaria de la replicación (DNA polimerasa alfa).
- E2: Participa con E1 formando un complejo proteico que estabiliza la maquinaria de la replicación viral.
- E4: Este gen es de expresión tardía, por otra parte se une a filamentos intermedios y permite la liberación de las partículas virales, también participa en la transformación de la célula huésped.
- E5: La proteína de este gen participa en el bloqueo de los mecanismos de control del crecimiento celular, esto le permite a la célula huésped crecer desmedidamente, también participa en las vías de señalización mitogénicas de c-Jun y c-Fos los cuales están involucrados en la degradación por ubiquitinación.
- E6: La proteína de este gen participa en la unión con p53 provocando su degradación por ubiquitinación, con esto la célula no

tiene mecanismos de reparación del DNA.

- E7: Esta proteína se une con la proteína celular pRB y también puede interactuar con proteínas cinasas y ciclinas.
- L1: Esta proteína participa en la formación de la cápside viral.
- L2: Al igual que L1 participa en la formación de la cápside y además participa en el empaquetamiento del DNA viral.
- LCR: Esta es una región larga no codificante en la que se encuentran sitios de terminación de la transcripción y de poliadenilación de los RNAs.

Se ha sugerido que el mecanismo de transformación celular por el VPH de alto riesgo es mediante la vía de síntesis de sus oncoproteínas virales E6 y E7, por su acción sobre genes celulares como p53 y Rb respectivamente [13], la oncoproteína E6 se une a p53 provocando su degradación, mientras que la oncoproteína E7 se une a Rb, provocando la liberación de E2F promoviendo el inicio del ciclo celular, esto favorece la estimulación del crecimiento celular y en conjunto participan en la immortalización y transformación de la célula [14].

A la fecha se han encontrado más de 200 tipos virales de los cuales solo 30 se han asociado con la neoplasias del cérvix [15], a estos virus se les ha clasificado de acuerdo a los cambios que pueden presentar en el genoma, los tipos virales son los que tienen variaciones en su genoma en más del 10% y son considerados como subtipos aquellos que van a tener una variación del 2 al 10% del genoma, mientras que las variantes presentan solo cambios del 1 al 2% en el genoma y finalmente las sub-variantes son aquellas que presentan cambios muy particulares en regiones conservadas [16].

3.5. Hibridación genómica comparativa

Es claro que el uso de herramientas de alto rendimiento en el estudio del proceso de transformación celular, nos permite tener un mejor conocimiento de lo que pueda estar ocurriendo en el proceso de carcinogénesis [17]. Tal es el caso de la tecnología de citogenética molecular, la hibridación genómica comparativa en metafase (HGCm) que nos permite monitorear en un solo experimento y de manera global todo el genoma de un individuo en cuanto a ganancia y pérdida de material genético [18].

En este contexto, la HGCm se ha aplicado en las diferentes etapas de la carcinogénesis en la mayoría de los cánceres que afectan a los seres humanos, sin embargo, esta técnica se ve limitada por su rango de definición [19, 20]; ya que se observan alteraciones en regiones citogenéticas muy grandes, incluso brazos cromosómicos completos.

Así una nueva aplicación de la HGCm ha venido a solucionar el problema de la resolución en la visibilidad de las diversas alteraciones presentes, actualmente contamos con la Hibridación Genómica Comparativa en microarreglos (HGC μ), con la que se tiene una mejor resolución que el mapeado cromosómico.

Esta nueva plataforma nos permite identificar regiones citogenéticas de 1.5 Mpb hasta genes, brindándonos una mayor información acerca de las alteraciones moleculares asociadas al cáncer [21]. De manera general, el método de la hibridación genómica comparativa tanto en metafases como microarreglos se encuentra basado en la hibridación competitiva del DNA de un individuo normal y el DNA a estudiar, ambos DNAs son marcados diferencialmente con fluoróforos (Cy3, Cy5, rodamina, fluoresceína, entre otros) y posteriormente son mezclados en cantidades equimolares.

A continuación se hibridan sobre una metafase de un individuo normal o bien, sobre un microarreglo, por último se lee el arreglo utilizando los filtros adecuados para la detección del fluoróforo utilizado, brindándonos diferentes rangos de fluorescencia y posteriormente ambas imágenes son superpuestas para obtener así el patrón de alteraciones en todo el genoma de un solo individuo (ver figura 2).

Esto es, la plataforma de HGC en microarreglos nos permite llegar a la identificación de grupos de genes o un gen en particular, en otras palabras se cambian los cromosomas en metafases por fragmentos de

los mismos cromosomas pero con tamaños que van desde 1.5 Mpb a genes impresos en el arreglo [17].

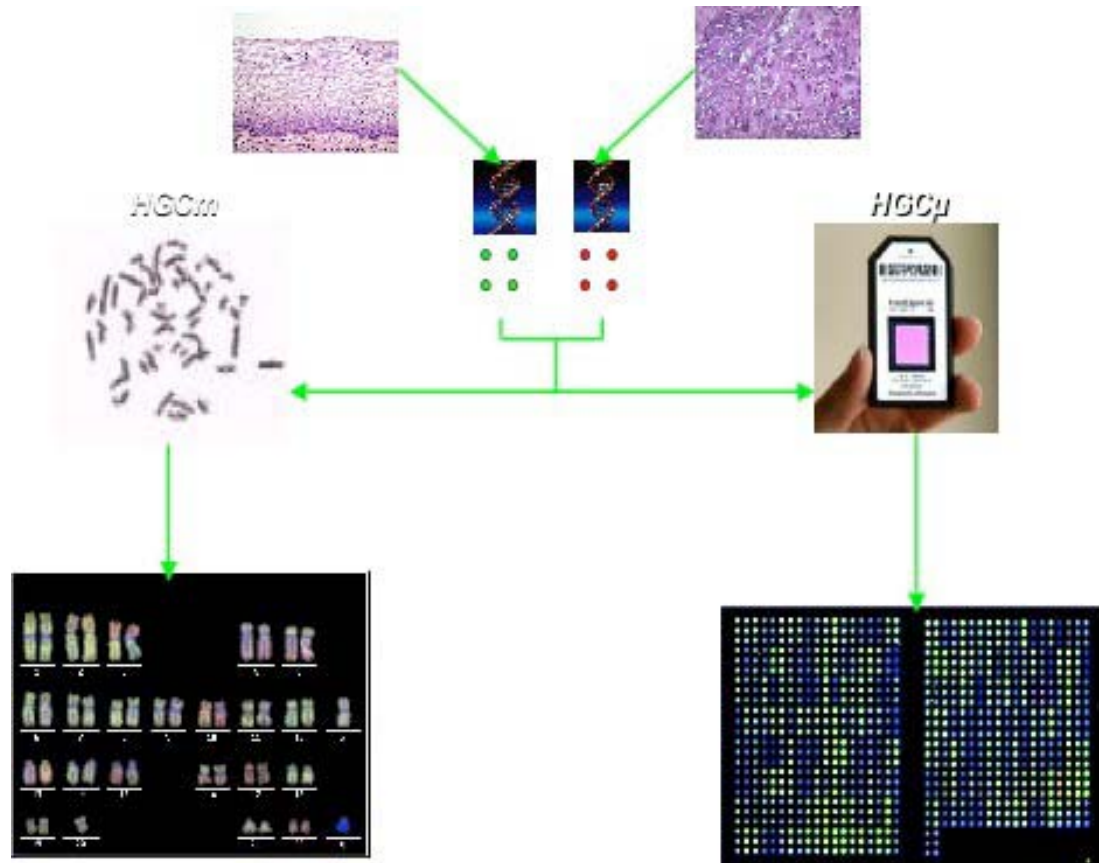


Figura 2: Esquema general de hibridación genómica comparativa, estos métodos están basados en la extracción del DNA normal y tumoral, ambos DNAs se marcan diferencialmente y se mezclan en cantidades equimolares, posteriormente son hibridados en una metafase normal o bien sobre un microarreglo, finalmente es escaneado, observando así, el patrones de las alteraciones presentes, estas alteraciones se observan de acuerdo al patrón de coloración presente para ganancias y pérdidas.

Con el desarrollo de la plataforma de hibridación genómica comparativa en metafases por Kallioniemi y colaboradores, se abrieron las puertas para el estudio global de diferentes neoplasias, dado que existía la evidencia indicando que muchos oncogenes conocidos experimentaban amplificaciones en los tumores [22]. No obstante en diferentes grupos de investigación utilizando la hibridación genómica comparativa en microarreglos y en metafases se ha logrado identificar una serie de desbalances cromosómicos presentes en cáncer cérvico uterino, donde las más frecuentes son la ganancia de la región citogenética 3q, 5p, y la pérdida del cromosoma 4, 2q, entre otros, como se muestra en la figura 3.

cervix uteri

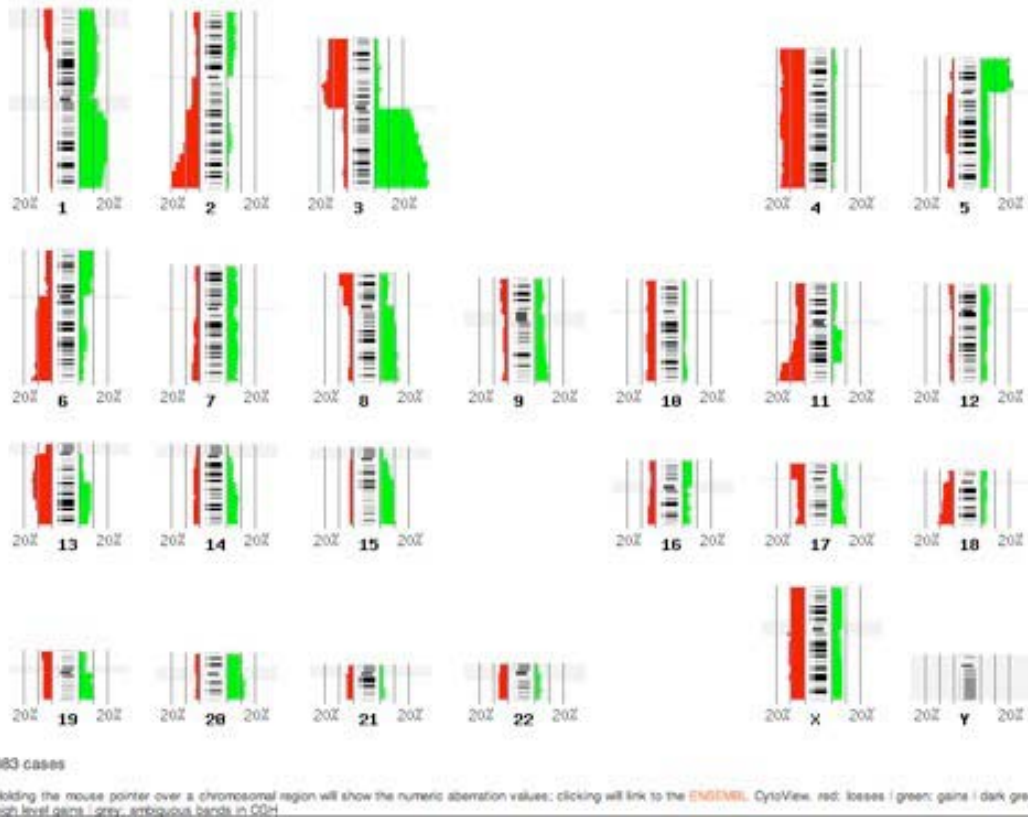


Figura 3: Dendrograma de las alteraciones cromosómicas en CaCu, en esta figura se muestran las alteraciones presentes en cáncer cervico uterino de 383 casos, mostrando de color verde las ganancias y en rojo las pérdidas de DNA.

En estudios recientes, nuestro grupo ha venido aplicando la HGC en metafases y la HGC en microarreglos para determinar el patrón de las alteraciones cromosómicas en lesiones pre-malignas y malignas del cuello uterino [23][24], con el objetivo de identificar los diversos genes que se encuentran alterados en esta neoplasia. Por otra parte utilizando diversas bases de datos públicas y herramientas de bioinformática, como *genome browser*, CGAP, Source, etc, alimentados con nuestros datos obtenidos por HGC, en los microarreglos se pudo evidenciar que existe la alteración cromosómica en ganancia de la región citogenética q13.2-13.3 en el cromosoma 19, esta ganancia se presentó consistentemente en más del 60% de los casos estudiados de CaCu y en 2/5 de los carcinomas in situ (comunicación personal en preparación).

En la región citogenética q13.2-13.3 del cromosoma 19 se encuentran un grupo de genes que forman parte de la familia de los antígenos carcinoembrionarios (CEA), sin embargo utilizando las herramientas bioinformáticas antes mencionadas se pudo identificar al gen PSG1 como el alterado en ese grupo de genes como se muestra en la figura 4.

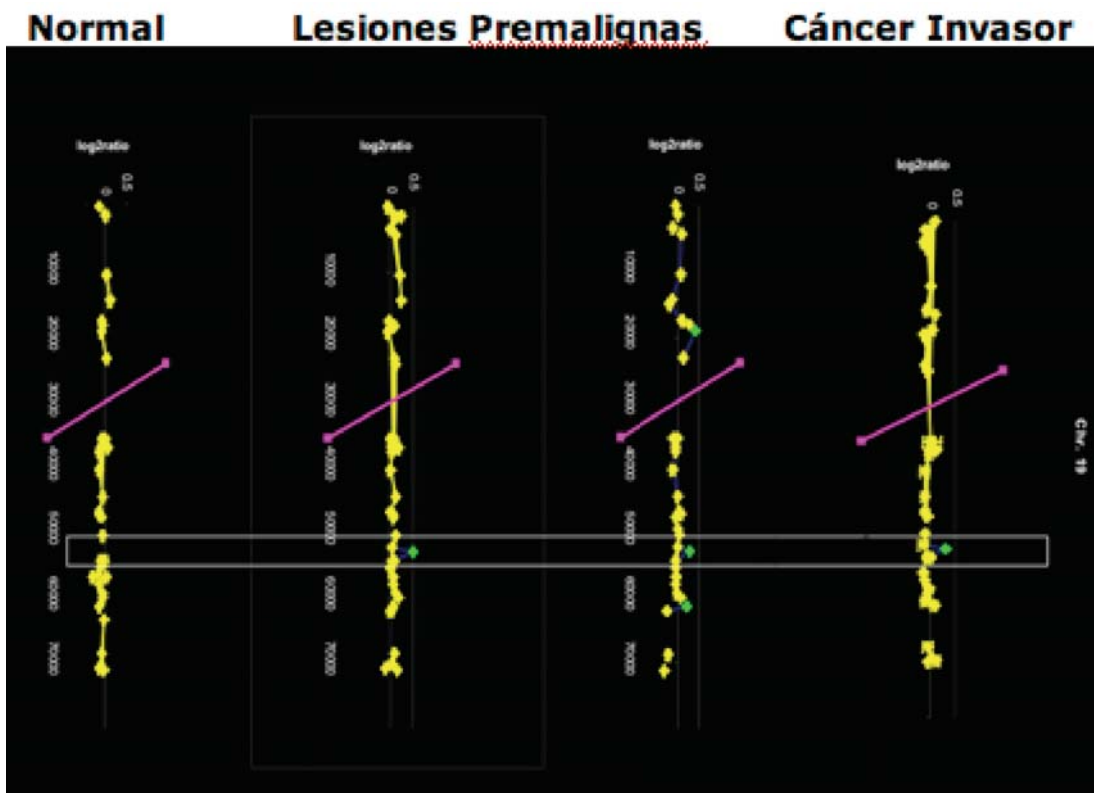
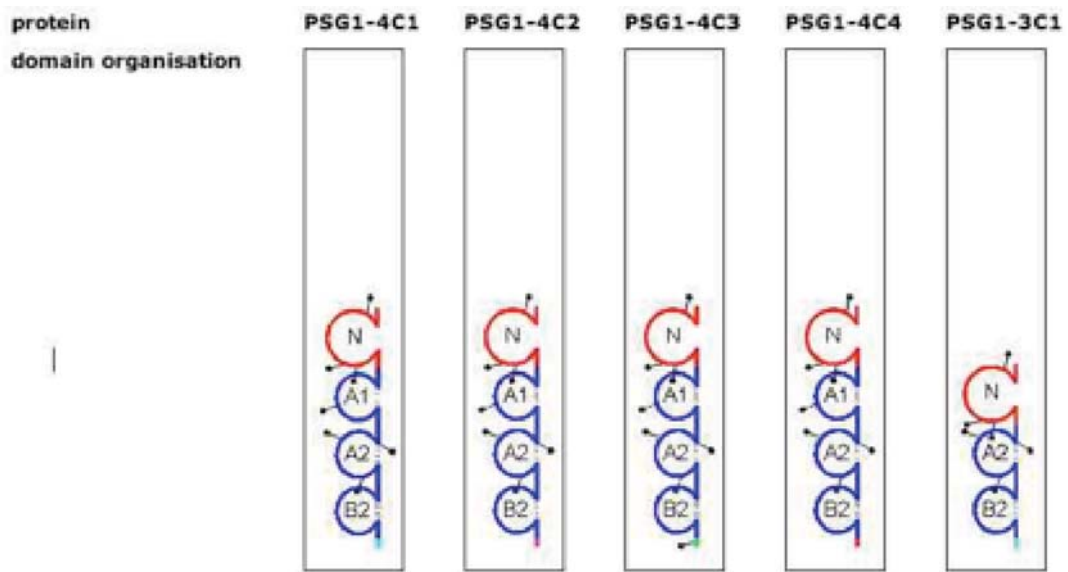


Figura 4: Dendrograma de la alteración del cromosoma 19 en la región citogenética q13.2-13.3 en lesiones premalignas e invasoras del cérvix.

3.6. Glicoproteína específica del embarazo 1

El gen de la glicoproteína específica del embarazo 1 (PSG1) se encuentra localizado en el cromosoma 19 en la región citogenética q13.2-13.3 [25]. Los genes PSGs se encuentran conformando una familia de 11 genes y se ha visto que éstos se expresan preferencialmente en el sinciotrofoblasto de la placenta [26]. Por otra parte, esta familia de genes se encuentran formando un *cluster* y se agrupan con los antígenos carcinoembriogénicos (CEA) y las moléculas de adhesión (CEACAM) debido a que presentan una estructura como los demás integrantes de las CEACAM y en conjunto estos genes forman parte de la superfamilia de las Inmunoglobulinas [27].

El gen PSG1 tiene diferentes alias como los son: B1G1, CD66f , DHFRP2, FL-NCA-1/2, FLJ90598, FLJ90654, PBG1, PS-beta-C/D, PSBG-1, PSBG1, PSG95, PSGGA, PSGIIA y SP1 ([http:// www. genecards. org](http://www.genecards.org)), lo podemos encontrar en la base de datos del NCBI con número de unigen Hs.466843. Estructuralmente el gen se encuentra constituido por 6 exones y presenta 5 isoformas por *splicing* alternativo, también presenta una secuencia Alu como se muestra en la figura 5.



(C) 2005 - Alle Rechte vorbehalten

Diese Seite drucken

Figura 5: Organización en dominios de las 5 isoformas de la glicoproteína específica del embarazo, se muestran los diferentes dominios que presentan las diferentes proteínas, así como también sus sitios de glicosilación.

La glicoproteína específica del embarazo es una molécula que es sintetizada en la placenta preferencialmente en el sinciotrofoblasto [28]. Ya sintetizada la proteína es liberada al torrente sanguíneo [29], sin embargo a la fecha su función biológica aún es poco conocida, pero se ha visto que la deficiencia de esta glicoproteína provoca diversas patologías asociadas al embarazo, dentro de ellas se encuentran: preclampsia, aborto espontáneo y desarrollo retardado, entre otras [30], cabe mencionar que esta glicoproteína es una de las mas abundantes en la sangre durante el embarazo.

El gen PSG1 contiene 6 exones y codifica para una proteína que de 419 aminoácidos que se detecta en la segunda y tercera semana de gestación [31], se detecta en suero a concentraciones de 200 a 400 microgramos por mililitro [32] y aumentan los niveles conforme progresa el embarazo [31].

Por otra parte, un miembro de esta familia, el gen PSG6 se le ha asociado con la mola hidatiforme [33]. 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 [34], sin embargo, esta invasión

es controlada y de manera natural, no llega a causar algún tipo de neoplasia, por otra parte no existen informes en los que se establezca alguna relación entre la ganancia de copias extras del gen PSG1 o de su expresión en cáncer cérvico uterino.

4. Justificación

El cáncer cérvico uterino actualmente en nuestro país representa la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas mayores de 30 años y con un índice de 1 muerte cada 2 horas, esto lo hace uno de los principales problemas de salud para nuestro país y en el mundo, además es cada vez más común observar la presencia de mujeres más jóvenes con lesiones intraepiteliales cervicales y por supuesto la infección por VPH, provocando esto un interés mayor por la enfermedad.

Por otra parte 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 que se encuentran involucrados en el proceso de carcinogénesis es de gran importancia para su entendimiento.

Tal es el caso del gen PSG1 que se ha encontrado amplificado en el número de copias utilizando la hibridación genómica comparativa en microarreglos, sin embargo, es de gran importancia establecer con más certeza y corroborar si existe dicha amplificación utilizando otra plataforma.

5. Objetivo General

- Determinar la amplificación del gen PSG1 en lesiones pre-malignas y malignas del cérvix uterino.

5.1. Objetivos particulares

- Diseñar un par de oligonucleótidos D-Lux para la amplificación del gen PSG1.
- Determinar el grado de amplificación del gen PSG1 utilizando PCR en tiempo real en tejidos del cérvix sin lesión y con lesión.

6. Materiales y Métodos

En el presente estudio se trabajó con 18 muestras de tejidos cervicales invasores, 3 lesiones de bajo y 6 alto grado, 5 normales incluidas en bloques de parafina y 5 muestras de DNA de linfocitos, además de las líneas celulares HeLa, CaLo, SiHA, INBL, Rova, Vipo, C33 y Vibo, derivadas del cáncer cérvico uterino.

6.1. Selección del área de interés

Se realizaron cortes histológicos de 5 μm de los tejidos incluidos en los bloques de parafina, provenientes de nuestro banco de tejidos, con un micrótopo, posteriormente se procedió a realizar la tinción de hematoxilina y eosina para identificar la zona donde se encuentran la mayor cantidad de células tumorales. La selección del área de interés fue llevada a cabo con la ayuda de un patólogo y utilizando una aguja para biopsia de médula ósea [24], mediante una picadura en el bloque en el área seleccionada.

El área seleccionada fue extraída del bloque y se procedió a la extracción y purificación del DNA genómico mediante procedimientos convencionales y de rutina (utilizando acetato de amonio 7 M en la

precipitación de proteínas). Posteriormente se hicieron geles de agarosa al 2% para ver la integridad del DNA genómico.

6.2. Cuantificación del DNA genómico

La cuantificación del DNA genómico se realizó por fluorimetría utilizando el fluoroskan Ascent FL y se emplearon diferentes concentraciones de DNA estándar (0, 10, 100 y 1000 ng/ul) para hacer la curva de calibración, utilizando tris EDTA (TE) 1X como amortiguador y picogreen 1X para la detección [35]. El programa que se utilizó fue el Ascent software ver. 2.4 con los los siguientes parámetros, 10 seg de agitación, 485 y 530 nm de excitación y emisión, respectivamente.

6.3. Diseño de los oligonucleótidos para la PCR en tiempo real

Los oligos que se utilizaron para hacer la amplificación del gen PSG1 para PCR en tiempo real fueron diseñados en la página de invitrogen ([https://orf.invitrogen.com / lux/cid-fl-DLUXDESIGNER](https://orf.invitrogen.com/lux/cid-fl-DLUXDESIGNER)) utilizando el programa D-LUX Designer, empleando el número de acceso (NM_006905) para el gen PSG1, obteniendo los siguientes oligos 5'- cag ccG CAA TGG ACC ATG TAG GCtG -3 y 5'- TCT GAA

GTC AGC CTT GGT TTGG ´ 3, el primer sentido fue marcado con 6-carboxy-fluorescein (FAM) para su detección, con longitud de onda de 490 nm 520 nm.

Por otra parte, se utilizó como gen de referencia al gen beta-2-Microglobulina (B2M) el cual es considerado como gen constitutivo [36] y fue diseñado empleando el mismo programa y numero de acceso NM_004048, obteniéndose las siguientes secuencias de los oligos correspondientes al sentido y antisentido respectivamente 5´- ACA TAC CTT GGT TGA TCC ACT T -3´ y 5- ca tct gTT GCT CTA TAC GTG GCA GAT G -3´

6.4. Condiciones de amplificación

Los oligos de PSG1 y de B2M se utilizaron a una concentración de 0.2 µM, Platinum QPCR super Mix UDG 1X, BSA 250 ng/µl, 1.2 u de Taq DNA polimersa platinumm, MgCl2 4mM y 3mM respectivamente, se utilizó el termociclador LighClycler 2 de Roche, bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 min a 50°C de incubación del UDG, 1.30 min a 95°C para la desnaturalización del DNA, 45 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: 94°C por 10 seg, 64°C 10 seg y 72°C 10 seg, las condiciones de la curva de asociación

fueron: de 95°C 0 seg, 68°C por 10 seg y 95°C 0 seg con un intervalo de temperatura de 0.05°C iniciando en 68°C asta 95°C, y se utilizó 1 μ l DNA genómico como molde para la amplificación a una concentración de 200 ng para ambos genes.

6.5. Análisis para la PCR en tiempo real

Se realizó una PCR cuantitativa relativa, por lo que los resultados obtenidos se analizaron utilizando el método comparativo delta-delta CP, este método está basado en un modelo matemático que calcula los cambios relativos que existen de copias del gen problema con respecto al gen de referencia, basado en la fluorescencia emitida por cada oligonucleótido marcado de ambos genes durante la amplificación, el análisis consiste en ver los cambios de fluorescencia que existen entre una muestra experimental y una muestra calibradora (normal), este método incluye también una correlación entre la amplificación del gen problema, como del gen constitutivo [38].

$$Fluorescencia = (E_{blanco})^{\Delta CP_{blanco}(control-muestra)} \quad (1)$$

$$Fluorescencia = 2^{-\Delta CP_{muestra} - \Delta CP_{control}} \quad (2)$$

Obteniendo así los valores de fluorescencia relativa.

$$Fluorescencia = 2^{-\Delta\Delta CP} \quad (3)$$

7. Resultados

Se utilizaron 10 muestras normales de las cuales 5 fueron linfocitos y 5 tejidos cervicales sin lesión, 9 lesiones premalignas, 18 tumores invasores y 8 líneas celulares derivadas del cáncer cérvico uterino. A dichas muestras se le extrajo y purificó el DNA, logrando una buena calidad en su integridad, lo que se pudo corroborar con un gel de agarosa al 2% como se observa en la figura 6.

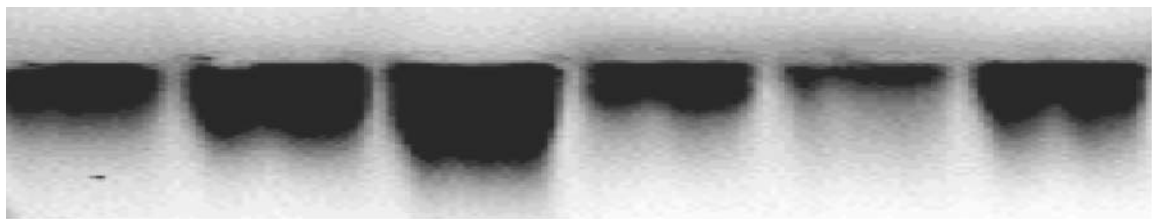


Figura 6: Evaluación de la integridad del DNA genómico por electroforesis en geles de agarosa al 2%, se observan seis diferentes muestras de tejido cervical pudiéndose observar la calidad del mismo.

Después de obtener DNA de buena calidad, se procedió a realizar la cuantificación; ya que es necesario emplear cantidades conocidas de DNA para realizar la PCR en tiempo real, en la figura 7 se muestra la curva de calibración de DNA que nos sirvió de referencia para su cuantificación.

Para la cuantificación de DNA en las muestras se emplearon ali-

cuotas cuya cantidad de DNA estuviese en el rango útil de la curva de referencia (0 a 1000 ng), en aquellas muestras que la concentración era superior a la cuantificación se hizo una dilución de 1:10 para que pudieran entrar en el rango y se procedió a cuantificar nuevamente, en la siguiente figura se muestran una tabla de la cuantificación del DNA así como la curva de calibración del DNA estándar.

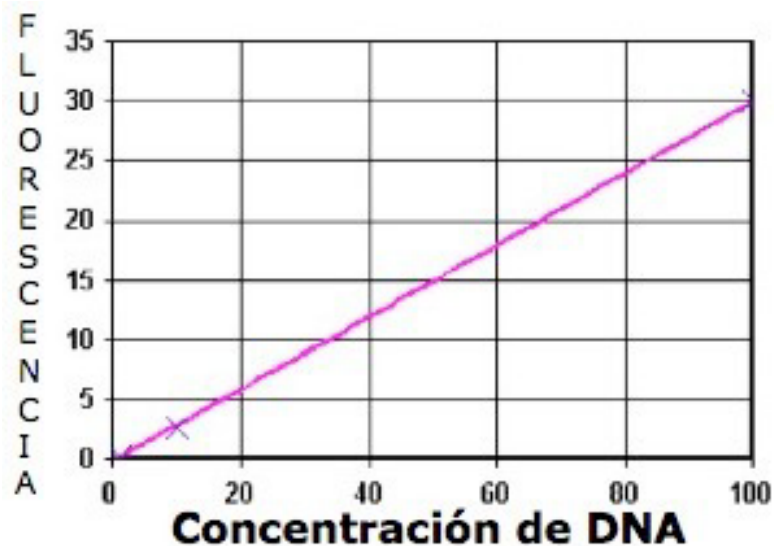


Figura 7: Curva de calibración para la lectura del DNA por fluorimetría, en el eje X se muestran las diferentes concentraciones utilizadas de DNA estándar, mientras que en eje Y se presentan los valores de fluorescencia.

Ya que se tenían cuantificadas todas las muestras que se utilizarían, se procedió a la estandarización del la PCR en tiempo real, iniciando primero con una PCR convencional para identificar que efectivamente se esté amplificando el fragmento del gen con el tamaño esperado. Para lo que se utilizaron 5 muestras tomadas al azar. En la figura 8 se muestra el amplificado de la PCR convencional, podemos observar que efectivamente se estaba amplificando el fragmento esperado.



Figura 8: Electroferograma de un gel de agarosa al 2% de 5 diferentes productos de PCR, tanto del gen PSG1, como del gen de referencia B2M, se observa el tamaño del producto esperado de 126 pb.

Ya que estuvimos seguros que el amplicón tenía el tamaño esperado, se procedió a la estandarización del la PCR en tiempo real. Como primer punto se realizó una curva de magnesio para identificar cual era su concentración adecuada, obteniendo que ésta era de 4 mM para PSG1 y para el gen B2M era de 3 mM, utilizando un DNA molde normal, como se muestra en la figura 9

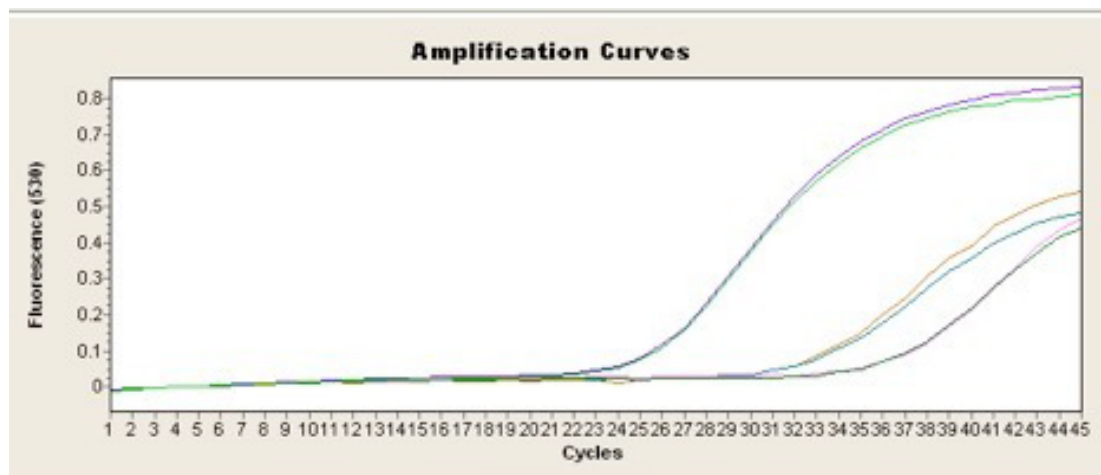


Figura 9: Curva de amplificación del gen PSG1 y B2M utilizando un DNA normal, en las dos primeras (morada y verde) representan a los amplificadores de los genes antes mencionados a concentraciones de 4 y 3 mM de magnesio respectivamente, en las siguientes también se amplifican los genes pero a concentraciones de 3 y 5 mM de magnesio, pero su eficiencia es menor, en el eje X se muestra el número de ciclos en la reacción y en el eje Y se muestran los niveles de fluorescencia.

Ya que se tenían las concentraciones de magnesio, se procedió a realizar una curva de fusión para identificar si existían estructuras secundarias o bien que los oligonucleotidos se estuvieran alineando en sitios inespecíficos, en la siguiente figura 10, se observan la curva señalada para los genes PSG1 y B2M, en donde podemos ver exclusivamente dos picos de fluorescencia correspondientes a ambos genes, con estos resultados pudimos verificar, que efectivamente, bajo esas condiciones, solamente estábamos amplificando el fragmento del gen con el tamaño esperado, también pudimos constatar que los oligonucleotidos no formaban dímeros, ni se estaban alineando en sitios diferentes a los esperados.

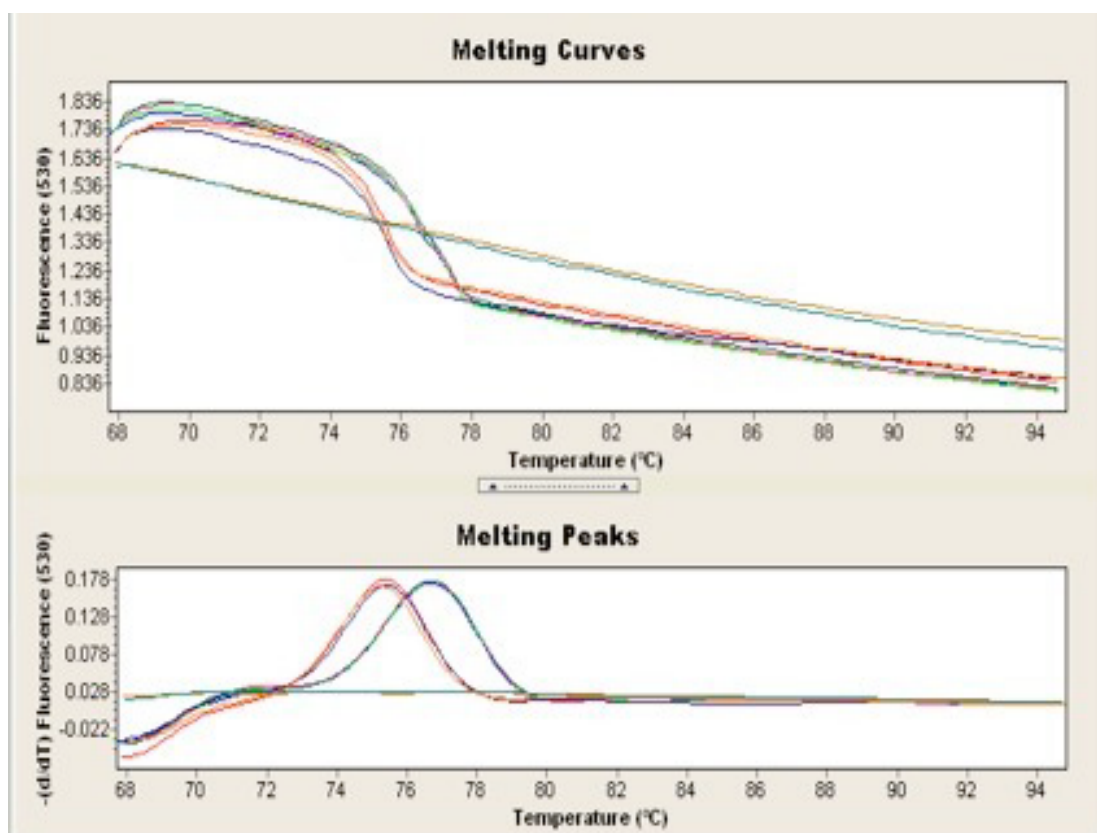


Figura 10: Curva de fusión para identificar que los oligonucleótidos PSG1 y B2M no forman estructuras secundarias, la primera curva es del producto de PSG1 y la segunda del B2M amplificando un DNA normal. Se observa efectivamente, que solo se tiene un producto amplificado de ambos genes, además que ambos genes presentan fluorescencias semejantes, debido al tamaño de los picos correspondientes.

Posteriormente se procedió a realizar unas curvas de eficiencia para los genes PSG1 y B2M, éstas se realizaron utilizando DNA de un individuo sano a diferentes concentraciones (0, 10, 100 y 500 ng de DNA), bajo las mismas condiciones de amplificación como se muestra en las figuras 11 y 12. Partiendo de la premisa de que se tienen 2 copias del gen en un individuo sano, se tendría que obtener una eficiencia de 2 o muy cercana a esta para que nuestros resultados sean confiables. Con los resultados generados, se lograron obtener las condiciones adecuadas para iniciar la cuantificación en los diferentes tumores y líneas celulares; ya que en ambas reacciones las eficiencias fueron muy cercanas entre sí y muy próximas a valores de 2, como se esperaba.

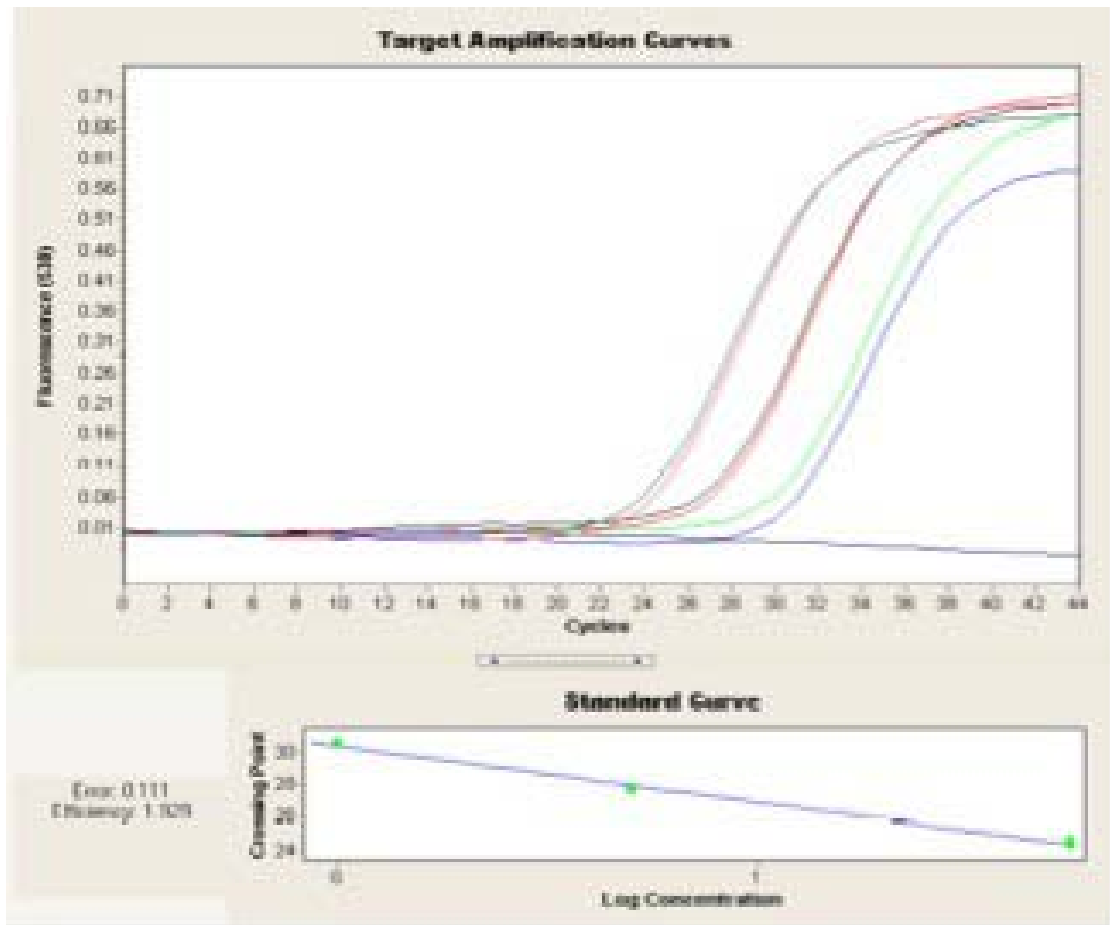


Figura 11: Curva de eficiencia para el genes PSG1, se realizó la amplificación del gen bajo diferentes concentraciones de DNA (0, 10, 100 y 500 ng), en la imagen se observa; en las primeras curvas (negra y rosa) la amplificación de un DNA normal a una concentración de 500 como se observa en las curvas negra y roja, seguido de 100 y 10 ng de DNA de la misma muestra por duplicado, logrando la eficiencia del gen con respecto de la fluorescencia emitida en el ciclo CP.

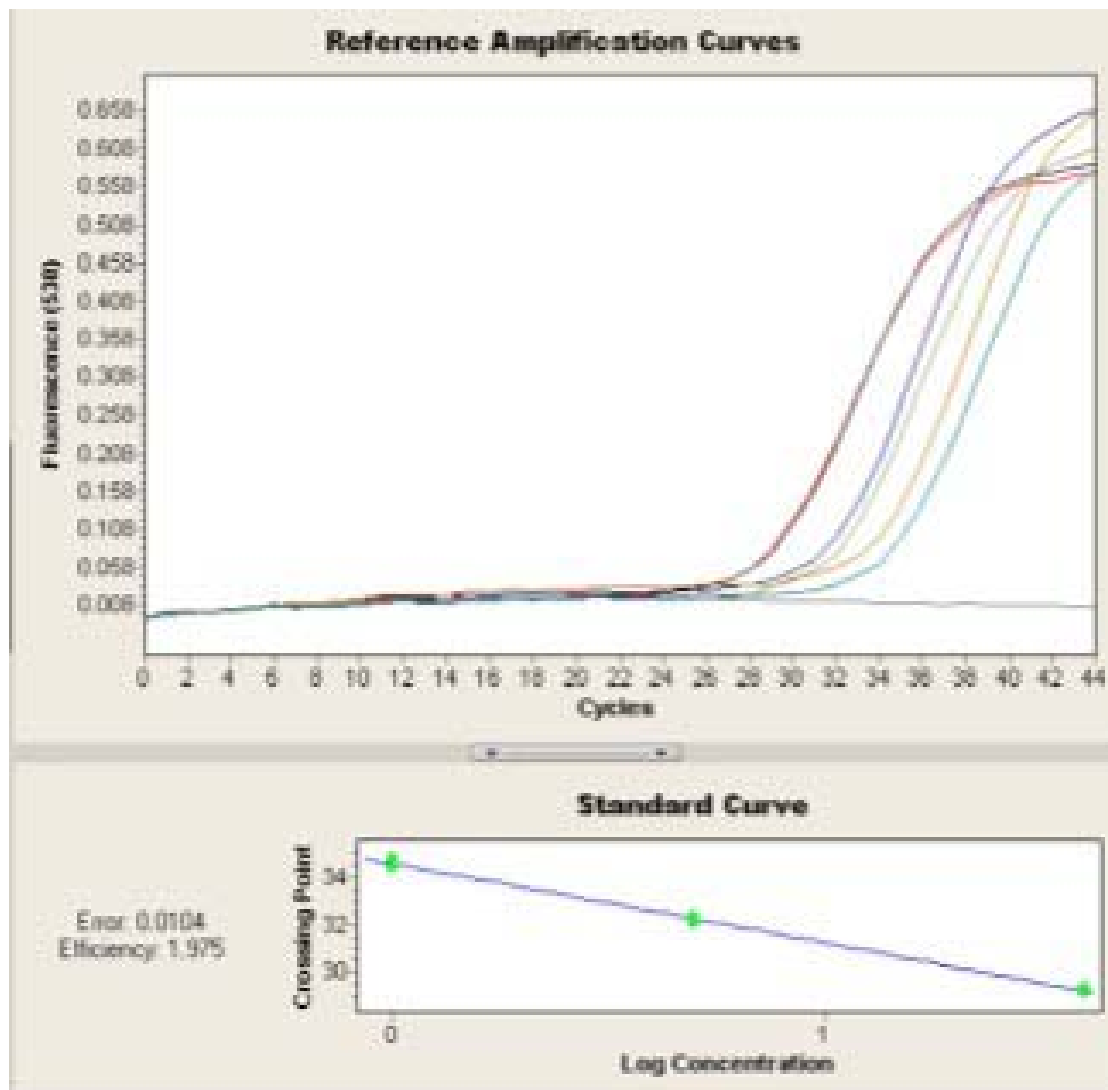


Figura 12: Curvas de eficiencia para el genes B2M, se realizó la amplificación del gen bajo diferentes concentraciones de DNA (0 10, 100 y 500 ng), para lograr así la eficiencia del gen con respecto de la fluorescencia emitida en el ciclo CP, al igual que la curva de PSG1 son amplificaciones de DNA normal y el CP de cada reacción corresponde a la concentración del DNA molde.

Ya que se tenían las condiciones adecuadas para realizar la detección del gen PSG1 se procedió realizar la amplificación. Esta fue de acuerdo a las condiciones que se mencionaron, y se realizó utilizando los iniciadores correspondientes para los genes PSG1 y B2M, se amplificaron los genes antes mencionados utilizando la misma muestra, además de hacer un duplicado de cada reacción, dentro de cada reacción se amplificaba una muestras normal para ambos genes, como se muestra en las figuras 13 y 14.

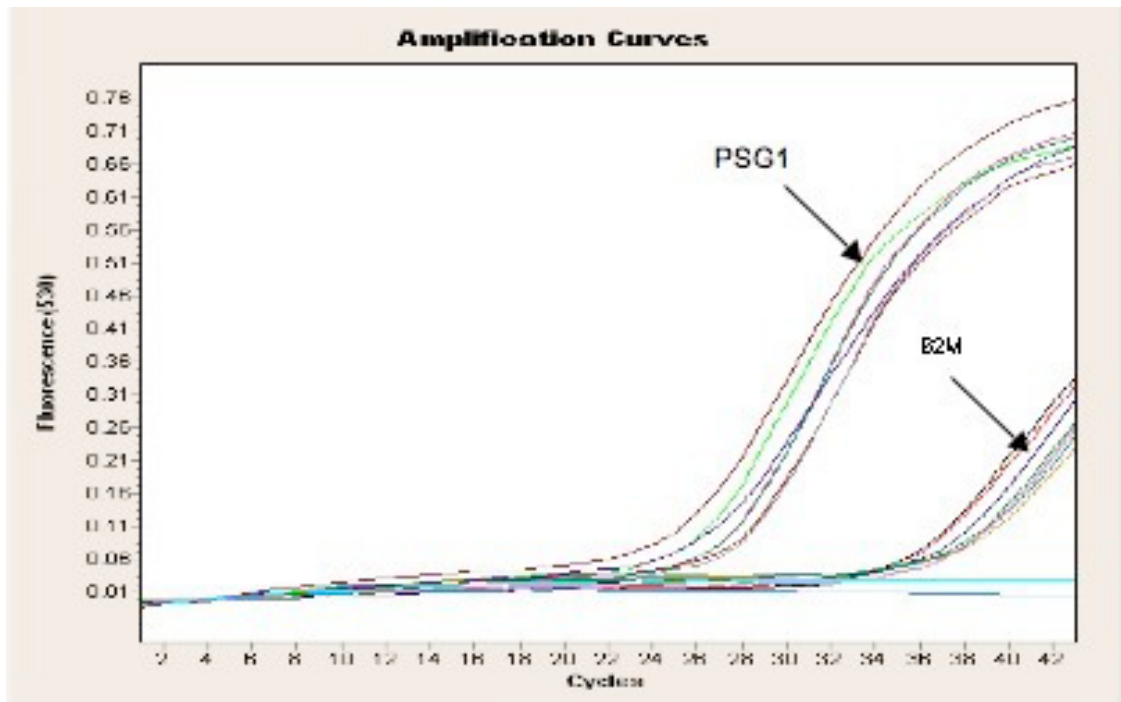


Figura 13: Amplificación de los genes PSG1 y B2M en las muestra problema, observándose claramente la presencia de dos grupos de amplificación, el primer representado por el gen PSG1, inicia su amplificación exponencial antes que el segundo grupo, correspondiente al gen B2M.

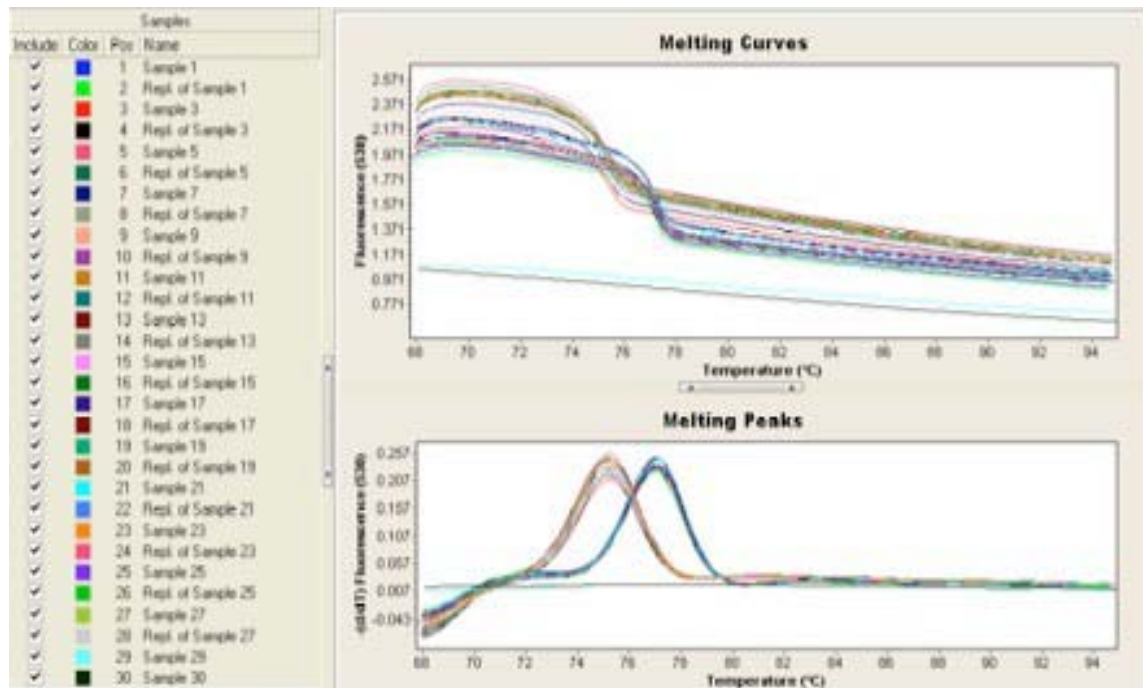


Figura 14: Curva de fusión para ambos genes en las muestras problema, se observa que no existen estructuras secundarias en todas las muestras, además de agruparse en dos picos que representa los genes PSG1 y B2M respectivamente.

7.1. Análisis de los resultados

La PCR en tiempo real es uno de los métodos con alta sensibilidad y especificidad, él podemos detectar pequeñas variaciones cuantitativas, ya sea de expresión o de carga génica, éste método es dependiente de las secuencias blancos a amplificar, los resultados obtenidos se analizaron de acuerdo a lo establecido para PCR cuantitativa relativa [37], método que se basa en la expresión relativa de genes blancos versus el gen de referencia, en nuestro caso, la evaluación es basada en la carga génica, para la identificación relativa de la carga génica se utilizaron exclusivamente los valores de CP (ciclo umbral de amplificación) de cada muestra, este valor es cuando se inicia la amplificación del gen en forma exponencial y los valores resultantes de CP fueron analizados por el siguiente modelo matemático.

$$Fluorescencia = 2^{-\Delta\Delta CP} \quad (4)$$

El método matemático delta-delta nos permite comparar el resultado de la amplificación relativa por PCR en tiempo real, entre grupos específicos de estudio, una óptima e idéntica amplificación de tiempo real se encuentran dadas por la eficiencia de la reacción observada en

el ciclo Ct del gen problema y del gen calibrador, ésta última se determina por las diferencias que existen en las concentraciones del DNA molde y su proporcionalidad en el CP de cada una de las muestras y su relación con su duplicado, la eficiencia está dada por el valor 2 que corresponde al número de copias de un gen presente en el genoma de un individuo sano, también nos permite identificar la amplificación relativa del gen PSG1 con respecto del gen de referencia, en este caso el gen B2M.

Por otra parte nos permite hacer las comparaciones de las muestras tumorales con respecto de las normales, de tal forma que se pudieron observar, incluso mínimas variaciones en el número de copias para el gen PSG1 con relación al gen control B2M y con respecto de la muestra normal utilizada, como se muestra en las siguientes figuras 15.



Figura 15: Niveles de amplificación del gen PSG1 en muestras de cáncer cérvico uterino, en la posición 1 del eje X se presenta el valor de amplificación del DNA normal, seguido por los NICs (en las posiciones 2 a 10), las muestras M32 y 3A corresponde a NIC I, mientras que 52, M4, 34, 49, M1, 4 y 101 son NICs III, en las posiciones 11 al 28 son tumores invasores del cérvix y en las últimas 6 posiciones están las líneas celulares (HeLa, CaLo, SiHa, C33, INBL y Vipa).

Basado en las muestras analizadas por duplicado podemos mencionar que del total de las muestras 6/33 (18.18 %) presentaron la ganancia del gen PSG1, mientras que 22/33 (66.6 %) tuvieron diferentes niveles de amplificación del gen, con variaciones que van desde 1.2 hasta 18 veces mas que los normales. Por otra parte, llama la atención que las líneas celulares derivadas del cáncer cérvico uterino mostraron los mayores niveles de amplificación del gen que van desde 5 hasta 18 veces más que en el normal. En 5/9 (56 %) muestras de lesiones pre-malignas se presentó la amplificación y en 2/9 (22 %) la ganancia de PSG1. Para las invasoras 4/18 (22 %) tuvieron la ganancia y 11/18 (61 %) presentaron la amplificación del gen. Así, en general se observa la alteración del gen PSG1 en el 84.84 % de las lesiones, cabe mencionar que no se encuentra relación con la alteración del gen y con la presencia del virus del papiloma humano es decir posiblemente la alteración de este gen es necesaria para la célula tumoral independientemente de si existe infección o no, ya que en la linea celular C33 presenta los mayores niveles de amplificación y esta no contiene secuencias de VPH.

7.2. Comparación de la amplificación del Gen PSG1 vs hibridación genómica comparativa en microarreglos.

La metodología de HGC en microarreglos es una plataforma con la que podemos identificar el patrón de desbalances en ganancia y pérdida de material genético [18]. Aplicando esta plataforma en diversos tumores y lesiones pre-malignas cervicales se pudo observar que no existe la ganancia uniforme en las diversas muestras, presentando variaciones en cada una de ellas tanto en las lesiones pre-malignas como en las invasoras como se muestra en la figura 16.

Estos datos los pudimos corroborar utilizando el PCR en tiempo real, por una parte existen variaciones en el número de copias en todas las muestras y mas aún en las líneas celulares analizadas ya que fueron las que presentaron mayor amplificación del gen. Pudimos ver además mediante HGC algunas muestras presentaban pérdida del gen, lo que también corroboramos por PCR en tiempo real, la perdida fue en 4 de las 33 muestras analizadas.

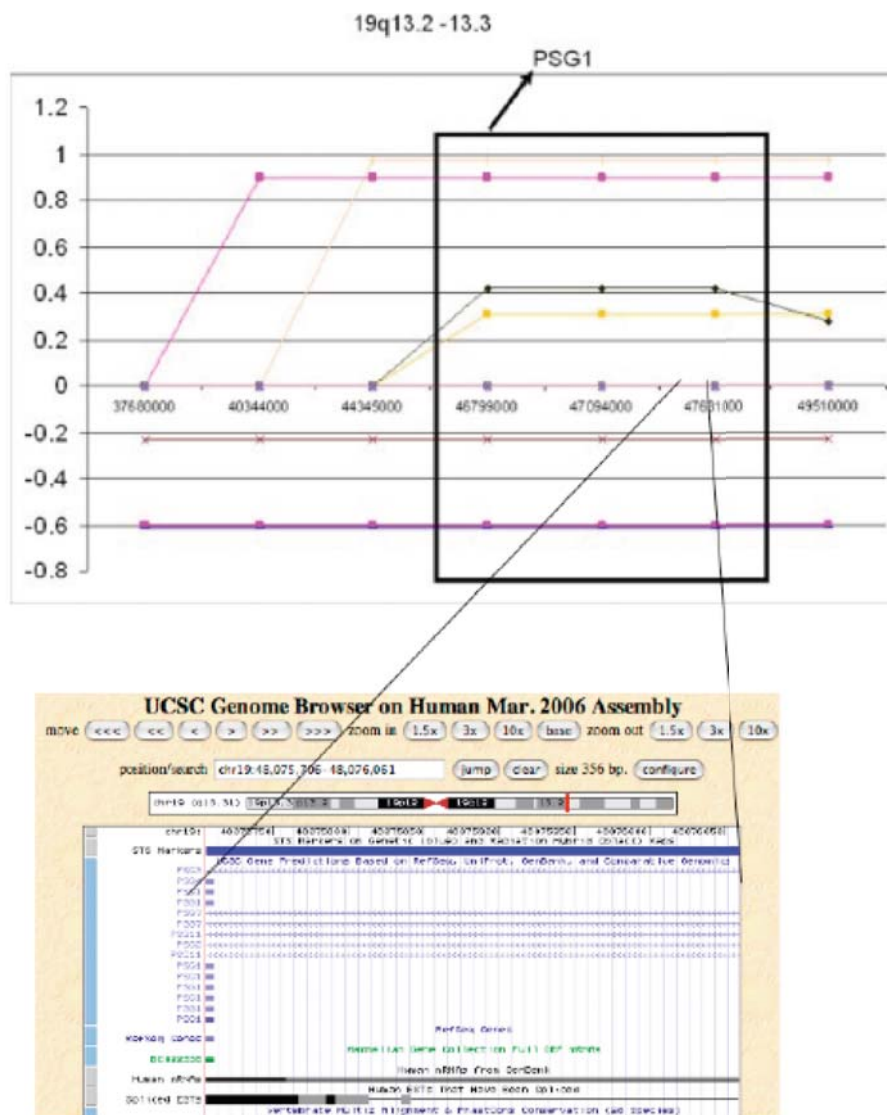


Figura 16: En esta figura se muestra la amplificación del gen PSG1 utilizando microarreglos de HGC en diferentes líneas celulares, muestras pre-malignas e invasoras del cérvix, en la parte inferior de la figura se muestra la ubicación citogenética del gen PSG1 utilizando el *genome browser*.

8. Discusión

Con el desarrollo del proyecto del genoma humano en la búsqueda de conocer la totalidad de genes presentes en los humanos, se han desarrollado paralelamente nuevas estrategias y metodologías para conocer el mismo, también han surgido nuevas ramas de la investigación biomédica y biológica como es el caso de la genómica, esta ha tenido un auge en los últimos años gracias al desarrollo de técnicas avanzadas como es la secuenciación automatizada, bioinformática, la utilización de microarreglos o biochips para el estudio de los diferentes genomas en estados y tiempos determinados.

El uso de plataformas como las antes mencionadas en enfermedades oncológicas ha generado una gran cantidad de información en los procesos de carcinogénesis y ha contribuido a entender algunos de los procesos celulares y moleculares que están o pudieran estar involucrados en ella [17], tal es el caso de la HGC que nos permite conocer los desbalances en ganancia y pérdida de ácidos nucleicos que sufre la célula durante dicho proceso.

Además el uso de estas herramientas moleculares de análisis global han permitido en corto tiempo conocer el perfil de los desbalances cro-

mosómicos en un gran número de tumores sólidos [38] y dentro de ellos al cáncer cérvico uterino, del que se han descrito los perfiles de alteraciones cromosómicas en diferentes poblaciones (<http://genome.ucsc.edu/>), estas nuevas estrategias están permitiendo el desarrollo de plataformas para el diagnóstico, pronóstico y posible tratamiento de la enfermedad [39], con la finalidad de poder prevenir etapas avanzadas o seleccionar tratamientos más eficaces.

Aplicando la tecnología de HGC en microarreglos en pacientes mexicanas y líneas celulares derivadas del cáncer cérvico uterino, se han logrado identificar diferentes desbalances en genes que se ganan en número de copias consistentemente desde los inicios de la enfermedad, es decir sus etapas tempranas, donde aún no existe la presencia del cáncer, pero ya se pueden observar algunas de las alteraciones presentes en los cánceres invasores.

La identificación de dichas alteraciones cromosómica en los inicios de la enfermedad pudiera estar sugiriendo que las mismas estén asociadas al desarrollo o progresión del cáncer [21]. Una de las alteraciones presentes en cáncer cérvico uterino es la ganancia consistente del gen PSG1 (comunicación personal en preparación), siendo ésta la alteración común en la mayoría de las muestras analizadas y consistente

desde etapas tempranas de la enfermedad.

La utilización de plataformas de alto rendimiento como es el caso de la hibridación genómica comparativa en micrarreglos nos proporciona un gran cantidad de información ya que al hacer el escaneo en todo el genoma se pueden identificar la totalidad de alteraciones presentes, sin embargo, no es posible identificar cuantitativamente las variaciones de las alteraciones que se presentan, es por eso que los datos obtenidos por esta plataforma tienen que ser validados.

La validación de los resultados en tecnologías de alto rendimiento permite confirmar los resultados presentados y con esto se asegura la presencia de un fenómeno determinado, tal es el caso de la validación mediante el uso de la tecnología de PCR en tiempo real, esta tecnología nos permite identificar la presencia de transcritos o carga génica, de desbalances en número de copias del gen con respecto de un individuo normal y de un gen calibrador o gen constitutivo.

8.1. PCR en tiempo real

Este es uno de los métodos más empleados para cuantificación de genes o bien la expresión de los mismo, además la PCR en tiempo real provee más información que la PCR convencional [40], ya que en la misma amplificación se puede detectar cuantitativamente el gen con respecto de los ciclos de amplificación de la PCR, además de ser rápido y actualmente los costos se ha reducido en gran medida facilitando su uso y su accesibilidad.

El uso de esta metodología nos ha permitido identificar diferencias mínimas en los niveles de transcritos y carga génica, en una gran cantidad de procesos, en momentos determinados de las células [41], actualmente la PCR en tiempo real es una de los métodos de cuantificación de genes más usado por su alta eficiencia, dinamismo y sobre todo por su alta sensibilidad [41], sin embargo, para que este método sea confiable es indispensable considerar diversos parámetros de la técnica que son indispensable para el análisis de los resultados; fase exponencial, CP, fluorescencia basal, la eficiencia de la reacción, dilución de los iniciadores, concentraciones de moldes y la curva estándar.

8.2. Curva estándar

El procesamiento de los datos es la parte fundamental en la interpretación de los resultados finales de la PCR en tiempo real relativa, la curva estándar es un método que calcula los errores prácticos y teóricos en la PCR [42], como es la variación mínima en los elementos de la reacción, tal como; la toma de la muestra, diferencias en temperatura en las reacciones, etc., es por eso que en los experimentos es indispensable que se realice una curva estándar para los dos genes y eliminar la posibilidad de ruido en los experimentos, de esta manera pudimos comparar los datos obtenidos de ambos genes. Además de hacer una replica en la reacción para poder corroborar que efectivamente los resultados son similares, entonces así poder hacer las comparaciones respectivas. Es importante también considerar el uso de genes internos (control) dentro de las mismas reacciones como una referencia, el uso de estos genes permite hacer la relación de expresión o carga génica con genes que no sufren cambios y que han sido ampliamente utilizados como genes control en diferentes sistemas de investigación [36]. Estos genes son principalmente aquellos que se encuentran en actividad constante en las células, la modificación o alteración de dichos genes llevan a la célula a la inducción de la apoptosis.

La secuenciación terminada del genoma humano es ahora pública y se puede aplicar para el entendimiento, caracterización y tratamiento de enfermedades complejas como lo es el cáncer [43]. Aplicando el método de PCR en tiempo real en pacientes con cáncer cérvico uterino y líneas celulares derivadas del mismos en este primer grupo piloto pudimos identificar los diferentes desbalances del gen PSG1 en los pacientes oncológicos, obteniendo así valores diversos en la amplificación del gen en los diversos grupos de estudio, como se puede ver en la figura 15.

Por otra parte, es muy importante conocer la presencia de genes alterados que pudieran estar involucrados en el proceso neoplásico y por su alta amplificación de dichos genes, pudiera estar sugiriendo la posible presencia del RNAm y la proteína, para el caso del gen PSG1 que se ha podido identificar como un gen que se amplifica en etapas tempranas de la enfermedad, se puede sugerir que este jugando un papel importante para el desarrollo del tumor; ya que la presencia de esta glicoproteína es particular del sinciciotrofoblasto [21], y ya sintetizada es liberada al torrente sanguíneo [23], sin embargo aun no se conoce cual es su papel fundamental en el embarazo y su ausencia es de mal pronóstico.

Se ha sugerido que el gen PSG1 se encuentra participando de forma activa como un inmunomodulador, de forma tal que suprime ciertos genes del sistema inmune de la madre permitiendo a la placenta poder desarrollarse en el endometrio [27] además de observar que los niveles de la proteína en suero se incrementan conforme el desarrollo del embrión continua, la placenta es un claro ejemplo de un tejido con capacidades invasivas pero esta invasión es controlada, posiblemente la ganancia del gen en las células transformadas le pudiera estar confiriendo características necesarias al tejido neoplásico para que no sea eliminado por el sistema inmunológico y mas aún para la invasión del tumor a nuevos tejidos, por otra parte, un miembro de esta familia (PSG6) se le ha asociado con la presencia de tumores benignos esporádicos de la placenta (mola hidatiforme) [26], este tumor se presenta esporádicamente, sin embargo, en algunos casos la mola hidatiforme puede hacerse maligna.

9. Conclusiones

- En este primer estudio piloto pudimos comprobar los resultados de hibridación genómica comparativa en microarreglos mediante el uso de PCR en tiempo real para determinar la alteración en ganancia del gen PSG1 en pacientes y líneas celulares derivadas del cáncer cérvico uterino.

- Se identificaron los desbalances presentes del gen PSG1 en diferentes muestras analizadas, observando que no existe la ganancia uniforme en todas ellas, sino que el gen varía en las diferentes lesiones del cérvix, observándose alteraciones desde las lesiones premalignas.

10. Sugerencias para trabajos futuros

- Un estudio donde implique un mayor número de muestras.

- Determinar la expresión del gen PSG1 en tejidos del cérvix mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Referencias

- [1] Compendio de cáncer / RHNM / 2001 / Morbilidad / Mortalidad.
- [2] Mohar A., Frias-Mendivil M., Suchil-Bernal L. Descriptive epidemiology of cancer at the instituto nacional de cancerología of Mexico. *Salud Pública*. **39:4 253-58** (1997).
- [3] Dirección general de información y evaluación del desempeño secretaria de salud: Mexico 2001: *Cáncer Cervicouterino SSA* (2002).
- [4] Burk R. Human papilomavirus the risk of cervical cancer. *Hospital practice*. **103-11**(1999).
- [5] Walboomers JMM., Jacobs MV., Manos MM., Bosh FX., Kummer JA., Shah KV., Snijders PJF., Peto J., Meijer CJLM., Muñoz N. Human papilomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Phol.* **189: 12-19**(1999).
- [6] de Villers E.M., Gunst K., Stein H., Scherubl H. Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papilomavirus DNA sequences. *Int. J. Cancer Mar.* **20;109(2):253-8**(2004).
- [7] Milddleton K., Peh W., Southern S.A., Griffin H.M., Sotlar K., Nakanhara T. Organization of the human papilomavirus produc-

- tive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J. Virol.* **77: 10186-201**(2003)
- [8] Peh W., Middleton K., Christense N., Nicholls P., Egawa K., Solar K. Life cycle heterogeneity in animal model of human papillomavirus-associated disease. *J. Virol.* **76: 10401-16** (2002).
- [9] Brentjens MH., Yeung-Yue KA., Lee PC., Tyring SK., Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin.***20: 315-31**(2002).
- [10] Palefsky J. Biology of HPV in HIV Infection. *Adv Dent Res.***1;19(1):99-105** (2006).
- [11] Cox JT. Epidemiology and natural history of HPV. *J. Fam. Pract.***3-9**(2006).
- [12] Panduro A. Biología molecular en la clínica. Mexico. *Mc-Graw Hill interamericana.***129-40**(2000).
- [13] Pan, Gripe AE. Temporal distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev.***9:2157-2169** (1995).
- [14] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Rew.* **16(1) 1-16** (2003).
- [15] Emeny RT., Herron JR., Xi LF., Koutsky LA., Kiviat NB., Wheeler CM. Comparison of variant-specific hybridization and single-

- strand conformational polymorphism methods for detection of mixed human papillomavirus type 16 variant infections. *J. Clin. Microbiol.* **37(11):3627-33** (1999).
- [16] Kammer C., Warthorst U., Torrez-Martinez N., Wheeler C. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variant and functional consequences for P97 promoter activity. *J. Genetic Virol.* **81: 1975-81** (2000).
- [17] Alberson DG., Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human Molecular Genetics.* **12(2): R145-R152** (2003).
- [18] Bryndorf T., Kirchhoff M., Rose H., Maahr J., Gerdes T., Karhu R., Kallioniemi A., Christensen B., Lundsteen C., Philip J. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am. J. Hum. Genet.* **57(5):1211-20** (1995).
- [19] Heselmeyer K., Schihock E., Du-Manior S., Blegon H., Shah K., Steinbeck R., Aver G., Ried T. Gain of chromosome 3q define the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of uterine cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:479-787** (1996).
- [20] Kallioniemi A., Kallioniemi OP., Sudar D., Rotovitz D., Gray JW., Waldman F., Pinkel D. Comparative genomic hybridization for

- molecular cytogenetic analysis of solid tumor. *Science*. **258:818-882** (1992).
- [21] Umayahara K., Numa F., Suehiro Y., Sakata A., Nawata S., Ogata H., Suminami Y., Sakamoto M., Sasaki K., Kato H. Comparative genomic hybridization detects genetic alterations during early stages of cervical cancer progression. *Genes, Chromosomes and Cancer* **33:98-102** (2002).
- [22] Kallioniemi OP., Kallioniemi A., Sudar D., Rutovitz D., Gray JW., Waldman F., Pinkel D. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin. Cancer Biol.* **4(1):41-6** (1993).
- [23] Hidalgo A., Schewa C., Petersen S., Salcedo M., Gariglio P., Schlûns K., Dietel M., Petersen I. Human papillomavirus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumour cell lines. *Eurp. J. of Cancer.* **36:542-548** (2000).
- [24] Hidalgo A., Monroy A., Arana RM., Taja L., Vázquez G., Salcedo M. Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma derived cell lines. *BMC Cancer.* **3:8** (2003).
- [25] Tynan K., Olsen A, Trask B, Jong P, Wolfgang T, Zimmermann J, Carrano A., Mohrenweiser H. Assembly and analysis of cosmid

- contigs in the CEA-gene family region of human chromosome 19. *Nucleic Acids Res.* **Dec:20(7):1629-1636** (1992).
- [26] Tatarinov I., Tagirova AK., Pugachev KK., Shimbireva IB., Terent'ev AA. Cellular localization of human secretory beta globin in normal and tumor tissue. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **113(1):79-82** (1992).
- [27] Brummendorf T., Rathjen FG. Cell adhesion molecules 1: Immunoglobulin superfamily. *Prot. Prof. Rew.* **1(9):951-1058** (1994).
- [28] Zhou Y., Ficher SJ., Janatpour M., Genbacev O., Dejana E., Wheelock M., Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as the differentiate. A strategy for successful endovascular invasion. *J. Clin. Invest.* **99(9):2139-51** (1997).
- [29] Ismail AA., Fahmy EI. Pregnancy-specific beta 1-glicoprotein (SP) and its relation to fetal birth weigh at term pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **16:45(1):13-17** (1992).
- [30] Lei KJ., Sartwell AD., Pan CJ., Chou JY. Cloning and expression of genes encoding human pregnancy-specific glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **15;267(23):16371-8** (1992).
- [31] Khan WN., Frangsmyr L., Teglund S., Israelsson A., Bremer K., Hammarstrom S. Identification of three new genes and estima-

- tion of the size of the carcinoembryonic antigen family. *Genomics*. **14(2):384-90** (1992).
- [32] Lin TM., Galbert SP., Kiefer D., Spellacy WN., Gall S. Characterization of four human pregnancy-associated plasma protein. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **118(2):223-36** (1974).
- [33] Leslie KK., Watanabe S., Lei KL., Chou DY., Plouzek CA., Deng HC., Torres J., Chou JY. Linkage of two human pregnancy-specific beta 1-glycoprotein genes: one is associated with hydatiform mole. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87(15):5822-6** (1990)
- [34] Motran CC., Díaz FL., Gruppi A., Slavin D., Chatton B., Bocco JL. Human pregnancy specific glycoprotein 1 (PSG 1) induce alternative activation in human and mouse monocytes and suppresses the accessory cell-dependent T cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.* **72(3) : 512-21** (2002)
- [35] Wetton JH., Tsang CS., Roney CA., Spriggs AC. An extremely sensitive species-specific ARMs PCR test for the presence of tiger bone DNA. *Fosensic. Sci. Int.* **140(1):139-45** (2004).
- [36] Ullmannová A., Haskovec C. The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real time RT-PCR. *Folia Biologica.* **49, 211-16** (2003).

- [37] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acid. Res.* **29 (9): 2003-07** (2001).
- [38] Alberson DG., Collins C., McCormick F., Gray JW. Chromosome aberration in solid tumors. *Nat. Genet.* **34(4):369-76** (2003).
- [39] Hidalgo A., Salcedo M. Global analysis strategies. Toward the genetic management of neoplasias. *Rev. Invest. Clin.* **53(5): 430-43** (2001).
- [40] Cankar K., Stebih D., Dreo T., Zel J., Grunden K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR ? effects of DNA extraction method and simple matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology.* **6(37)** (2006).
- [41] Wong L., Ching T.W., Kok T.L., Koon T.H. Spontaneous hemoperitoneum from an uterine leiomyoma in pregnancy. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* **84(12):1208-9** (2005).
- [42] Larionov A., Krause A., Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* **6(62):1-16** (2005).
- [43] Bernard SP., Wittwer TC. Real time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin. Chem. Rew.* **48:8** (2002)