

Alteraciones cromosómicas en el cáncer del cuello uterino Chromosomal alterations in cervical cancer

Julia Molina
Cecilia Guzmán Bistoni
Vanessa Méndez
Eduardo Blasco- Olaetxea
Jorge García Tamayo

Resumen

Se señala la importancia del cáncer del cuello uterino en Venezuela destacando avances recientes en investigación utilizando nuevas tecnologías en particular en genética y biología molecular. Se revisan las alteraciones cromosómicas observadas en esta neoplasia y su estrecha relación con el virus del papiloma humano (VPH). Se describe como los oncogenes E6 y E7 del VPH pueden incidir sobre el ciclo celular y provocar inestabilidad cromosómica con pérdida de la heterocigosis, cambios estos que preceden la transformación y progreso de las clonas epiteliales neoplásicas.

Palabras Clave

Alteraciones cromosómicas, virus del papiloma humano (VPH), pérdida de heterocigosis, cáncer cervical.

Summary

The importance of cancer of the cervix uteri in Venezuela and recent research advances in genetics and molecular biology in this area is stressed. Chromosomal alterations and their relationship to human papilloma virus (HPV) are reviewed. The HPV oncoproteins E6 and E7 in the cell cycle leads to chromosomal instability with loss of heterozygosity, changes for progression and invasive carcinoma.

Key words

Chromosomal alterations, Human papillomavirus (HPV), loss of heterozygosity, cervical cancer.

Introducción

Estudios epidemiológicos realizados en Brasil, Colombia, México, Perú y Costa Rica, entre otros países, ratifican la importancia del cáncer del cuello uterino en Latinoamérica (1,2). En Venezuela, desde la década de los años cuarenta, el cáncer del cuello uterino es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. A pesar de algunas variaciones en la tendencia de la tasa de mortalidad que parecían haber mostrado un descenso en los 25 años anteriores a 1985, es preocupante el posterior repunte que se mantiene desde entonces y, el cáncer del cuello uterino, sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en la mujer venezolana. El cáncer cervical (CC) es responsable aproximadamente del 20% del total de las muertes por cáncer en Venezuela; los Estados Trujillo, Guárico, Yaracuy, Zulia, Lara, Aragua, Mérida, Táchira, Bolívar y Falcón son las entidades federales más afectadas por esta patología, con tasas de mortalidad superiores al promedio nacional. A pesar de que fue en Venezuela donde se describió inicialmente la presencia del virus del papiloma humano (VPH) en el cáncer cervical y algunos trabajos se



publicaron en los años 70 y 80 (3,4), llama la atención el hecho de que las investigaciones sobre esta neoplasia en nuestro país son prácticamente inexistentes. En este artículo, hemos querido actualizar algunos importantes conceptos relacionados con las alteraciones cromosómicas del epitelio cervical y la relación de las mismas con la infección por el VPH y la transformación neoplásica.

Aspectos Generales

La mayoría de los carcinomas del cuello uterino, se inician como alteraciones intraepiteliales por lo que, frecuentemente, existen en el epitelio cervical displásico y neoplásico lesiones sincrónicas y metacrónicas provocadas por la expansión clonal de células epiteliales transformadas. Ahora se sabe que en la transformación de las células del CC siempre han mediado eventos genéticos previos y, se conoce que ellos están asociados a la presencia del virus del papiloma humano (VPH), de manera que la importancia del VPH en la génesis de esta neoplasia señalada desde hace muchos años (3) es en la actualidad parte consustancial del proceso de carcinogénesis en el CC (5,6). Se ha demostrado por inmunohistoquímica y con el microscopio electrónico la presencia del virus y, se han tipificado por hibridación in situ los subtipos de VPH relacionados con el cáncer. Investigaciones recientes sobre la relación entre la infección por VPH y los genes supresores de tumores así como la expresión de sus proteínas, señalan la importancia de ampliar el conocimiento sobre la citogenética tumoral, conocer mejor la estructura de los genes involucrados en la aparición temprana del CC y su relación con los oncogenes del VPH (5,6).

Nuevas Tecnologías

Los métodos de estudio de citogenética han avanzado considerablemente y ahora es posible visualizar las secuencias de cada cromosoma utilizando técnicas accesibles, como la hibridación in situ con inmunofluorescencia (FISH)(7). Esta metodología, ha permitido avanzar perfeccionando otras técnicas de biología molecular y actualmente es posible establecer cuales son los eventos iniciales de la transformación de las células del epitelio del cuello uterino durante la carcinogénesis. El desarrollo de la hibridación genética comparada (CGH) y la posibilidad de hacer los llamados cariotipos espectrales (SKY) con M-FISH constituye una poderosa arma para la investigación (7,8). Con FISH se identifican sitios específicos y regiones precisas en los genes de los tumores sólidos, de manera que se pueden marcar secuencias repetitivas, como telómeros y centrómeros, o se pueden marcar cromosomas enteros con sus bandas, o sus brazos y si se hace CGH, se pueden comparar genes enteros. La CGH es una técnica cuantitativa que permite comparar las copias de regiones genómicas de controles, logrados por extracción del ADN de células cariotípicamente normales, con el ADN de las muestras que se examinan que pueden provenir de tumores. Algunas de las ventajas de estas técnicas para el examen de los eventos tempranos de la transformación neoplásica se pueden sumar a las que ofrece el cariotipo espectral (SKY) ya que este, genera un cariotipo codificado por colores y al combinar SKY con las técnicas antes mencionadas y con técnicas sencillas de bandedo, se pueden detectar con facilidad las anomalías cromosómicas. Para el SKY se hibridizan simultáneamente los 24 cromosomas usando sondas pintadas con suspensiones preparadas con el ADN de diferentes líneas celulares; cada cromosoma es amplificado por una reacción PCR con un oligoprimero, para luego marcarlos con una combinación de fluorocromos hasta detectar 31 variantes de colores; los avances que se han producido en los fluorocromos y sus conjugaciones con algunos nucleótidos, así como los adelantos en instrumentos



y equipos para fotodetección como los tubos fotomultiplicadores, permite que los fluorocromos se exciten con luz emitida por una lámpara de xenon pasando a través de una triple banda de fibra óptica y las imágenes espectrales de SKY son obtenidas usando un interferómetro conectado con una cámara digital (8,9). Estos avances tecnológicos han logrado incrementar la sensibilidad de FISH. La aplicación de m-FISH y de SKY permite hibridizar y diferenciar los cromosomas con marcadores de diferentes colores, para detectar aberraciones estructurales y numéricas en ellos (10). La posibilidad de combinar m-FISH con SKY y con CGH permite conocer en detalle todos los estadios que se dan en la aparición de las alteraciones cromosómicas en células tumorales y es una poderosa herramienta para investigar el proceso de transformación neoplásica en el CC.

Cambios Cromosómicos

El CC va precedido de estadios de transformación celular los cuales desde hace muchos años han sido designados como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (11). La relación de NIC con el VPH está bien establecida (1,2, 3, 5, 6). En realidad, se ha descrito gran variedad de alteraciones cromosómicas en las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino, la mayoría de las veces caracterizadas por pérdida de regiones cromosómicas específicas en las cuales posiblemente se encuentran ubicados ciertos genes supresores de tumores (12). Hace varios años se describieron aneusomías cromosómicas en NIC y en el CC (13), y se sabía que éstas afectaban particularmente a los cromosomas 3, 7 y X (14). Investigaciones posteriores han enfatizado la relación entre éstas alteraciones de los centrosomas cromosómicos y la inestabilidad genética, se describió la presencia de aneusomías en el cromosoma 1, de micronúcleos, y de cromosomas ectópicos en casos de NIC (15). Estos cambios cromosómicos, se asociaron con la infección por el VPH (14,15, 16, 17,18). La mayoría de las alteraciones, se han encontrado en los brazos de los cromosomas 3p, 4p, 5, 6, 11q y 17p, y estos cambios conllevan a un fenómeno que es crucial en el proceso de transformación maligna, la pérdida de la heterocigosis (LOH) (19 - 24). En los epitelios plano-estratificados, los estudios del fenómeno LOH en la carcinogénesis temprana señalan que el cromosoma más frecuentemente implicado es 3p (24,25). En el carcinoma broncogénico pulmonar cuyo desarrollo es, como el del CC, paulatino, luego de un proceso de metaplasia promovido en el epitelio respiratorio por la acción del cigarrillo, se han descrito igualmente pérdidas alélicas en el cromosoma 3 (26,27). Los cambios genéticos más frecuentes inductores de inestabilidad cromosómica con LOH, en los tumores epiteliales y, en particular en el CC, se caracterizan por mutaciones en oncogenes y en genes supresores de sus promotores así como en la expresión aberrante de genes relacionados con el control de la proliferación celular. En el CC existen regiones que seguramente albergan genes supresores de tumores por lo cual es evidente que de conocer la importancia de éstas dependerá la posible detección de los mismos en las etapas tempranas de la carcinogénesis. Se ha descrito la presencia de LOH en lesiones de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) en los brazos cortos de los cromosomas 3 y 6, y en los brazos largos del cromosoma 11; además de 3p y 6p, se puede ver LOH en 6q, 17p y 18q y) y en casos de displasia severa y de carcinoma invasor (28), se han descrito ganancias en el brazo largo del cromosoma 3 (3q). Estudios sobre los cromosomas de CC con FISH han permitido relacionar las aberraciones del cromosoma 3 con alteraciones de los cromosomas 7 y X, durante la infección con VPH, tanto en casos de cáncer invasor como en las metástasis en ganglios linfáticos (14). Se han identificado transcripciones anormales del gen de la triada histidina-frágil (FHIT), 3p 14.2 que se ubica en el brazo corto del cromosoma 3 (3p 13 – 21.1) y en el cual se han demostrado con



cierta frecuencia deleciones alélicas en el CC, llegando hasta un 68% de transcripciones aberrantes del gen *FHIT* (29). Más recientemente se ha señalado que la incidencia de la expresión aberrante del gen *FHIT* no está relacionada con la malignidad ni con la progresión del CC, pero se sabe que corresponde a un evento temprano en la transformación maligna de las células cervicales (30,31).

Si se desglosan las alteraciones cromosómicas en las distintas fases del CC, podríamos señalar que en NIC se ve LOH en 3p, 5p y 5q, 6p y 6q, 11q, 13q y 17p; en el carcinoma invasor se ve LOH en 3p, 6p y 6q, 11q, 17p y 18q; y que en las metástasis ganglionares se observa LOH en 3p, 6p, 11q, 17p, 18q y en el cromosoma X. En conocimiento de que todos estos eventos se inician con el fenómeno denominado inestabilidad cromosómica, es importante señalar que al menos en la mitad de los casos de NIC de bajo grado, es posible detectar alteraciones de genes supresores en 6p, las cuales se ponen en evidencia en el 90% de los casos de NIC de alto grado (32). Esta LOH en el brazo corto del cromosoma 6 (6p), ha llevado a proponer la existencia en este segmento de importantes genes supresores los cuales ya habían sido señalados por estudios en alelos de 6p 23 y de 6p 21.3 (21,33).

El Virus del Papiloma Humano

Se sabe que existen más de un centenar de subtipos de este virus y que de ellos, al menos 20 son capaces de provocar alteraciones del epitelio cervical. Se ha acordado dividir los subtipos de VPH en dos categorías, de bajo y de alto riesgo; los subtipos 6 y 11 son de riesgo bajo, y los subtipos 16 y 18 son conocidos como VPH de alto riesgo (6). Se sabe que el VPH es un virus ADN de doble cadena circular con 6 genes tempranos (E) que regulan la replicación viral y 2 genes tardíos (L). También se sabe que en los oncogenes E6 y E7 presentes en el genoma del VPH reside la potencialidad neoplásica de los diferentes subtipos virales. Las oncoproteínas que codifican estos genes E6 y E7 se unen a proteínas reguladoras del huésped, especialmente, a proteínas de genes supresores de tumores, como la p53, que es degradada por E6 y a la proteína del gen del retinoblastoma (Rb) cuya fosforilación es inactivada por E7. En la actualidad se sabe que las infecciones con ciertos tipos de virus papilomas, como el 16, 18, 31, 33, 35 y 45 son necesarias para que las lesiones de NIC progresen hacia el carcinoma del cuello uterino (34, 35) y no obstante, para que las células infectadas se transformen tienen que producirse cambios genéticos muy puntuales (36,37). Utilizando CGH en biopsias, se sabe que la anomalía más frecuente en el CC es la ganancia de 1q y 3q y, como ya señalamos, estos cambios son simultáneos a la LOH en más de 11 brazos de distintos cromosomas (38). Hallazgos comentados (27) y estudios más recientes, coinciden en señalar por CGH, que las ganancias del brazo largo del cromosoma 3 (3q) es la aberración más consistentemente detectada en el 10 al 35% de las lesiones preinvasivas y en el 72 al 90% de los carcinomas cervicales, se pueden demostrar que las alteraciones se dan en los sitios del epitelio cervical donde se encuentran integrados los tipos de VPH de alto riesgo(14). Otros investigadores además de pérdidas de los brazos del cromosoma 3p (23,25) han señalado alteraciones en 4p y 4q desde un 40 a 90% en casos de carcinoma cervical invasivo (39, 40) y recientemente se ha señalado la predominancia de 4q34-q35 y de 4q25-q26 en los carcinomas invasivos del cervix sobre 4p15.3 cuyas pérdidas alélicas son más evidentes en los adenocarcinomas (41). Algunos estudios también han demostrado como tempranamente se produce en el CC la pérdida de genes en el cromosoma 10, en particular en su brazo largo (10q) (42). Con FISH y SKY se han descrito en cultivos celulares los puntos de ruptura que provocan la translocación en 10q tanto en 10p11.2 en células cultivadas CamCell3 y CaSki, como en 10q11.2 en



células Cam Cell4 y SiHa (43). Si regresamos a los cromosomas 1 y 3 que son los más afectados en el CC, vemos que los estudios de las alteraciones del cromosoma 1 han demostrado como en las lesiones de NIC1 cuando aparecen tetraploidías de este cromosoma es porque están las células del epitelio infectadas con VPH de alto riesgo (44), lo cual sugirió a los autores que la inestabilidad cromosómica debe ser un mecanismo relacionado con el tipo de VPH, de bajo o de alto riesgo. Esta hipótesis se apoya en el hecho comprobado, que son las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo las que más se relacionan con p53 y con el gen del retinoblastoma (Rb) los cuales llevan a la hiperproliferación, inmortalización e inestabilidad genética del epitelio cervical, y conducen a la malignización si se comparan con las de los tipos de VPH de bajo riesgo (45). Precisamente el efecto de la inactivación en los genes del epitelio cervical se ha investigado a través de la expresión de p16, una proteína que se sobreexpresa al producirse la inactivación de Rb por la proteína E7 del VPH. Hoy en día se considera que p16, la Ciclina D1 y Ki 67 pueden ser marcadores biológicos complementarios que ayudan a examinar la relación de VPH con la capacidad de invasión inicial del CC. Utilizando la inmunohistoquímica hemos investigado sobre esta situación en el CC y algunos resultados previos han sido remitidos a eventos internacionales. En trabajos de investigación en curso, estamos planteando el papel que pueden jugar las glicoproteínas de membrana en y p16 en el comportamiento biológico del epitelio cervical.

Como una conclusión de todos estos hallazgos, es evidente que las alteraciones de los genes supresores de tumores en el CC preceden los eventos de aparición de clonas transformadas y la progresión de las mismas. Todo parece señalar que el examen de aspectos relacionados con la genética del carcinoma cervical en sus etapas iniciales y sus relaciones con la infección por el VPH debe ser abordado utilizando técnicas de Biología Molecular. Este artículo de revisión realizado con la colaboración de nuestro equipo de investigación, tiene como objetivo llamar la atención sobre la necesidad de hacer investigación en oncopatología orientando los esfuerzos hacia la aplicación de los recursos tecnológicos modernos más adecuados para el estudio de nuestros graves problemas de salud pública.



Referencias

- 1- **Muñoz N y col.** 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England J Med* 348: 518 – 522.
- 2- **Mohar A y col.** Epidemiología descriptiva del cáncer cérvicouterino. Instituto Nacional de Cancerología 1985-1991. *Rev Inst Nac Cancerol (Méx)* 1993; 39: 1849-1853
- 3- **García Tamayo J, Nuñez Montiel JT.** 1978. Investigación con el microscopio electrónico sobre la papilomatosis cérvico-vaginal. *Acta Med Ven*, 25: 132- 138.
- 4- **Molina Vilchez R.** 1966, Venezolanos en la historia de las lesiones cervico-uterinas por papovavirus. *Rev Ven Obst & Ginecol* 56: 57 – 58.
- 5- **Von Knebel Doeberitz M.**2002. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 38: 2229 - 2242.
- 6- **Zur Hausen H.** 2002. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2: 342 – 350.
- 7- **Kallioniemi, A y col.** 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258: 818 - 821,
- 8- **Liyanage M y col.** 1996. Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet*, 14: 312 – 315.
- 9- **Schr-ck, E y col.** 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273: 444 - 497.
- 10- **Jentsch I y col.** 2001. Karyotyping mouse chromosomes by multiplex-FISH (M- FISH). *Chromosome Res*, 9: 211 - 214.
- 11- **Crum CP.** 2000. Cotemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host and the stem cell. *Modern Pathol* 13: 243 – 251.
- 12- **Atkin NB.** 1997. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: a review. *Cancer Genet Cytogenet* 95:33 -39.
- 13- **Bulten J y col.** 1998. Interphase cytogenetic analysis of cervical intraepithelial neoplasm. *Am J Pathol* 152: 325 – 327.
- 14- **Mian C y col.** 1999. Fluorescence in situ in cervical smears: detection of numerical aberrations of chromosomes 7,3 and X and relationship to HPV infection. *Gynecol Oncol* 75: 41 – 46.
- 15- **Bulten J y col.** 2002,. Numerical aberrations of chromosome 1 in cervical intraepithelial neoplasia are strongly associated with infection with high-risk human papillomavirus types. *J Pathol* 198: 300 – 309.
- 16- **Skydelrg B y col.** 2001. Human papillomavirus infection, centrosome aberration and genetic stability in cervical lesions. *Modern Pathol* 14: 279 –284.
- 17- **Leal-Garza CH y col.** 2002. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from woman with and without cervical uterine cancer. *Mutat Res* 519: 211 –212.
- 18- **Furuta R y col.** 2003. Ectopic chromosome around centrosome in metaphase cells as a marker of high-risk human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 106: 167 – 171.
- 19- **Mitra AB, y col.** 1994, Allelotype análisis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 54:4481- 4487.
- 20- **Mullokkandov MR y col.** 1996. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosomes heterozygosity and human papillomavirus tumor status. *Cancer Res* 56:197 – 205.



- 21- **Kisseljov F y col.** 1996. Inestability of chromosome 6 microsatellite repeats in human cervical tumors carrying papillomavirus sequences. *Int J Cancer* 69: 448 - 487.
- 22- **Hapmton GM y col.** 1966. Simultaneous assesments of loss of heterocygozity at multiple microsatellite loci using semiautomated fluorescent-based detection; subregional mapping of chromosomes 4 in cervical carcinoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 93: 6704 – 6709.
- 23- **Kersemaekers AMF y col.** 1998. Loss of heterocygocity for defined regions on chromosomes 3, 11 and 17 in carcinoma of the uterine cervix. *Brit J Cancer* 77: 192 – 200.
- 24- **Roz L y col.** 1996. Allelic imbalance on chromosome 3p in oral dysplastic lesions: at early events in oral carcinogenesis. *Cancer Res* 56: 1228 –1231.
- 25- **Witsuba II y col,** 1997. Deletions of chromosome 3p are frecuente and early events in the patogenesis of uterine caervical carcinoma. *Cancer Res* 57: 3254- 3158.
- 26- **Helfritzsch H y col.** 2002. Differentiation of positive autofluorescence bronchoscopy findings by comparative genomic hybridization. *Oncol Resp* 9: 697 – 701.
- 27- **Park IW y col.** 1999, Multiple clonal abnormalities in the bronchial epithelium of patients with lung cancer. *J Nat Cancer Inst* 91: 1863 – 1868.
- 28- **Heselmeyer K y col.** 1997. Advanced-stages cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genet Chromosomes Cancer* 19: 233 – 240.
- 29- **Muller CY y col.** 1998. Abnormalities of fragile histidine triad genomic and complementary DNA's in cervical cancer. *J Nat cancer Inst* 90: 433 – 439.
- 30- **Su TH y col.** 1998. Analysis of *FHIT* transcripts in cervical and endometrial cancers. *Int J Cancer* 76: 216 – 222.
- 31- **Yoshino K y col.** 2000. FHIT alterations in cancerous and non cancerous epithelium. *Int J Cancer* 85: 6 – 11.
- 32- **Chatterjee A,y col.** 2001. Mapping of the sites of putative tumor supressor genes at 6p25 and 6p21.3 in cervical carcinomas: occurrence of allelic delations on precancerous lesions. *Cancer Res* 61:2119 – 2123.
- 33- **Karsemaekers AM y col.** 1998, Allelic loss and prognosis in cancer of the uterine cervix. *Int J Cancer* 79: 411-4173
- 34- **Karsemaekers AM y col.** 1999. Genetic alterations during the progresión of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Genes Chrom Cancer*, 26:346-354
- 35- **Liaw KL y col.** 1999. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Nat Cancer Inst* 91: 954 – 960.
- 36- **Walboomers JM y col.**1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12 – 19.
- 37- **Schiffman MH, Brinton LA.** 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 76: 1888 – 1901.
- 38- **Witsuba I y col.** 1997, Deletions of chromosome 3p are frequent and early events of uterine cervical carcinoma. *Cancer Res* 57:1228-1231.
- 39- **Sherwood JB y col.** 2000. Chromosome 4 delations are frequent in invasive cervical cancer end differ between histologic variants. *Gynecol Oncol* 79: 90 –96.
- 40- **Backsch C y col.** 2005. A region of human chromosome 4 (q35.1-qter) induces senescence in cell hybrids and is involved in cervical carcinogenesis.*Genes Chromosomes & Cancer* 43: 260 – 272.



- 41- **Busby-Earle RMC y col.** 1993, Cervical carcinoma: low frequency of allele loss at loci implicated in other common malignancies. Br J Cancer 67: 71 –75.
- 42- **Solinas-Toldo S y col.** 1997. Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progresión toward immortality. Proc Nat Acad Sci USA 94: 3854 – 3859.
- 43- **Cottage A y col.** 2001. Early Genetic events in HPV immortalized keratinocytes. Genes Chromosomes & Cancer 30: 72 – 79.
- 44- **Southern SA y col.**1997, Basal tetrasomy in low-grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with high-risk papillomavirus. Cancer Res 57: 4210 – 4213.
- 45- **Barbosa MS y col.** 1991. In Vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomavirus of different oncogenic potencial. J Virol 65: 292 -330.
- 46- **Munger K.** 1995. The molecular biology of cervical cancer. J Cell Biochem Suppl 23: 55 – 60.

