



Microarreglos de ADN y cáncer cervicouterino: identificación de marcadores tumorales

CG Acevedo Rocha,^{*,**} E Álvarez,^{*} G Zafra de la Rosa,^{***,****} M Álvarez Navarro,^{***} P Gariglio^{*}

RESUMEN

La tecnología genética de los microarreglos ha incrementado el entendimiento de los eventos moleculares de las neoplasias. Con los perfiles de expresión génica se ha logrado la subclasificación molecular de pacientes y la identificación de miles de genes implicados en el cáncer cervicouterino. Este artículo revisa la utilidad de los microarreglos de ADN en la carcinogénesis cervicouterina y propone los posibles marcadores tumorales para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

Palabras clave: genómica, transcriptómica, microarreglos de ADN, cáncer cervicouterino, virus del papiloma humano, marcadores tumorales.

ABSTRACT

Microarray technology has remarkably accelerated the understanding of the molecular events of neoplasias. By means of gene expression profiles, a molecular subclassification of cancer patients and the identification of thousand of genes involved in this pathology have been achieved. Herein, the general use of DNA microarrays in cervical cancer tumorigenesis is reviewed. Finally, putative molecular tumour markers as useful factors in diagnosis, prognosis, and tailor-made therapy for this disease are proposed.

Key words: genomics, transcriptomics, DNA microarrays, cervical cancer, human papillomavirus, tumor markers.

RÉSUMÉ

La technologie génétique des micro réglages a augmenté la compréhension des événements moléculaires des néoplasias. Avec les profils d'expression génique on a réussi le sous classement moléculaire de patientes et l'identification des milliers de gènes impliqués dans le cancer du col utérin. Cet article examine l'utilité des micro réglages d'ADN dans la carcinogénèse cervico-utérine et propose les possibles marqueurs tumoraux pour le diagnostic et thérapie de cette souffrance.

Mots-clés : génomique, transcriptomique, micro réglages d'ADN, cancer du col utérin, virus du papillome humain, marqueurs tumoraux.

RESUMO

A tecnologia genética dos microarranjos acrescentou o entendimento dos eventos moleculares das neoplasias. Com os perfis de expressão génica se conseguiu a sub-classificação molecular de pacientes e a identificação de miles de genes envolvidos no câncer cervicouterino. Este artigo revisa a utilidade dos microarranjos de ADN na carcinogénese cervicouterina e propõe os possíveis marcadores tumorais para o diagnóstico, prognóstico e terapia deste padecimento.

Palavras chave: genômica, transcriptômica, microarranjos de ADN, câncer cervicouterino, vírus do papiloma humano, marcadores tumorais.

* Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV-IPN, México, DF.

** Molecular Biotechnology Group, Max Planck Institut of Biochemistry, Martinsried, Alemania.

*** Servicios de Genética y Gineco-Obstetricia, Hospital Español, México, DF.

**** Escuela de Medicina, Universidad Westhill, México, DF.

Este artículo debe citarse como: Acevedo RCG, Álvarez E, Zafra RG, Álvarez NM, Gariglio P. Microarreglos de ADN y cáncer cervicouterino: identificación de marcadores tumorales. Ginecol Obstet Mex 2007;75:205-13.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

El cáncer cervicouterino representa la primera causa de muerte en países subdesarrollados y la segunda neoplasia más frecuente en todo el mundo. Este padecimiento se relaciona con la infección ocasionada por el virus del papiloma humano de alto riesgo, pues los tipos oncogénicos 16 y 18 se han encontrado en más del 70% de las biopsias realizadas en todo el mundo.¹ Se estima que 80% de las mujeres se infectan con el virus del papiloma humano en algún periodo de su vida y sólo 10% manifiestan cambios precancerosos en el tejido cervical. El cáncer cervicouterino puede prevenirse por el pequeño porcentaje de cambios morfológicos que aparecen, además de ser fáciles de identificar, ya que la neoplasia intraepitelial de tipo escamosa y glandular es una de las lesiones premalignas más frecuentes. Con el advenimiento de los programas de detección oportuna se ha reducido la incidencia del cáncer cervicouterino, principalmente el de tipo escamoso; sin embargo, los casos de adenocarcinoma están en aumento. Son largos los periodos que transcurren entre las lesiones de bajo grado y el inicio de cáncer cervicouterino; por lo tanto, se considera que la infección ocasionada por el virus del papiloma humano de alto riesgo (ligada al comportamiento sexual) se relaciona con el progreso del padecimiento, además de requerir factores externos (administración de hormonas, multiparidad, tabaquismo) e internos que están determinados por la genética de cada paciente.² Con base en esta heterogeneidad, el uso de marcadores moleculares tumorales no sólo ha mejorado la precisión en el diagnóstico del cáncer cervicouterino, sino también ha surgido su posible utilidad para orientar el tratamiento de las pacientes.

La reciente secuenciación del genoma humano señala que tan sólo 25,000 genes codifican productos útiles para la estructura y función orgánica del ser humano. Estos genes representan aproximadamente 1% de los 3,000 millones de pares de bases que conforman nuestro genoma.³ En la actualidad, el propósito de la llamada "Era postgenómica" no pretende construir únicamente un catálogo de los genes, sino traducir la información generada a partir de éstos para el beneficio de la humanidad. Para lograr esto, la genómica funcional o "transcriptómica" tiene la finalidad de asignarle a todos los genes una función; tal es el caso de los microarreglos de ADN, como una

de las herramientas esenciales para cumplir este propósito. Los microarreglos de ADN son un conjunto de secuencias (pueden corresponder a las transcripciones) que se ordenan y fijan en una superficie plana de vidrio, preparada químicamente, para realizar su estudio. Hay dos tipos de microarreglos de ADN: a) microarreglos de ADN complementario (ADNc), donde se amplifican las transcripciones de interés mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa y se depositan en los lugares definidos en un papel de nitrocelulosa o una laminilla de vidrio;⁴ y b) microarreglos de oligonucleótidos, en los que pequeñas secuencias de bases de un gen se sintetizan y fijan en un sitio particular de la laminilla.⁵ El ARNm de un tejido de interés se convierte en ADNc y se marca por métodos radioactivos o fluorescentes; la identificación de genes expresados de dos muestras se realiza con la formación de híbridos entre el ADNc marcado y la sonda (ADNc u oligonucleótidos no marcados y unidos a la superficie), y otros métodos de detección. Los microarreglos de ADNc y oligonucleótidos se han usado ampliamente en varios estudios; la diferencia radica en el número de genes por centímetro cuadrado: en un papel de nitrocelulosa puede haber cientos de genes y en una laminilla (portaobjetos convencional) secuencias de 10,000 hasta 25,000 genes para ADNc y oligonucleótidos, respectivamente. En realidad, se conocen microarreglos de oligonucleótidos de 400,000 secuencias (más de una por gen). El alto rendimiento de los microarreglos permite la cuantificación simultánea de la transcripción de miles de genes en dos muestras y su marcación se realiza con distintos fluorocromos.

Por ejemplo, si se marcan las transcripciones de células tumorales con fluorocromo de color rojo y las células normales con color verde, al momento de localizar y comparar los puntos del microarreglo se observarán puntos rojos que corresponden a genes expresados diferencialmente en el tumor, puntos verdes que corresponden al tejido sano y puntos amarillos que corresponden a los genes expresados en ambos tejidos. Esta comparación directa (en un solo experimento) se hace con microarreglos de ADNc y oligonucleótidos; no obstante, existen diversas plataformas que utilizan un solo color para comparar dos muestras por separado. La intensidad de los puntos

se transforma en cantidades numéricas que estiman los niveles de transcripción encontrados en cada muestra. Los datos se analizan por computadora y con algoritmos matemáticos para determinar los genes que definirán el “perfil de expresión génica” relacionado con el fenotipo de distintas muestras. Según las intensidades de expresión de los distintos genes, la muestra tumoral o la sana adquieren el “retrato molecular” o “firma de expresión” particular (figura 1).

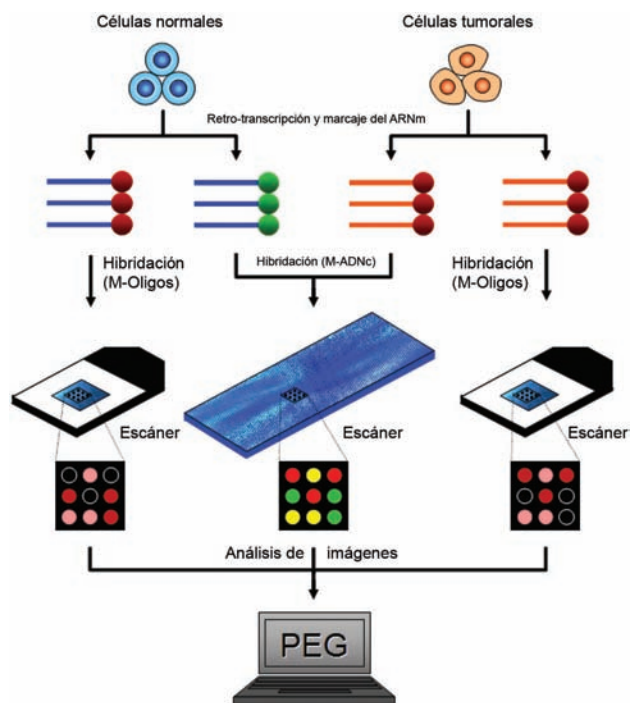


Figura 1. Procedimiento general para el uso y análisis de microarreglos de ADN. Los transcritos o ARN mensajeros (ARNm), expresados en las células, se marcan por fluorescencia con la enzima transcriptasa inversa y fluorocromos (por ejemplo: Cy3, de color verde y Cy5, de color rojo). Los ácidos nucleicos marcados se utilizan para realizar la hibridación con los microarreglos de ADNc (M-ADNc) o de oligonucleótidos (M-Oligos). En este caso, el formato de los M-ADNc colocan en co-hibridación dos muestras para determinar entre ambas los niveles relativos de ARNm (verde = abundancia de transcritos en células normales; rojo = abundancia de transcritos en células tumorales; amarillo = misma cantidad de transcritos en células normales y tumorales). Los M-Oligos están representados mediante el formato “unicolor”; de esta manera, es posible determinar los niveles absolutos de ARNm de dos muestras por separado (círculos blancos = ausencia de transcritos; rojo = abundancia de transcritos; rosa = presencia de transcritos). Después de obtener las imágenes, éstas se analizan con una computadora para determinar un perfil o patrón de expresión génica.

MICROARREGLOS Y CÁNCER

Los microarreglos son una de las herramientas más versátiles utilizadas en la “transcriptómica” y donde la oncogenómica ha encontrado muchas ventajas (figura 2). Gracias a la determinación de perfiles de expresión génica, mediante microarreglos de ADN, se han de-

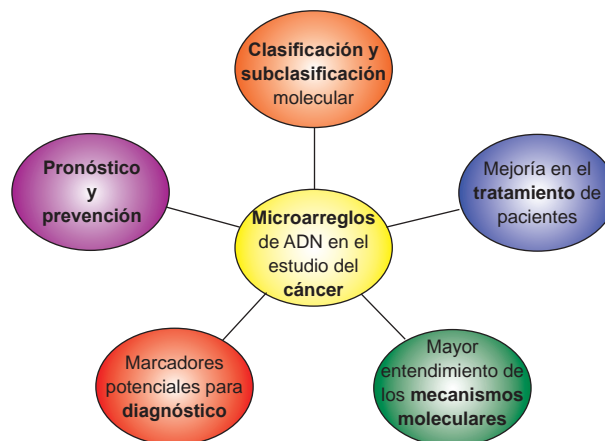


Figura 2. Ventajas de los microarreglos en el estudio del cáncer. Los microarreglos de ADN son una herramienta poderosa en la investigación de este padecimiento, ya que permiten obtener perfiles de expresión génica característicos para cada neoplasia. Dichas ventajas se reflejan en la investigación básica y clínica del cáncer.

terminado nuevas clasificaciones y subclasificaciones moleculares del cáncer, además de la predicción clínica y diagnóstico de varios tipos de neoplasias.⁶ También se han identificado nuevos marcadores potenciales para su terapia y el mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de la enfermedad.

Varios estudios demuestran el potencial de la tecnología de los microarreglos. Uno de los primeros trabajos fue la clasificación molecular de las leucemias agudas mediante un microarreglo de oligonucleótidos (de la empresa Affymetrix) que expresó 6,817 genes. En dicho estudio se identificaron 50 genes que distinguieron la leucemia mieloide aguda de la linfoblástica aguda. Posteriormente, se analizaron 34 muestras, sin previo conocimiento de su tipo (análisis no supervisado), con los 50 genes y los clasificaron con gran precisión en su tipo respectivo.⁷ La clasificación de leucemias, mediante perfiles de expresión, implica dificultades en determinar el diagnóstico preciso (fundamental para proporcionar un tratamiento efectivo).

Otros estudios de microarreglos se realizan en el linfoma (*diffuse large-B-cell lymphoma*), ya que los pacientes exhiben pronósticos y respuestas variables a las terapias. Una investigación de 96 muestras distintas (microarreglo de más de 18,000 clonas de ADNc) estableció el patrón de expresión génica de poco más de 100 genes. Dicho patrón clasificó la enfermedad en dos subtipos relacionados con el estado de diferenciación de las células B: uno similar a las células B germinales y otro similar a las células B activadas *in vitro*.⁸ Los dos subtipos mostraron fuerte correlación con la enfermedad clínica y el mejor pronóstico correspondió a las células B germinales. El tratamiento de elección para estos pacientes es la quimioterapia combinada con antraciclinas; cuando no tienen buen pronóstico se recomienda el trasplante de médula ósea. Por lo tanto, los perfiles de expresión génica determinan el pronóstico y tratamiento para cada paciente. Posteriormente, se validaron 240 muestras y se identificaron 17 genes para determinar el pronóstico.⁹ Otro laboratorio estudió el pronóstico de la misma enfermedad con varios tratamientos e identificaron dos grupos de pacientes con diferentes expectativas de vida a cinco años.¹⁰ Los investigadores encontraron que 72 y 12% de los casos tuvieron buen y mal pronóstico, respectivamente, y sólo utilizaron un predictor de 13 genes a partir de un estudio de 6,817 genes (Genechip). Los hallazgos más importantes fueron tres marcadores tumorales encontrados entre los 17 y 13 genes predictores utilizados en el laboratorio Affymetrix.

El cáncer de mama fue el mejor ejemplo de los perfiles de expresión génica para el pronóstico de una enfermedad. En esta investigación, un microarreglo de 25,000 oligonucleótidos y 78 muestras de tumores primarios de mama (obtenidos de pacientes con nódulos linfáticos negativos), identificó el indicador de mal pronóstico con tan sólo 70 genes. Este indicador o “firma” correspondió a la elevada probabilidad de llegar a padecer metástasis a corto plazo. El estudio demostró que los tumores no se hacen “buenos o malos” conforme progresa la enfermedad (como se proponía con el modelo del desarrollo clonal), sino que una célula maligna está predestinada para provocar la metástasis desde muy temprano. Con esta firma génica se decidió qué pacientes eran aptas para recibir la terapia complementaria con tamoxifeno.¹¹ El estudio

validó 217 muestras nuevas que confirmaron la utilidad de 70 genes para decidir si una paciente requería terapia complementaria o no.¹² En la actualidad, el público puede disponer de estos servicios de laboratorio; sin embargo, no se han aprobados oficialmente y su precio es alto.

MICROARREGLOS Y CÁNCER CERVICOUTERINO

El origen génico del cáncer cervicouterino se relaciona con la infección del virus del papiloma humano de alto riesgo (tipos 16 y 18). El genoma del virus se conforma de ocho oncogenes; dos de éstos codifican para oncoproteínas de expresión temprana (E6 y E7), que se unen e inhiben la activación de proteínas antioncogénicas TP53 y pRb, para desequilibrar la regulación entre proliferación y apoptosis, y estimular el progreso del cáncer. Estos desequilibrios se han estudiado desde el punto de vista transcripcional y mediante microarreglos, los cuales examinan muestras clínicas y líneas celulares del cáncer cervicouterino para el estudio de la carcinogénesis y de la terapia (figura 3).

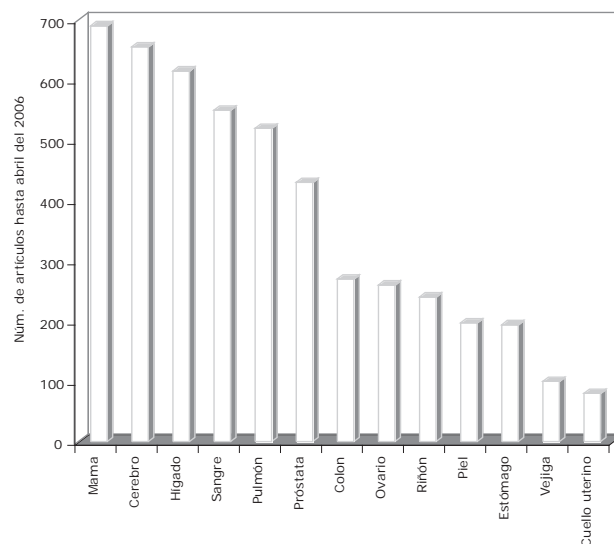


Figura 3. Los microarreglos en órganos y tejidos humanos. En la gráfica se indica el número estimado de artículos que reportan el uso de microarreglos en diversos tejidos y órganos (1999 hasta el 2006). La mayor parte de las investigaciones incluyen microarreglos de ADN para el estudio de las neoplasias.

Estudio de la carcinogénesis en líneas celulares

Uno de los eventos clave para padecer cáncer cervicouterino es la infección del virus del papiloma humano

de alto riesgo. Con la tecnología de los microarreglos se han evaluado los perfiles de expresión génica en líneas celulares y en cultivos primarios de queratinocitos humanos que contienen este tipo de virus.¹³⁻¹⁹ Estas investigaciones demuestran que el virus del papiloma de bajo riesgo, en comparación con el de alto riesgo, induce la sobreexpresión de mayor cantidad de genes del factor de crecimiento tumoral beta (TGF β) y no suprimen los genes inducibles por interferones. De esta manera, los genes de la familia TGF β funcionan como supresores tumorales a tiempos tempranos del desarrollo neoplásico y los interferones contrarrestan las infecciones virales a través del sistema inmunitario. Tales hallazgos explican la forma de eliminación del virus del papiloma de bajo riesgo en estado episomal (genoma en forma circular cerrada).

Otro evento importante es la integración de genomas virales en el genoma celular. En la integración del ADN viral se pierde la expresión de la proteína E2, la cual detiene la expresión de E6 y E7. En las líneas celulares se ha determinado el efecto global de la integración del genoma viral de varios subtipos del papiloma de alto riesgo.²⁰⁻²² Estas investigaciones comprueban que la integración del genoma viral es un paso crítico, ya que además de observarse alta inestabilidad cromosómica, se activan genes inducibles por interferones y se estimula la selección de dichas células. También se determinó que el efecto de la expresión de la proteína E2, en ciertas líneas celulares del cáncer cervicouterino,²³ induce envejecimiento celular o salida a la fase G0 de su ciclo.²⁴ Ya se identificaron los efectos de varias líneas celulares del cáncer cervicouterino positivo (VPH+) cuando se anula la expresión del gen E6AP (importante en la degradación de la proteína TP53 por E6).²⁵

Estos estudios identificaron cambios significativos en la expresión de varios genes, como: ciclinas, cinasas, oncogenes y antioncogenes.

Estudio de la carcinogénesis en muestras de pacientes

A partir de los microarreglos se han diseñado estrategias para determinar los genes alterados en el cáncer cervicouterino. Estos regímenes se enfocan en el progreso de las lesiones y en estudios comparativos entre lesiones de origen escamoso, glandular (o am-

bas) con tejido sano, para establecer su clasificación y subclasificación molecular mediante los perfiles de expresión génica.

En las primeras clasificaciones del cáncer cervicouterino se usaron microarreglos de 588 genes, cuya determinación resultó en un perfil de 18 genes expresados diferencialmente en el cáncer cervical escamoso. Algunos de éstos se relacionan con procesos de apoptosis y adhesión celular, y otros funcionan como factores de transcripción.²⁶ En una investigación de 10,000 genes se identificaron 40 que clasificaron 34 muestras de pacientes sanos y con tumores. Dicho estudio subclasificó 16 pacientes en grado tumoral I-B y II-B. Cuatro genes de esta subclasificación son indispensables como posibles marcadores tumorales.²⁷ En otro estudio de 1,276 genes, 10 muestras tumorales de origen escamoso y 20 muestras de neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (NIC3), demostraron que algunos genes agruparon muestras de NIC3 y señalaron una nueva subdivisión de lesiones precancerosas indistinguibles histológicamente.²⁸

La selección y caracterización de muestras tumorales implica diferencias significativas en la expresión de genes para tejidos de origen escamoso y glandular, ya sea en condiciones sanas o patológicas. Estas diferencias se producen por la actividad transcripcional de los genes expresados en los subtipos histológicos del cáncer; por lo tanto, se han realizado estudios con microarreglos que comparan las muestras sanas contra las muestras tumorales de origen escamoso²⁹⁻³¹ o glandular.³¹⁻³³ Un estudio de más de 40 muestras de cáncer cervicouterino invasor (positivo al virus del papiloma humano) identificó elevada carga de ADN relacionada con altos niveles de transcripción de E6 y E7 (pronóstico desfavorable), inestabilidad genómica y sobreexpresión de más de 100 genes.³⁴ Se han obtenido listas de genes que pueden ser importantes para el estudio molecular de este padecimiento.³⁵⁻³⁷

Otros ejemplos del potencial de los microarreglos se han demostrado mediante la citología vaginal (Papanicolaou). En el análisis comparativo de patrones de expresión génica, entre células epiteliales sanas y cancerosas (tomadas con un cepillo citológico), se identificaron algunos marcadores tumorales conocidos;³⁸ los estudios realizados con células exfoliadas comprobaron la posible determinación de perfiles de

expresión e identificación de marcadores tumorales para las lesiones de tipo NIC3.³⁹

MARCADORES TUMORALES EN EL CÁNCER CERVICOUTERINO

La información transcriptómica del cáncer cervicouterino puede utilizarse con lenguaje universal en distintos estudios; sin embargo, varias investigaciones de microarreglos, en particular los relacionados con el cuello uterino, no cuentan con datos estandarizados. Algunos han comparado los niveles de expresión génica en el cáncer cervicouterino y se han encontrado genes en común. Los genes reportados se relacionan de manera directa o indirecta con el progreso del cáncer cervicouterino; se han determinado con epigenomas del virus del papiloma de alto riesgo, en la expresión de oncoproteínas (E6 y E7) y en las lesiones precancerosas y cancerosas de origen escamoso y glandular con muestras sanas.

Marcadores tumorales con altos niveles de expresión en el cáncer cervicouterino

Se han estudiado varios genes activados en este tipo de cáncer mediante microarreglos. El inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas p16INK4a (CDKN2A) participa en el ciclo celular. Éste se definió como marcador tumoral en el desarrollo del cáncer cervicouterino y se encuentra sobreexpresado en las oncoproteínas E6 y E7 de líneas celulares *in vitro*,^{15,17} en muestras de pacientes *in vivo*³⁴ y cuando se comparan muestras tumorales con muestras sanas.^{30,34,35,38} Hace poco se comprobó que la proteína p16INK4a es más útil que

la determinación del virus del papiloma de alto riesgo en el diagnóstico citológico.⁴⁰

El gen “survivina” (BIRC5) interviene en la embriogénesis y en el cáncer (principalmente inhibe la apoptosis), pero su expresión no es detectable en tejidos adultos y sanos; dicho gen se sobreexpresa en los estudios de microarreglos (cuadro 1) y se propuso como marcador tumoral de proliferación cancerígena, con el cual se esperan prometedoras estrategias terapéuticas. Recientemente se señaló al gen MCM2, relacionado en la replicación del ADN, como marcador de diagnóstico y terapia en el cáncer cervicouterino. Hay otros genes con altos niveles de expresión en este tipo de cáncer (cuadro 1) que han permitido el desarrollo de estrategias de terapia dirigida, por ejemplo, contra la topoisomerasa 2α (TOP2A), ciclina B1 (CCNB1) y cinasa 1 tipo “polo” (PLK1).

Marcadores tumorales con bajos niveles de expresión en el cáncer cervicouterino

Uno de los genes de supresión tumoral es p21^{WAF1/CIP1} (CDKN1A), el cual interviene en la regulación negativa del ciclo celular mediante la inhibición de cinasas dependientes de ciclinas, en el envejecimiento y en la apoptosis dependiente e independiente de TP53. Cuando se degrada la fosfoproteína nuclear TP53 por la E6, o se inactiva por la PLK1, se reduce la transcripción de CDKN1A (cuadro 2). La baja expresión de p21 tiene pronóstico desfavorable en el adenocarcinoma cervical. Otro gen de interés es el SERPINB2, cuyo producto es un inhibidor de proteasas de tipo serina como activador del plasminógeno. La supresión de SERPINB2 se determina con microarreglos (cuadro 2)

Cuadro 1. Genes sobreexpresados en diversos estudios de microarreglos de ADN, relacionados con el cáncer cervicouterino

Gen	Símbolo	Proceso biológico	Referencias
Topoisomerasa 2α	TOP2A	Replicación del ADN	14, 15, 17, 23, 28, 31, 34, 35
Ciclina A2	CCNA2	Ciclo celular	14, 15, 17, 23, 28, 34, 35
Ciclina B1	CCNB1	Ciclo celular	14, 15, 17, 34, 35, 37
Inhibidor 2A de la cinasa dependiente de ciclina (p16)	CDKN2A	Ciclo celular	15, 17, 30, 34, 35, 38
Cinasa 1 tipo “polo” (<i>Drosophila</i>)	PLK1	Ciclo celular	14, 15, 22, 24, 34, 35
Survivina	BIRC5	Apoptosis	14, 15, 17, 34, 35
Mitotina	MCM2	Replicación del ADN	17, 24, 30, 34, 35
Cinasa 2 relacionada con NIMA (gen “a” nunca en mitosis)	NEK2	Ciclo celular	15, 17, 23, 34, 35
Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67	MKI67	Ciclo celular	17, 23, 53, 36
Factor de crecimiento vascular-endotelial	VEGF	Angiogénesis	10, 11, 23, 30

Cuadro 2. Genes con niveles de expresión suprimidos en varios estudios de microarreglos de ADN, relacionados con cáncer cervicouterino

Gen	Símbolo	Proceso biológico	Referencias
Inhibidor 1A de la cinasa dependiente de ciclina	CDKN1A	Ciclo celular	6-9,16-18
Fibronectina 1	FN1	Adhesión celular	7, 8, 11, 18, 28, 31
“Adorno 22 que contiene tripartitos”	TRIM22	Respuesta inmunitaria	6, 8, 9, 15, 18, 28
Antagonista al receptor de la interleucina 1	IL1RN	Respuesta inmunitaria	6, 9, 14, 23, 28
Proteína pequeña 1A “rica en prolina”	SPRR1A	Desarrollo epidermal	6, 9, 13, 23, 28
Tenascina C (hexabraquión)	TNC	Adhesión celular	9, 10, 15, 18, 28
Lipocalina 2	LCN2	Transporte celular	6, 8, 9, 28
Proteína de unión 6 al factor de crecimiento tipo insulínico	IGFBP6	Señalización celular	10, 23, 31
Queratina 4	KRT4	Diferenciación epitelial	9, 14, 23
Inhibidor de la peptidasa tipo “serpin” B2 (ovoalbúmina)	SERPINB2	Apoptosis	6, 14, 28

Cuadro 3. Genes con posible utilidad clínica para la diferenciación molecular entre carcinoma escamoso y adenocarcinoma, reportados mediante microarreglos de ADN

Gen	Símbolo	Proceso biológico	Referencia
Sobreexpresados en carcinoma escamoso respecto al adenocarcinoma			
Proteína de unión 2 al ácido retinoico	CRABP2	Desarrollo epidermal	26
Gen 1 regulado río abajo por N-myc	NDRG1	Diferenciación celular	26
Caderina 13 (H-caderina)	CDH13	Adhesión celular	25
Hormona similar a la paratiroidea	PTH1H	Desarrollo epidermal	25
Proteína pequeña 1B “rica en prolina” (cornifina)	SPRR1B	Desarrollo epidermal	26
Sobreexpresados en adenocarcinoma respecto al carcinoma escamoso			
Molécula de adhesión celular 1 relacionada con el antígeno carcinoembrionario	CEACAM1	Angiogénesis	25
Molécula de adhesión celular 5-7 relacionada con el antígeno carcinoembrionario	CEACAM5-7	Señalización celular	26
Receptor 1 a folatos	FOLR1	Transporte de folatos	25
Mesotelina	MSLN	Adhesión celular	26
Transductor de señales 1 relacionadas con tumores y calcio	TACSTD1	Señalización celular	26

y se ha demostrado que su expresión en HeLa estabiliza los niveles de expresión de la proteína Rb y suprime las oncoproteínas E6 y E7 del tipo 18 del papiloma humano. Por lo tanto, los niveles bajos de SERPINB2 favorecen la evolución del cáncer cervicouterino y pueden utilizarse como marcadores moleculares. Otro gen suprimido es IL1RN o receptor antagonista de la interleucina 1 (cuadro 2). Este gen participa en la respuesta inmunitaria y su polimorfismo es factor determinante para la evolución del cáncer.

Los genes que no se han reportado en este tipo de cáncer es el gen TRIM22 (“*tripartite motif-containing 22*”), el cual pertenece a una familia de proteínas antivirales, donde el miembro 22 inhibe la replicación del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH1). Esto sugiere que TRIM22 es relevante en la respuesta inmunitaria contra el virus del papiloma de alto riesgo (dichos virus pueden ser responsables de su

inhibición); el gen SPRR1A es importante en el complejo de diferenciación epidermal (CDE, localizado en la banda 21 del brazo largo del cromosoma 1) y puede utilizarse como marcador tumoral. Otro gen suprimido es IGFBP6, encargado de inactivar el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF2). Se ha demostrado que la activación de IGFBP6 reduce las características de tipo metastásico en las células tumorales de diversas causas.

Marcadores tumorales en el carcinoma escamoso y en el adenocarcinoma

Los genes útiles para diferenciar los subtipos histológicos del carcinoma escamoso y adenocarcinoma son CEACAM5 y TACSTD1 (cuadro 3). Éstos codifican proteínas transmembranales que transmiten señales para el desarrollo, motilidad y crecimiento celular. Se encuentran fuertemente sobreexpresados en el

adenocarcinoma. Una investigación determinó que los altos niveles de sus proteínas sirvieron como factor de pronóstico desfavorable en las pacientes con este padecimiento.³³ Otros genes encontrados son: 1) CRA-BP2 (pertenece al CDE y codifica para la proteína 2 de unión al ácido retinoico celular) que se sobreexpresa en el carcinoma escamoso;^{26,33} 2) NDRG1 regulado por el factor de transcripción N-myc (molécula implicada en el crecimiento y diferenciación celular), sobreexpresado en el carcinoma escamoso;³³ 3) miembros de la familia “*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*”, como CEACAM 1, 5, 6 y 7, se sobreexpresan en el adenocarcinoma;^{32,33} 4) el gen mesotelina (MSLN) codifica para una glucoproteína membranar relacionada con la adhesión celular; su expresión es baja en el tejido sano, pero alta en algunos tumores de origen glandular y en HeLa. En la actualidad, MSLN es blanco terapéutico en varias neoplasias. Está sobreexpresado en el adenocarcinoma³³ y en las muestras de carcinoma escamoso-adenocarcinoma relacionado con el virus 18 del papiloma humano;³⁴ y 5) los altos niveles de expresión de “FOLR1” (receptor a folatos) se relacionan con un fenotipo de adenocarcinoma³² y con la tumorigenicidad en la derivación de sus líneas celulares.⁴¹ Hacen falta estudios que demuestren la relevancia de este receptor, ya que FOLR1 y su ligando (ácido fólico) se puede unir fácilmente con fármacos y dirigirlos a las células que expresan altos niveles del receptor (células tumorales de varios tipos de cáncer).

CONCLUSIONES

La transcriptómica ha revelado algunos genes potencialmente importantes en la clínica del cáncer cervicouterino. Se requiere identificar marcadores génicos tumorales específicos de cada subtipo histológico para establecer los perfiles de expresión génica. Esto no sólo permitirá la subclasificación molecular del cáncer, sino el conocimiento de los tratamientos, según el “retrato molecular”, para mejorar la calidad de vida de la paciente. Gracias a la genómica y al desarrollo tecnológico, se diseñarán mejores fármacos que optimicen el cuidado médico de cada paciente, sin olvidar que el cáncer tiene una base genética muy compleja y que su entendimiento residirá en la formulación de

teorías predictivas a través de la bioinformática. Por esto, es importante reconocer a la biología *in silico* (creación de programas de cómputo), cuya meta es la integración de componentes relacionados con determinados fenotipos y modelar redes transcripcionales que identifiquen nuevas vías metabólicas y moleculares para el combate del cáncer. Esta nueva área se ha bautizado con el nombre de: “*Biología de sistemas*”.

En la actualidad hay alternativas para mejorar los programas de diagnóstico oportuno del cáncer cervicouterino; también se encuentran vacunas profilácticas muy efectivas para prevenir infecciones ocasionadas por el virus del papiloma humano; sin embargo, hasta que los programas de vigilancia y la aplicación de vacunas se optimicen, los índices de mortalidad generados por este padecimiento seguirán elevados. La tecnología genómica, particularmente la transcriptómica, es una de las mejores vías para entender y combatir la enfermedad que quita la vida cada dos horas a una mujer mexicana en edad productiva.

Agradecimientos

A Rodolfo Ocadiz, Luis Acevedo y John Quackenbush por su apoyo, sugerencias e ideas.

REFERENCIAS

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
2. Garcia-Carranca A, Gariglio PV. Molecular aspects of human papillomaviruses and their relation to uterine cervix cancer. *Rev Invest Clin* 1993;45:85-92.
3. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-45.
4. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-70.
5. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996;14:1675-80.
6. Wadlow R, Ramaswamy S. DNA microarrays in clinical cancer research. *Curr Mol Med* 2005;5:111-20.
7. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7.
8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, et al. Distinct types of diffuse B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
9. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*

- 2002;346:1937-47.
10. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002;8:68-74.
 11. Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
 12. Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
 13. Chang YE, Laiminis LA. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. *J Virol* 2000;74:4174-82.
 14. Nees M, Geoghegan JM, Munson P, Prabhu V, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* 2000;60:4289-98.
 15. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, et al. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001;75:4283-96.
 16. Duffy CL, Phillips SL, Klingelutz AJ. **Microarray analysis** identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology* 2003;314:196-205.
 17. Garner-Hamrick PA, Fostel JM, Chien WM, Banerjee NS, et al. Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system. *J Virol* 2004;78:9041-50.
 18. Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. Expression of human papillomavirus type E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene* 2004;23:2988-95.
 19. Thomas JT, Oh ST, Terhune SS, Laimins LA. Cellular changes induced by low-risk human papillomavirus type 11 in keratinocytes that stably maintain viral episomes. *J Virol* 2001;75:7564-71.
 20. Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, et al. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res* 2002;62:6959-65.
 21. Ruutu M, Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Transcriptional profiling of a human papillomavirus 33-positive squamous epithelial cell line which acquired a selective growth advantage after viral integration. *Int J Cancer* 2002;100:318-26.
 22. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, et al. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3822-7.
 23. Thierry F, Benotmane MA, Demeret C, Mori M, et al. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64:895-903.
 24. Wells SI, Aronow BJ, Wise TM, Williams SS, et al. Transcriptome signature of irreversible senescence in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7093-8.
 25. Kelley ML, Keiger KE, Lee CJ, Huibregtse JM. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *J Virol* 2005;79:3737-47.
 26. Shim C, Zhang W, Rhee CH, Lee JH. Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 1998;4:3045-50.
 27. Wong YF, Selvanayagam ZE, Wei N, Porter J, et al. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin Cancer Res* 2003;9:5486-92.
 28. Sopov I, Sorensen T, Magbagbeolu M, Jansen L, et al. Detection of cancer-related gene expression profiles in severe cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2004;112:33-43.
 29. Cheng Q, Lau WM, Tay SK, Chew SH, et al. Identification and characterization of genes involved in the carcinogenesis of human squamous cell cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2002;98:419-26.
 30. Wong YF, Cheung TH, Tsao GS, Lo KW, et al. Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer* 2006;118:2461-9.
 31. Chen Y, Miller C, Mosher R, Zhao X, et al. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res* 2003;63:1927-35.
 32. Fujimoto T, Nishikawa A, Iwasaki M, Akutagawa N, et al. Gene expression profiling in two morphologically different uterine cervical carcinoma cell lines derived from a single donor using a human cancer cDNA array. *Gynecol Oncol* 2004;93:446-53.
 33. Chao A, Wang TH, Lee YS, Hsueh S, et al. Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. *Int J Cancer* 2006;119:91-98.
 34. Rosty C, Scheffer M, Tsafirir D, Stransky S, et al. Identification of a proliferation gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene* 2005;24:7094-104.
 35. Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, et al. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 2005;331:269-91.
 36. Ahn WS, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, et al. Searching for pathogenic gene functions to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2004;93:41-48.
 37. Vazquez-Ortiz G, Ciudad CJ, Pina P, Vazquez K, et al. Gene identification by cDNA arrays in HPV-positive cervical cancer. *Arch Med Res* 2005;36:448-58.
 38. Hudelist G, Czerwenka K, Singer C, Pischinger K, et al. cDNA array analysis of cytobrush-collected normal and malignant cervical epithelial cells: a feasibility study. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;158:35-42.
 39. Steinau M, Lee DR, Rajeevan MS, Vernon SD, et al. Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 2005;6:64.
 40. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HG, et al. Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 2005;97:35-40.
 41. Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P, Zarbl H. A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis* 2004;25:47-59.