



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

ANALISIS MOLECULAR DE INSERCIONES DEL VIRUS
PAPILOMA HUMANO (VPH) EN EL ONCOGENE *c-myc*
DE TUMORES CERVICO-UTERINOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LUIS MARAT ALVAREZ SALAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis padres Consuelo y Luis por su apoyo y confianza que espero no haber defraudado, ni defraudar aún en estos tiempos difíciles.

A la memoria de mi abuelo Angel, y mi abuelita Consuelo siempre un ejemplo a seguir.

A todos aquellos que como yo, vivimos, luchamos y triunfamos en un mundo que no comprendemos y que no nos comprende.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Patricio Gariglio V. el permitirme realizar este trabajo en laboratorio a su cargo en el CINVESTAV-IPN. Al M. en C. Aurelio Díaz por su valiosa asesoría voluntaria y compañerismo, cualidades poco comunes este lugar. A los Biólogos Víctor Llaca y Erwin Silva y al P. de B. Efraín Garrido por su apoyo en los momentos difíciles del proyecto y los buenos momentos que pasamos en el laboratorio.

INDICE

INDICE	1
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
Oncogenes y Cáncer	4
Biología Molecular de c-myc	5
c-myc en Cáncer Humano	11
Papilomavirus y Cáncer	12
Biología Molecular de los Papilomavirus	13
Cáncer Cérvico-Uterino en México	19
MATERIAL Y METODOS	23
Electroforesis en Gel de Agarosa	26
Electroforesis en Geles de Acrilamida	29
Transferencia de ADN a Soportes Sólidos	30
Marcaje de ADN por "Nick Translation"	31
Hibridización en Fase Sólida	32
Marcaje de ADN por los Extremos 3'-OH	33
Elución de ADN de Geles	34
Extracción de ADN Plasmídico	36
Clonación Molecular en Plásmidos	38
Preparación de Células Competentes	38
Transformación Bacteriana	39
Minipreparación de ADN Plasmídico	40
Secuenciación	41
RESULTADOS	43

DISCUSSION	67
GLOSARIO	72
APENDICE	73
BIBLIOGRAFIA	78

ABREVIATURAS

- ADN = Acido 2'-Deoxirribonucleico
- amp = Ampicilina
- ARNm = Acido Ribonucleico Mensajero
- ARNt = Acido Ribonucleico de Transferencia
- ATP = Adenosina-5'-trifosfato
- BSA = Albumina Serica Bovina (Fracción Pentax)
- CaU = Cáncer Cérvico-Uterino
- dNTP = 2'-Deoxinucleótido-5'-tri-Fosfato
- ddNTP = 2',3'-diDeoxinucleótido-5'-tri-Fosfato
- DTT = Ditiotreitól
- ERE = Elemento Responsivo a E2 (E2 Responsive Element)
- EDTA = Etildiaminotetraacetato diSódico
- GE = Glucosa-Tris-EDTA
- IPTG = Isopropil- β -D-tiogalactopiranosida
- LCR = Región Control de los Papilomavirus (Long Control Region)
- LMP = Bajo Punto de Fusión (Low Melting Point)
- ORF = Marco de Lectura Abierta (Open Reading Frame)
- ori = Origen de replicación
- pCMT = Plésmidos derivados de Tumor Cérvico-Uterino
- Pu = Purinas
- Py = Pirimidinas
- TE = Tris-EDTA
- TEMED = N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
- tet = Tetraciclina

Tris-EDTA = Tris(hidroximetil)Aminometano

SDS = Dodecil Sulfato de Sodio

SSC = Solución Salina Citrato

TBE = Tris-Borato-EDTA

BPV = Papilomavirus bovino

HPV = Papilomavirus humano

Yco1 = 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosida

RESUMEN

Las regiones correspondientes al exon I de c-myc y el LCR del papilomavirus humano tipo 16 (VPH 16), se encontraron adyacentes en ADN proveniente de un tumor cérvico-uterino en etapa avanzada (IIB), sugiriendo un posible efecto sinérgico de c-myc y VPH 16 para el desarrollo del mismo. La evidencia de restricción y secuenciación llevó a la postulación de dos modelos hipotéticos de integración y transformación celular mediada por virus como probable causa de carcinogénesis genital.

INTRODUCCION

El cáncer, uno de los padecimientos más extendidos y menos comprendidos que amenazan a la humanidad, se caracteriza por la presencia multifactorial de agentes medioambientales y genéticos que desembocan en la pérdida de la regulación metabólica y reproductiva de las células que son sus víctimas.

A nivel molecular, dos de los más interesantes factores que intervienen en la carcinogénesis son los oncogenes y los virus.

ONCOGENES Y CANCER

Los oncogenes, versiones alteradas de un grupo de genes conocidos como protooncogenes, son una de las principales causas del desarrollo de un proceso tumoral dado que se les encuentra asociados a una serie de malignidades como linfomas, leucemias, neuroblastomas, cáncer de pulmón, cérvico-uterino y otras (Revisado en Nishimura y Sekiya, 1987). Este hecho, aunado a la alta conservación evolutiva que poseen (Sheiness, 1980), hace suponer que la función o funciones de los protooncogenes son de vital importancia para la célula.

Dichas funciones se encuentran directamente asociadas a la actividad reproductiva de la célula, ya sea como receptores a factores de crecimiento (erb-B, fms), receptores hormonales (erb-A) y factores de crecimiento (sis); o bien, se

encuentran como tirosina cinasas que, al parecer, son enzimas relacionadas con la regulación reproductiva de la célula (yes, src, fes/ fps, abl) (Revisado en Alitalo, 1987; Nishimura y Sekiya, 1987). Sin embargo, dos protooncogenes parecen jugar un papel mayúsculo en el control y desarrollo de la reproducción y diferenciación celular, ya que son los que se presentan frecuentemente alterados en malignidades y su conservación evolutiva es relativamente alta entre los protooncogenes (Persson, 1984; Ralston, 1984). Conocidos como myc y ras, estos dos protooncogenes parecen quedar en algún eslabón central en la cadena de sucesos que llevan a la proliferación y diferenciación celular en respuesta a un estímulo molecular externo, en consecuencia, alguna alteración en su regulación o en su conformación llevará a la célula al caos metabólico y reproductivo (Revisado en Nishimura y Sekiya, 1987).

BIOLOGIA MOLECULAR DE c-myc

En referencia especial a c-myc, sabemos que se trata de una fosfoproteína nuclear de un peso molecular que oscila entre 49 y 65 kDa, esto dado a que se trata de una molécula muy inestable y no ha sido posible determinar certeramente sus características (Hann, 1984; Miyamoto, 1985; Ramsay, 1984; Watt, 1985). Sin embargo, se han podido establecer cuatro regiones dentro de la proteína myc, dos de las cuales (II y IV) son cruciales para la actividad transformante y cotransformante de este oncogene, a más

de ser responsables de la localización nuclear de myc (Stone, 1987).

Estudios recientes han determinado que la posible función de myc en el metabolismo celular sea el de la promoción de la replicación del ADN celular, dado a que sus niveles de ARN mensajero (ARNm) aumentan con la estimulación de mitógenos o factores de crecimiento a células en cultivo (Broome, 1987; Kindy, 1987; Nepveu, 1987), y la unión de su proteína a secuencias de replicación autónoma en el genoma celular (Iguchi-Ariga, 1987). Estos hechos, aunados a la actividad transformante de myc (Hayward, 1983) y a su frecuente alteración en procesos tumorales (Sakaguchi, 1983), dejan entrever que una falla en la regulación o en la conformación de myc puede desembocar en la oncogénesis.

De esta forma, el producto de myc debe estar sujeto a una fuerte regulación, y numerosos estudios han llevado a la descripción de toda una serie de características particulares de este protooncogene a nivel molecular, las que dejan entrever la regulación especialmente compleja de este oncogene. Myc fué inicialmente descrito como el oncogene, v-myc, del virus de la mielocitomatosis aviar (VMA) MC-29 (Alessandra, 1982; Revisado en Hayward, 1983), y se encontró a su homólogo celular, c-myc, (Alessandra, 1982; Sheiness, 1980) como una secuencia de alrededor de 8000 pares de bases (pb) constituido de tres exones y dos intrones largos (Gazin, 1984) (Ver figura 1); sin embargo, solo los exones II y III codifican para el producto protéico, dejando al exon I un posible papel en la propia

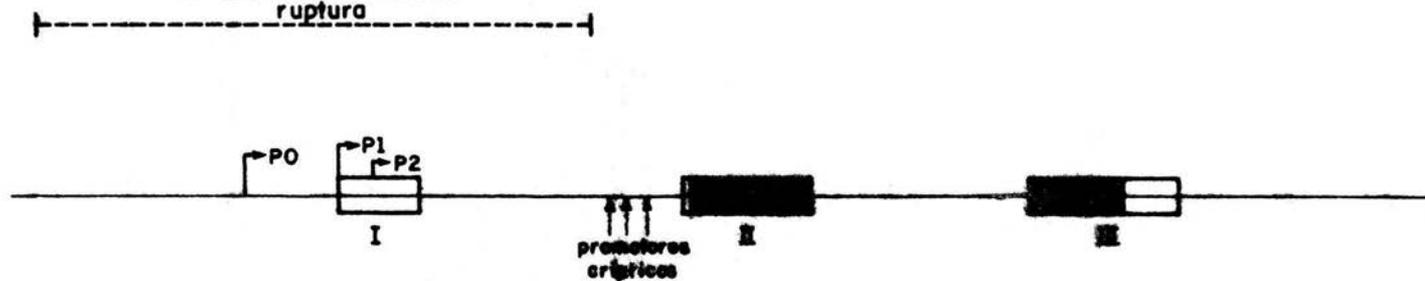
regulación de myc (Gazin 1984), o bien la producción de otro péptido (Gazin, 1986). Esto dado a que es en su porción 5' donde se encuentran los promotores (P0, P1 y P2) desde los cuales se transcribe myc, y presenta un patrón de transcripción que sugiere la existencia de una señal de pausa transcripcional que promueve una mayor producción de ARNm del exon I que de los otros dos exones en células quiescentes (Nepveu, 1987), cuestión que cambia cuando las células son estimuladas con factores de crecimiento o inductores de diferenciación, en donde esta relación cambia a una mayor cantidad de transcritos de la región traducida. Además, c-myc posee una serie de promotores crípticos ubicados dentro del primer intron (Ver figura 1) desde los cuales se transcribe myc cuando pierde el exon I (Eick, 1985; Hayday, 1984) y tiene secuencias palindrómicas (repetidos invertidos) entre el exon I y el exon II (Revisado en Alitalo, 1987; Gariglio, 1987a).

Estos hechos, han llevado a la elaboración de una serie de modelos de regulación de c-myc (Gariglio, 1987a; Leder, 1983; Saito, 1983), en los cuales se hace resaltar la posible existencia de elementos regulatorios aún no descritos para eucariotes (Gariglio, 1987a), o bien una intrincada red regulatoria en la cual intervienen productos de otros protooncogenes y proteínas regulatorias celulares.

El ARNm de c-myc tiene un tamaño alrededor de los 2300 pb (Eick, 1985; Hayday, 1984), es inestable, su vida media es calculada en alrededor de 10 a 20 minutos en células diferenciadas (Eick, 1985), y al parecer alcanza una mayor

Fig. 1. Estructura del protooncogene c-myc (Gazin, 1984; Altalo, 1987). Los rectángulos representan los exones (en números romanos). Las porciones negras las regiones traducidas y la línea continua los intrones. P0, P1 y P2, señalan la posición de los promotores. La línea punteada indica el área que abarcan la mayoría de los sitios de ruptura en translocaciones. Las flechas indican la ubicación de los promotores crípticos.

Localización de sitios de
ruptura



c-myc humano

1 KB

estabilidad si carece del exón I (Eick, 1985; Leder, 1983; Rabitts, 1985). Los promotores P1 y P2 son diferencialmente usados en diferentes tejidos y con diferentes mitógenos (Broome, 1987; Stewart, 1984;), además se sugieren diferentes rutas de activación de c-myc de acuerdo al estímulo químico empleado (Nepveu, 1987). La regulación de myc parece encontrarse tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Dony, 1985; Gariglio, 1987a; Nepveu, 1987), y la posible acción de elementos regulatorios activadores y represores se hace evidente en la acumulación de ARNm de c-myc con la estimulación de factores de crecimiento (Interleucina II, PDGF, EGF, suero fetal, etc.), y con el tratamiento con inhibidores de la síntesis proteica (cicloheximida) (Broome, 1987; Nepveu, 1987 y Revisado en Gariglio, 1987a). Una característica singular de myc es el hecho de que al parecer, sus dos cadenas de ADN son transcritas, tanto en condiciones normales como en células neoplásicas, y cada una posee una diferente regulación (Kindy, 1987; Nepveu, 1987), no obstante la cadena sin sentido parece transcribirse constitutivamente sin verse tan drásticamente afectada por los estímulos de proliferación como la cadena con sentido (Nepveu, 1987).

c-myc EN CANCER HUMANO

En un buen número de malignidades (leucemias (Collins, 1982), linfomas (Revisado por Haluska, 1987), cáncer de pulmón (Little, 1983), cáncer de colon (Rabitts, 1985)), myc se encuentra alterado. Estas alteraciones se ubican entre las amplificaciones génicas, inserciones virales y translocaciones cromosomales. Estas últimas son las mejor estudiadas, dado al mantenimiento de líneas celulares derivadas de padecimientos como el linfoma de Burkitt y ciertas leucemias (Revisado por Alitalo, 1987; Haluska, 1987 y Nishimura, 1987); en donde se ha encontrado que las translocaciones rompen a c-myc en sitios cercanos al exon I (Ver figura 1), lo que pondría a la región traducida de myc (Exon II y III) bajo la acción de elementos regulatorios atípicos (Eick, 1985; Hayday, 1984), o bien dejaría al oncogene sin estos elementos quedando abierta la posibilidad de una producción constitutiva. La amplificación génica llevaría a la mayor producción de ARNm por existir un gran número de copias del oncogene en el genoma celular, y así probablemente existiría una mayor cantidad de proteína oncogénica.

La capacidad transformante de myc queda manifiesta cuando algunas cepas del retrovirus VMA, que llevan insertado a este oncogene en su genoma, rápidamente transforman a las células que infectan y la lentitud con la que se presenta este fenómeno en cepas virales que no poseen a myc. Sin embargo, en estos

retrovirus de transformación lenta, se ha notado la inserción de sus secuencias en sitios cercanos a *myc*, lo que posiblemente promueva su desregulación y posteriormente, su integración al genoma viral (Revisado en Alitalo, 1987).

PAPILOMAVIRUS Y CANCER

La implicación viral en el desarrollo de un cáncer ha resultado uno de los procesos más apasionantes dentro de la oncología molecular. Este fenómeno se había descrito en animales como el ratón, el pollo y el mono; no obstante, sólo hasta años recientes se ha comenzado a estudiar aquellos virus que se encuentran implicados de alguna manera en los diferentes cánceres humanos.

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) representa uno de los problemas de salud más graves a nivel mundial y ocupa uno de los primeros lugares en mortalidad (Gissman, 1986). La presencia de virus como posibles causales del CaCU se demostró con la detección de secuencias virales en células tumorales (Durst, 1983). Estas secuencias pertenecían a un grupo de virus conocidos como papilomavirus, que se han aislado a partir de verrugas y tumores benignos en el tejido epitelial de varios animales (Zur Hausen, 1981), y forman parte de la familia PAPILOMAVIRIDAE, la cual se integra de virus pequeños de ADN de doble cadena (como Polyoma y SV40) (Zur Hausen, 1981).

Los papilomavirus presentan una afinidad por tejidos epiteliales y se han descrito más de 40 tipos en conejo, vaca y humano (Zur Hausen, 1981), formando verrugas, condilomas y tumores epiteliales en ellos. Las investigaciones encaminadas a esclarecer la detección de secuencias virales en tumores cervicales, llevó a la identificación de nuevos tipos de papilomavirus humanos (VPH), estableciéndose que en general (> 75 %) los tipos 6 y 11 se encontraban en tumores benignos, mientras que en los malignos la generalidad (> 90 %) fueron los tipos 16 , 18 y 33 (Gissman, 1986; Lorincz, 1987). Este hecho llevó a determinar el estado físico de los virus en los tumores, describiéndose un estado episomal en lesiones benignas y la integración inespecífica en el genoma celular con la presencia de oligómeros episomales para las malignas (Durst, 1985; 1986). Además, se ha encontrado que el tipo predominante en tumores es el VPH 16, mientras que en líneas celulares derivadas de cánceres genitales es relativamente preponderante el VPH 18 (Gissman, 1986). Así, el tipo de virus y su estado físico son factores determinantes en el posible desarrollo de un cáncer.

BILOGIA MOLECULAR DE LOS PAPILOMAVIRUS

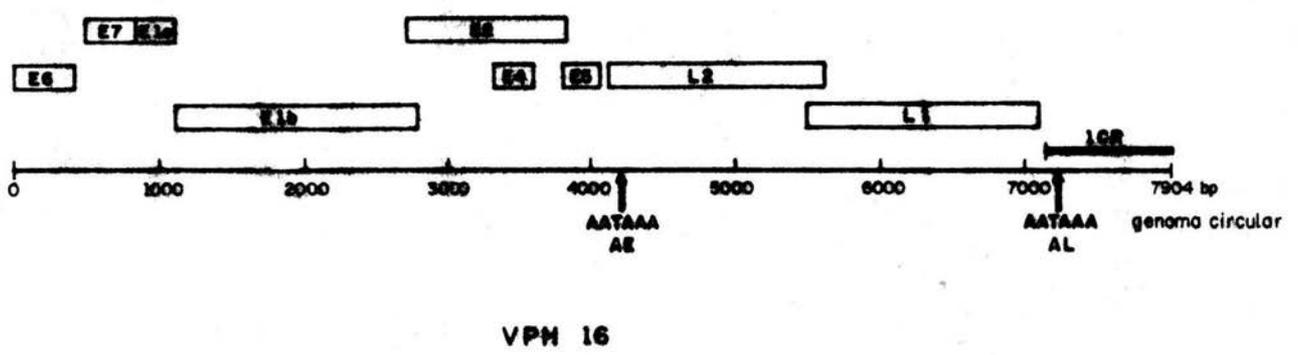
Un obstáculo considerable en el estudio de los VPH, ha sido la dificultad para contar con un sistema adecuado para infección productiva del virus en tejidos humanos, dado a que se requiere de células epiteliales en diferenciación, y a la fecha esto no

se ha realizado *in vitro* (Howley, 1986). Así, los estudios sobre la organización genómica y regulación de los VPH se han realizado con sistemas modelo animales (Howley 1986), la transformación de células en cultivo con secuencias virales contenidas en plásmidos (Howley, 1986; Pirisi, 1987; Spalholz, 1987), el análisis de líneas celulares provenientes de CaCU (Schwarz, 1986; Baker, 1987a) y tejidos animales infectados con el virus (Baker, 1987b).

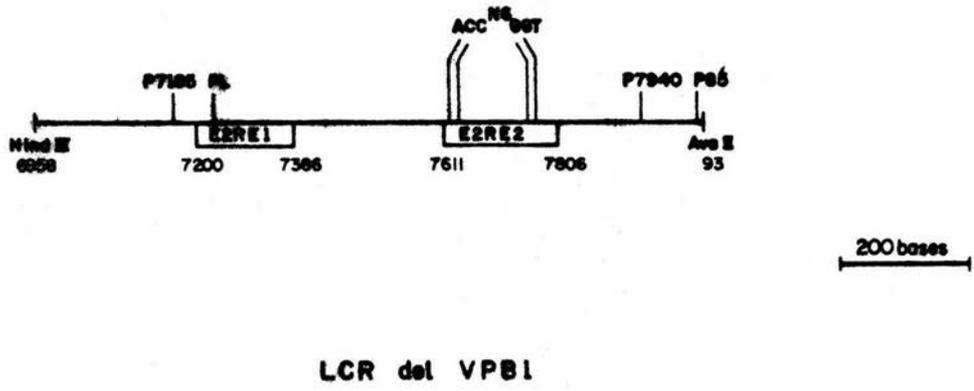
De este modo, se ha tomado al papilomavirus bovino tipo 1 (VPB 1) como el patrón básico de organización genómica de los papilomavirus (Howley, 1986). En este virus, como en los VPH, se localizan varios marcos de lectura abierta (ORF), esto es, secuencias comprendidas entre codones de iniciación y terminación, que corresponden a 7 regiones de expresión temprana (E) y a 2 regiones de expresión tardía (L) (Ver figura 2a); cada una de la cuales realiza funciones específicas dentro del ciclo de vida de estos virus (Howley, 1986; Seedorf, 1985). Sobre este esquema y en referencia al BPV 1, E1 parece regular la replicación extracromosomal; E2, E5 y E6 se relacionan de alguna forma con las capacidad transformante de los papilomavirus (Howley, 1986) y E7 es requerido para el mantenimiento de un gran número de copias virales (Mallon, 1987). L1 y L2 codifican para las proteínas estructurales del virus, que sólo se expresan en tejidos productivamente infectados (Schwarz, 1986; Baker, 1987b). Además de esto, existe una región no codificadora (LCR) de alrededor de 1000 pb, que esta encargada de la regulación transcripcional de la región temprana de los virus

Fig. 2. a) Estructura del papilomavirus humano tipo 16 (VPH 16; Seedorf, 1985); Los rectángulos de la parte superior representan los ORF tempranos (E) y tardíos (L). La región no codificadora (LCR), se representa con la línea de mayor grosor y las señales de poliadenilación (AATAAA) AE y AL, se indican con flechas. b) LCR del virus papiloma bovino tipo 1 (VFB 1; Spalholz, 1987). Se señalan las locaciones de los promotores (P), los elementos responsivos a la proteína EZ (E2RE1 y E2RE2) y la secuencia consenso ACCn6GGT.

a



b



papiloma. En esta región se localizan 4 promotores (P7185, P7940, PB9 y PL) (Ver figura 2b), que son usados diferencialmente en células transformadas y tejidos productivamente infectados (Baker, 1987b), una región potenciadora (enhancer) y el origen de replicación (Chow, 1987). Además, existen otros dos promotores (P2433 y P3080) en el resto del genoma viral (Baker, 1987b), y dos sitios de poliadenilación (AE y AL) para la terminación de la transcripción temprana y tardía (Ver figura 2a).

La regulación genética de los papilomavirus es un tanto compleja, dado a que presenta sitios cis- y trans-activadores de los distintos DRF y promotores presentes. Se sabe que el producto del gene E2 tiene una función trans-activadora sobre los promotores del LCR en el VPB 1 y VPH 16 (Baker, 1987b; Haugen, 1987; Phelps, 1987; Spalholz, 1987), ya que tiene afinidad por la secuencia ACCn6GGT que flanquea las regiones potenciadoras (enhancer) E2RE1 y E2RE2 de estos promotores (Ver figura 2b) (Baker, 1987b; Phelps, 1987; Spalholz, 1987). Sin embargo, también existen reportes sobre la actividad represora de E2 en VPH 18 (Lambert, 1987; Thierry, 1987a), en el cual la señal GGTn6ACC se encuentra más próxima a los promotores que en VPB 1, sugiriendo una posible obstrucción al paso de la RNA polimerasa II y por lo tanto un bloqueo a la transcripción (Thierry, 1987a).

La señal ACCn6GGT parece ser reconocida por una serie de proteínas virales reguladoras de la transcripción, como el antígeno T de SV 40 y la proteína E1a de Adenovirus 5, que junto

con E2 constituirían una familia de proteínas regulatorias transactivadoras. Este hecho se resalta por la capacidad de estas proteínas de modular genes no homólogos a ellas, como el caso de los antígenos de SV 40 y Adeno 5 sobre HPV 18 (Thierry, 1987b) o bien, la transactivación de los E2RE de HPV 16 por el producto E2 del VPB 1 (Phelps, 1987). Así, queda claro que el genoma de los papilomavirus contiene secuencias con capacidad responsiva a elementos regulatorios transactivadores, y también contiene este tipo de elementos para su regulación genética propia. Los cuestionamientos acerca del efecto de la integración al genoma celular de una secuencia viral de estas características, han llevado a determinar y analizar el estado genético celular y viral dentro del genoma de células afectadas.

Estudios sobre biopsias y líneas celulares (Durst, 1986; Schwarz, 1986; Baker, 1987a) ponen de manifiesto que la integración de los VPH ocurre en las inmediaciones de la región E2 , conservando las regiones tempranas E1, E5, E6 y E7 intactas en la mayor parte de los casos (Schwarz, 1986; Baker 1987a; Schneider-Maunoury, 1987). De esta manera el control genético de los virus se vería afectado por la integración y quizás se propiciaría la activación de genes celulares por los promotores virales, o bien la activación de genes virales por secuencias regulatorias celulares (Baker, 1987a). Lo cierto es que los productos de los genes E6 y E7 son los mayoritarios en CaCU, líneas celulares derivadas y células transformadas con VPH (Baker, 1987a; Danos, 1987; Mallon, 1987; Smotkin, 1986, 1987). E6 tiene actividad transformante y E7 parece relacionado con el

mantenimiento de un alto número de copias virales (Danos, 1987; Mallon, 1987), así la actividad desregulada de estos genes integrados al genoma celular abre la puerta a interesantes hipótesis sobre el desarrollo del CaCU.

Aunque la presencia de transcritos híbridos virus-célula en genomas con secuencias virales integradas no se ha demostrado claramente (Schwarz, 1986; Baker, 1987a), esta posibilidad quedaría abierta como una posible causa de carcinogénesis. Reportes en leucemias y linfomas, ponen de manifiesto la adquisición de nuevas funciones por efecto de una translocación que junte secuencias de otro modo separadas (Revisado en Haluska, 1987), o bien la influencia de secuencias regulatorias atípicas en genes con actividad transformante por el mismo efecto (Saito, 1983). Así, una inserción viral en determinados genes celulares podría llevar a la creación de nuevas funciones en estos genes, ó a la sobreexpresión de genes celulares y/o virales.

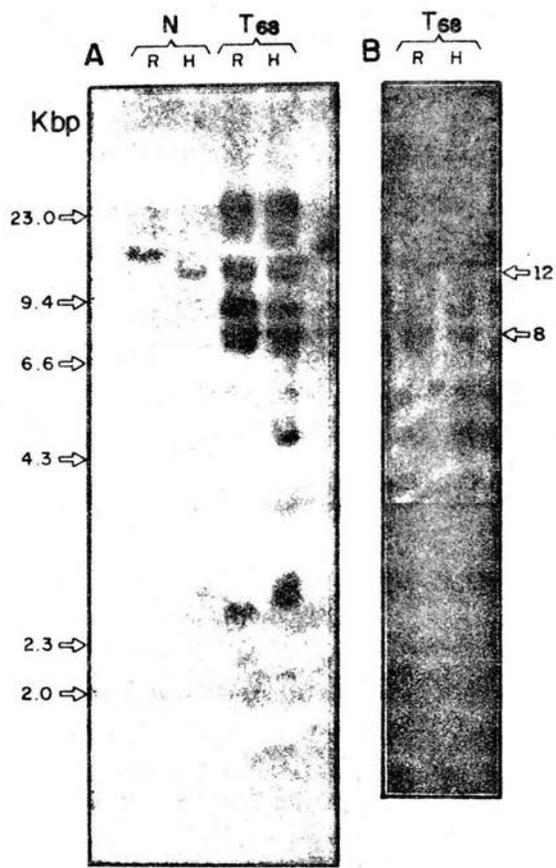
CANCER CERVICU-UTERINO EN MEXICO

El CaCU ocupa el primer lugar de mortalidad por cáncer en México (Barroso, 1986) y tiene una incidencia superior a la presente en E.E.U.U. y Europa. Estos hechos han llevado a el estudio molecular de este padecimiento para determinar las posibles causas del CaCU en nuestro país. En dichos estudios se encontró que en más del 90 % de lo casos (Ocadiz, 1987), el

oncogene c-myc se encuentra alterado, sea amplificado o rearrreglado, y en éstos, un 30 % presenta secuencias del VPH tipo 16 integradas al genoma celular (Gariglio, 1987b).

En un estudio preliminar (Salcedo, et al; enviado para publicación), se encontró que algunos tumores presentaban tanto alteraciones en c-myc como inserciones de VPH 16, y que existía una aparente asociación entre ellas, determinada por hibridización con sondas de c-myc y VPH 16 en las mismas regiones (Ver figura 3). La activación de oncogenes celulares por secuencias virales en CaCU era un hecho no descrito, por lo que un estudio a nivel molecular probaría la capacidad del VPH 16 de interactuar con secuencias celulares y propiciar un tumor al integrarse al genoma celular. Se propuso entonces la clonación de secuencias de ADN tumoral que contuvieran secuencias de c-myc y VPH 16 para su estudio a profundidad a nivel estructural.

Así, la evidencia aportada en este trabajo determina que la integración de secuencias del VPH 16 en el oncogene c-myc no es solo una posibilidad, y que de encontrarse este mismo fenómeno en mas casos, con estudios sobre la significancia funcional de las inserciones virales en oncogenes, se podría llegar a describir la oncogénesis mediada por virus en CaCU en la población mexicana, y de esta forma dar pie a la investigación y desarrollo de medidas efectivas para su prevención y tratamiento.



MYC

VPH 16

Fig. 3. Hibridización del ADN del tumor 1 68 con c-myc (A)
y VPH 16 (B). EcoR1 (R); Hind III (H). ADN de tejido normal
(N). Tamaños moleculares en pares de kilobases. (kbp).

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este trabajo se requirió de tres etapas básicas :

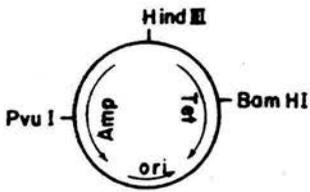
- 1) Obtención del ADN a clonar
- 2) Clonación
- 3) Caracterización molecular de las clonas

En la primera etapa, el ADN proveniente del tumor 68, se sobredigirió con la enzima Hind III (ver figura 3) y los fragmentos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Las regiones correspondientes al tamaño molecular de las bandas que contenían a c-myc y VPH 16 (Ver figura 3), se extrajeron del gel y el ADN se eluyó y purificó.

El plásmido pBR322 fue linearizado con la enzima Hind III y se ligó con los fragmentos Hind III obtenidos del tumor 68. Posteriormente, se procedió a la transformación de Escherichia coli K12 C600 con el ADN ligado. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en ampicilina y contraseleccionadas en tetraciclina para después ser propagadas para su estudio (Ver figura 4).

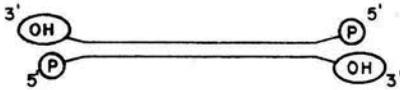
Las clonas elegidas fueron sondeadas para la localización de fragmentos provenientes de tumor realizando transferencias del ADN plasmídico a un soporte de nitrocelulosa (transferencia Southern) e hibridizándolo con el fragmento Eco RI/Xba I del plásmido HLMXba (Ver figura 5b). Las clonas con señal positiva fueron caracterizadas, cumpliendo así la segunda etapa.

Fig. 4. Clonación de los residuos Hind III positivos para c-myc y VPH 16 del tumor T68 (12, 8 v 6.6 kb) en pBR-322. Se señalan los genes de resistencia a ampicilina (amp) y tetraciclina (tet) de pBR-322. BamHI (B); EcoRI (E); Hind III (H) y PvuI (P).

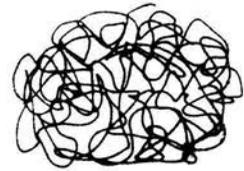
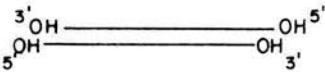


pBR-322
4.3 Kb

Digestión con
Hind III

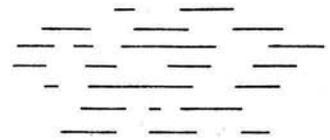


Fosfatasa
Alcalina

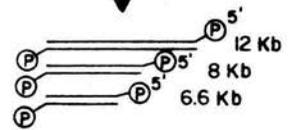


ADN genómico

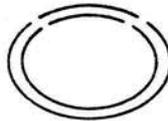
Digestión con
Hind III



Gel Agarosa 1°/G



Ligación



Transformación en
E.col: K12 C600

Selección Amp^r



Contra selección Tets



En la tercera etapa se hibridizaron las clonas de mayor tamaño molecular contra el fragmento Bam HI/ Bam III del plásmido pSHPV-16 (Ver figura 5a) para confirmar la presencia de secuencias de VPH 16 en ellas. Para una simplificar el estudio de estas clonas se realizaron subclonaciones de fragmentos de interes en el plásmido pUC-19 y procediendo al análisis de restricción y secuenciación de éstos plásmidos con la finalidad de caracterizar las secuencias implicadas en la integración y la elaboración de un modelo de carcinogénesis mediada por virus.

Los siguientes métodos fueron empleados en la elaboración del presente trabajo :

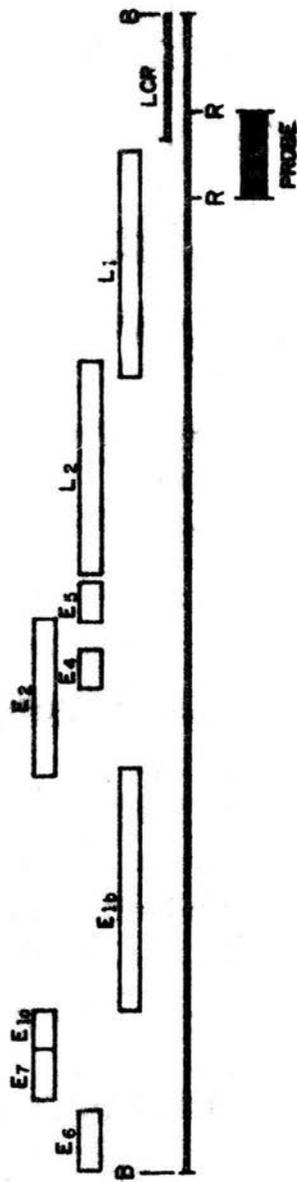
ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La migración de moléculas a través de un soporte inerte cuando se les aplica un campo eléctrico se conoce como electroforesis. Este fenómeno ha sido aprovechado para la separación de substancias en base a su masa y a su carga eléctrica. Así, en el estudio del ADN las técnicas electroforéticas han sido empleadas, en conjugación con las enzimas de restricción, para caracterizar la estructura de las secuencias nucleotídicas que constituyen a un gene determinado.

El ADN estudiado en el presente trabajo fué digerido con múltiples enzimas de restricción, cada digestión se llevó a cabo en las condiciones de reacción adecuadas descritas para cada una

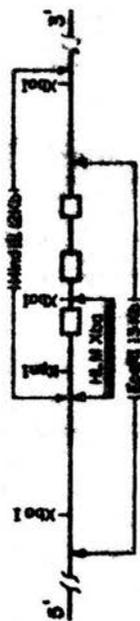
Fig. 5. Sondas utilizadas para c-myc y VPH 16. a) Plásmido HLM-Xba, que contiene el primer exon, parte del primer intron de c-myc, y la porción 5' adyacente, clonados en pBR-322. b) Plásmidos pSHPV-16 y pE1/16 (Seedorf, 1985), que contienen el genoma entero (BamHI/BamHI) y el residuo EcoRI/EcoRI (Probe) del VPH 16 respectivamente, clonados en pUC8. EcoRI (R); BamHI (B).

(A) HPV - 16 DNA



1 Kbp

(B)



1 Kbp

y se sometió a electroforesis en gel de agarosa de acuerdo al siguiente protocolo (Maniatis, 1982):

Agarosa tipo II (Sigma) o grado N.A. (Bio-Rad), se disolvió en regulador TBE 1X (Tris-HCl 90mM; Acido Bórico 90mM; EDTA 2mM), y se dejó gelificar. El gel fue sumergido en el regulador TBE 1X con 0.05 µg/ml de Bromuro de Etidio. Las muestras se aplicaron con los colorantes indicadores de corrida (Azul de Bromofenol 0.02%; Xilencianol 0.02%; Glicerol 50%).

Las electroforesis fueron llevadas a cabo a un voltaje de 25 a 100 V de acuerdo al tamaño del gel y las muestras a estudiar.

Al terminar la corrida, el gel fue expuesto a luz UV y las bandas de ADN se visualizaron por la fluorescencia de este con el Bromuro de Etidio.

ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA

Este tipo de electroforesis permite la separación de secuencias hasta con una base de diferencia en el tamaño de su secuencia, y se ha empleado para la resolución de moléculas de ADN de tamaños semejantes (Maniatis, 1982), separación de cadenas complementarias de ADN (Maniatis, 1982) y secuenciación de ácidos nucleicos (Sanger, 1977), entre otros.

De un stock de Acrilamida al 40 % (38 % Acrilamida, 2 % N,N'-metilen-bis-Acrilamida), se colocó el volumen deseado (de acuerdo a la concentración a usar) en un tubo Falcon de 50 ml.

Se añadieron las cantidades adecuadas de TBE 10X y agua bidestilada necesaria para 25 ml totales, 150 μ l de Persulfato de Amonio (10%) y 50 μ l de TEMED. Se agitó y vació en las placas de vidrio que se dispusieron como molde.

Se permitió polimerizar, el gel fué colocado en una cámara para electroforesis vertical con regulador TBE 1X en los electrodos. Las muestras fueron aplicadas con solución de colorantes indicadores y se corrió a un voltaje de 200 a 400 V (> 12 mAmp).

El gel se retiró de las placas y fue teñido con Bromuro de Etidio (0.05 μ g/ml), para visualizar las bandas en luz UV.

TRANSFERENCIA DE ADN A SOPORTES

SOLIDOS (SOUTHERN BLOT)

Esta técnica, desarrollada por Southern (1975), se fundamenta en la transferencia de fragmentos de ADN a un soporte sólido con cargas eléctricas afines a él, mediante el empleo de una alta fuerza iónica y capilaridad.

El gel de agarosa al 1% con la muestra de ADN sometido a electroforesis fué sumergido en una solución desnaturalizadora (NaOH 0.5M; NaCl 1.5M), al menos por 30 minutos.

El gel se enjuagó con agua bidestilada y fué sumergido en una solución neutralizadora (Tris-HCl 1M pH 8.0; NaCl 1.5M) por otros 30 minutos cuando menos.

Se montó un dispositivo de transferencia colocando el gel sobre un puente de papel Whatman 3MM o equivalente en contacto

con SSC 10X (NaCl 1.5M, Citrato de Sodio 0.15M pH 7.0) y un filtro de nitrocelulosa (Schleir & Schuel 0.45 μ m) prehumedecido en SSC 2X por 10 minutos, sobre el gel. Posteriormente se colocaron dos papeles Whatman 1MM sobre el filtro, cuidando de no dejar burbujas entre ninguno de los componentes del dispositivo. Papel absorbente y un peso de alrededor de 500 gr fueron colocados sobre todo el montaje, dejándose transferir de 16 a 24 horas.

Finalmente al término de la transferencia, el filtro se enjuagó en SSC 2X y horneó al vacío a 80° C durante 2 horas.

MARCAJE DE ADN CON 32 P POR EL
MÉTODO DE " NICK TRANSLATION "

Este método se fundamenta en las propiedades de las enzimas ADNasa I de páncreas bovino y la ADN polimerasa I de Escherichia coli.

En un primer paso la ADNasa I abre espacios (nicks) en la doble hélice del ADN a marcar, después de lo cual la ADN polimerasa I puede actuar, inicialmente con su actividad 5'- 3' exonucleasa y, con la adición de nucleótidos (uno de los cuales contiene el isótopo 32 P), posteriormente presenta su actividad 5'- 3' polimerasa. De esta manera el espacio abierto por la ADNasa I se va desplazando por toda la secuencia a marcar, incorporando el nucleótido marcado.

Para la realización del marcaje se contó con kits comerciales de " nick translation " (BRL o Amersham) y se

siguió el protocolo adecuado para cada casa comercial, en cuanto a volúmenes y cantidades, consistiendo en lo siguiente :

1-2 µg de ADN se colocaron en un volumen de 5-10 ul de agua bidestilada. Se añadió una mezcla de nucleótidos (dATP, dGTP y dTTP) y cofactores enzimáticos (Cloruro de Magnesio, Tris-HCl pH 7.9 y NaCl), junto con α -³²P-dCTP (ICN radiochemicals o Amersham) y se homogeneizó con la micropipeta.

Posteriormente fueron añadidas las enzimas ADNasa I y ADN polimerasa I calibradas para la reacción de incorporación y la mezcla de reacción se llevó un volumen final de 50 a 100 ul con agua bidestilada y desionizada (dependiendo de la casa comercial). Se incubó durante 2 horas a 16°C.

Al término del tiempo de incubación, la mezcla de reacción fué sometida a una cromatografía en una columna de Sephadex G-50 para separar la porción no incorporada del nucleótido marcado, y el pico de incorporación se leyó en un contador de centelleo para determinar la actividad específica del ADN marcado, obteniéndose usualmente de 50 a 200 millones de cpm/µg de ADN.

HIBRIDIZACION DE ADN EN FASE SOLIDA

La hibridización de moléculas de ADN se da en condiciones de fuerza iónica y temperatura (astringencia) determinadas por la homología de las secuencias a hibridizar, tratándose de buscar secuencias altamente homólogas (> 80 %) las condiciones de hibridización se realizaron a alta astringencia.

El filtro de nitrocelulosa transferido se humedeció 10 minutos con SSC 6X. Se agregaron 50 ml de una solución prehibridizadora (50% Formamida; SSC 5X; SDS 0.1 %; Solución de Denhardt 5X (Poliviunilpirrolidona 0.02%; BSA 0.02%; Ficoll 400 0.02%) y 1 mg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado) para saturar los espacios libres del filtro y evitar la unión no específica de la sonda marcada de ADN. Se incubó a 42°C al menos por 6 horas.

Con 11 ml de solución prehibridizadora fue añadida la sonda de ADN marcada radioactivamente (al menos 10 millones de cpm /ml de solución prehibridizadora) y se incubó de 20 a 24 horas a 42°C.

Al finalizar el tiempo de hibridización, el filtro se lavó dos veces con una solución SSC 2X y SDS 0.1% a temperatura ambiente y repetidas veces (hasta eliminar lo más posible de fondo) con una solución de SSC 0.1X y SDS 0.1% a 55°C.

El filtro se secó al aire y fué expuesto a placas radiográficas Kodak X-OMAT en cassetes de autorradiografía con pantallas intensificadoras de 1hr a 15 días a -70°C.

MARCAJE DE ADN POR LOS EXTREMOS 3'-OH

En esta técnica se saca provecho del corte asimétrico característico de muchas enzimas de restricción, que dejan extremos 5' sobresalientes del corte (extremos cohesivos) y también de la actividad 5'-3' polimerasa de la subunidad mayor de la ADN polimerasa I de E. coli (fragmento Klenow).

De esta manera un ADN cortado con una enzima de restricción determinada, ve rellenados sus extremos cohesivos por los nucleótidos incorporados por el fragmento Klenow, dentro de los cuales algunos se encuentran marcados con ^{32}P (Maniatis, 1982).

El ADN cortado y purificado, se colocó en una mezcla de reacción con 1 nM de cada dNTP, 50 μCi de dCTP (6000 Ci/mM), amortiguador de reacción (Tris-HCl pH 8.0 50mM; MgCl_2 10 mM; NaCl 50mM) y 7.5 U de fragmento Klenow, todo en un volumen de reacción de 25 μl . Se incubó a temperatura ambiente de 45 a 60 minutos.

El ADN se purificó por extracción fenólica y precipitación con Etanol Absoluto y Acetato de Sodio 4.5 M (pH 5.5).

ELUCION DE ADN DE GELES

Para obtener fragmentos de ADN de tamaño y características definidas en una electroforesis, se procede a la extracción de bandas de ADN de geles. Esto depende del tipo de gel y el tamaño del fragmento, siguiéndose tres técnicas distintas:

a) Elución de bandas de ADN por agarosa LMP. Esta técnica se siguió cuando los fragmentos a obtener eran > 3 kb.

Las muestras digeridas fueron corridas en un gel de agarosa convencional, y se cortaron las bandas de interés con un bisturí. Los cortes fueron sumergidos en una matriz de agarosa LMP (bajo punto de fusión) a 50°C y se dejó cuajar.

Se corrió a 100 V durante 30 minutos para permitir la entrada del ADN a la agarosa LMP y se cortaron las porciones del gel que contuvieran los fragmentos.

Los pedazos de agarosa se colocaron en un tubo Eppendorf (1.5 ml) y se le añadieron 300 μ l de regulador de corrida. Se incubó a 60°C para fundir la agarosa LMP, y fué añadido un volumen de fenol saturado con TE. Se agitó y centrifugó por 5 minutos en una centrifuga Eppendorf.

A el sobrenadante obtenido de la extracción fenólica se le adicionó 1/2 vol. de Acetato de Amonio 7.5M y 2 1/2 vols. de Etanol Absoluto, para precipitar el ADN.

b) Elución de ADN por adsorción a papel de DEAE-Celulosa (Dretzen, 1983). Esta técnica fué realizada cuando los fragmentos a eluir eran < 3 kb.

Las muestras digeridas se corrieron convencionalmente en un gel de agarosa, el ADN se visualizó y se realizó una incisión enfrente de las bandas de interés con un bisturí. En la incisión fué colocado un trozo de papel Whatman DE 81, previamente tratado con 1.5M de NaCl y prehumedecido en regulador de corrida. La electroforesis se dejó correr hasta que la muestra entró en el papel.

El ADN se aluyó con un regulador de elución I (Tris-HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM; NaCl 2.5M). El eluido se trató con n-Butanol saturado con agua y el ADN se precipitó con Acetato de Amonio 7.5M y Etanol.

c) Elución de ADN de geles de acrilamida.

El fragmento deseado se cortó del gel, y fué colocado en un regulador de elución II (Tris-HCl 10mM pH 7.9; NaCl 0.3M; EDTA 1mM; SDS 0.1%), a 37°C por toda la noche.

El eluido se pasó através de un filtro Millipore (0.45 μ m), y se le añadió un vol. de Isopropanol frío. Se centrifugó por 30 minutos en una centrifuga Eppendorf, y la pastilla de ADN fué lavada con Etanol al 80 %.

EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO

Para la obtención de ADN plasmídico, se procedió con un protocolo de lisis bacteriana por Alkali-SDS (Maniatis, 1982) y la purificación del ADN por gradientes isopícnicos de CsCl (Maniatis, 1982).

Una colonia de la bacteria hospedera del plásmido se creció toda la noche en 5 ml de medio Luria con el antibiótico adecuado, a 37°C y en agitación (200 rpm).

El cultivo se agregó a 1 lt de medio Luria con el antibiótico adecuado, y se dejó crecer a 37°C en agitación (200 rpm), hasta una D.O. a 600nm de 0.6. En caso de contar con un plásmido con el replicón ColE1, se añadió al cultivo Cloranfenicol a una concentración final de 170 μ g/ml y se incubó 14 hrs. a 37°C, en agitación (200 rpm).

El cultivo se centrifugó a 6000 rpm en un rotor Sorvall GSA a 4°C, y la pastilla bacteriana fué resuspendida en 40 ml de solución STE (Glucosa 50mM; Tris-HCl 25mM pH 8.0; EDTA 10mM) con 5 mg/ml de lisozima, incubándose 5 minutos a 0°C. Se

añadieron 80 ml de solución de lisis (NaOH 0.2N, SDS 1%) y se incubó a 0°C hasta que la suspensión quedó transparente.

Se añadieron 80 ml de Acetato de Potasio 5M, pH 5.0, y se incubó a 0°C por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm en un rotor Sorvall SS34 durante 30 minutos, a 4°C, y el sobrenadante fué recuperado a través de una gasa.

Se agregó al sobrenadante 2 1/2 volúmenes de Etanol Absoluto frío (-20°C) y se centrifugó a 12000 rpm en un rotor Sorvall SS34 durante 30 minutos a 4°C.

La pastilla (ADN plasmídico con impurezas) se secó al vacío y se resuspendió en 3 ml de TE (Tris HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM).

3 gr de CsCl fueron disueltos en la solución anterior (concentración final de 1 gr/ml) y se añadieron 400 ul de Bromuro de Etidio (10 mg/ml), en tubos Beckman de polialómero para rotor SW 50.1. Los tubos se equilibraron y centrifugaron 40 horas a 40000 rpm a 20°C en un rotor Beckman SW 50.1.

A luz UV se visualizaron las bandas de ADN y se recuperaron con una jeringa a través del tubo.

El Bromuro de Etidio fue retirado con n-Butanol saturado con agua bidestilada y se dializó al menos 48 horas contra TE.

El ADN recuperado se cuantificó por espectrofotometría, y se almacenó a 4°C.

CLONACION MOLECULAR EN PLASMIDOS

La inserción de ADN en vectores extracromosómicos de información genética (plásmidos, fagos, cósmidos, etc.), se realiza utilizando las propiedades de la enzima T4 ADN ligasa, cuya actividad es catalizar la unión de extremos 5'-fosforil a 3'-hidroxil de ADN.

Se colocaron en un tubo Eppendorf de 0.5 ml, una cantidad estimada de vector (pBR-322, pUC-19 o M13mp18) y un exceso 3 veces molar del inserto a clonar. Se añadieron 1/2 volumen de Acetato de Amonio 7.5M y 2 1/2 volúmenes de Etanol Absoluto. Se centrifugó por 30 minutos en una centrifuga Eppendorf.

La pastilla se lavó con etanol al 80 % y se secó al vacío, resuspendiéndose en 15 µl de agua bidestilada. Se añadieron 4 µl de amortiguador de ligasa 5X (Tris-HCl 300mM pH 7.9; DTT 0.1M; Cloruro de Magnesio 50mM; ATP 0.6mM), y 4 U de ligasa T4.

La mezcla se incubó a 4°C por toda la noche y se procedió a la transformación de bacterias.

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES PARA TRANSFORMACION

Este proceso prepara a las células bacterianas para la transformación con ADN circular, mediante el uso de choques osmóticos y térmicos.

Se creció un cultivo de bacterias en 5 ml de medio Luria toda la noche a 37°C y en agitación (200 rpm) y, posteriormente, se diluyó 1:100 con medio Luria dejándose crecer 2 horas a 37°C en agitación (200 rpm).

El cultivo se centrifugó a 8000 rpm en un rotor Sorvall SS34 por 10 minutos a 4°C. La pastilla de bacterias fue resuspendida en 1/2 del volumen original de Cloruro de Calcio 100mM, y se incubó en hielo 20 minutos.

Se volvió a centrifugar en las condiciones descritas y la pastilla bacteriana fue resuspendida esta vez en 1/10 del volumen original de Cloruro de Calcio 100mM. Las bacterias se guardaron a 4°C hasta 48 horas máximo.

TRANSFORMACION BACTERIANA

A 200 μ l de cels. competentes, se añadieron 100 μ l de mezcla de transformación (Citrato de Sodio 50mM; de NaCl 600mM; Cloruro de Calcio 70 mM y de 10 a 50 ng de ADN superhelicoidal). La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos.

Rápidamente, la mezcla se colocó a 37°C por 5 minutos se añadió a 3 ml de medio Luria. Se incubó en reposo a 37°C por 1 hora, espatulándose 200 μ l del cultivo en diluciones 1:1, 1:10 y 1:100, sobre cajas con medio Luria más el antibiótico adecuado.

En caso de tratarse de el colifago M13 se procedió de la siguiente manera:

En la mezcla de transformación sólo se añadieron de 5 a 10 μ g de ADN superhelicoidal.

El procedimiento se siguió hasta el paso 4, donde se añadieron 200 μ l de bacterias JM 101 creciendo exponencialmente, X-gal al 0.003% e IPTG 0.03mM a 3 ml de agar suave T ϕ a 55°C.

La mezcla se agitó gentilmente y fue vaciada sobre cajas con medio T ϕ . Se esperó a que la mezcla solidificara y se incubó a 37°C toda la noche.

MINIPREPARACION DE ADN PLASMIDICO

(SCREENING)

Con la finalidad de determinar la presencia y el tamaño de ADN plasmídico en bacterias, se han desarrollado varias técnicas que permiten el análisis de un gran número de muestras en corto tiempo (Barnes, 1977; Hughes, 1977 Telford, 1977). Así se desarrolló un protocolo para el sondeo de ADN plasmídico para la elaboración de este trabajo.

Se tomaron colonias grandes de las clonas a estudiar y cada una se resuspendió en 200 μ l de amortiguador TBE 1X con la ayuda de un vórtex. Se agregaron 50 μ l de amortiguador de lisis (SDS 5%; EDTA 0.1M; glicerol 50%) y la mezcla fué calentada a 70°C por 10 minutos.

La mezcla fué agitada brevemente y se cargaron 40 μ l de ella en un gel de agarosa al 1 %, para someterlo a una electroforesis (2 V/cm). El gel fué teñido con Bromuro de Etidio (0.05 μ g/ml) y se visualizaron las bandas en luz UV.

SECUENCIACION DE ADN

La determinación de los componentes nucleotídicos que constituyen una cadena de ADN se realiza mediante el empleo de productos químicos que tienen una acción específica sobre las bases púricas o pirimidínicas (Maxam, 1977), y también con el uso de dideoxinucleótidos (ddNTP) que inhiben la actividad polimerasa de la ADN pol I de E. coli (Sanger, 1977).

a) Secuenciación de ADN por el método de Maxam y Gilbert (1977).

Por cada reacción, 10000 cpm del ADN marcado por los extremos 5' o 3', se colocaron en un tubo Eppendorf (1.5 ml) junto con 3 μ l de acarreador (ADN sonificado 10 mg/ml) y agua bidestilada cbb 10 μ l.

Para las purinas, se añadieron 25 μ l de ácido fórmico (88 %) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Para las pirimidinas, se añadieron 30 μ l de hidrazina (99 %) y se incubó a temperatura ambiente por 7 minutos.

A ambas reacciones fueron añadidos 200 μ l de solución HZ Stop (0.3M Acetato de Sodio; 10mM EDTA; y 25 μ g/ml de ARNt), y 750 μ l de Etanol Absoluto frío.

Se centrifugó 30 minutos en una centrifuga Eppendorf a 4°C. La pastilla se secó y se resuspendió en 250 μ l de Acetato de Sodio 0.3M y se añadieron 750 μ l de Etanol Absoluto frío. Se repitió el paso anterior.

La pastilla se lavó con etanol al 80 % frío, se secó y se resuspendió en 100 μ l de piperidina 1M. Las muestras fueron incubadas a 90°C por 30 minutos, se liofilizaron 3 veces (resuspendiendo en agua bidestilada en cada ocasión) y fueron

resuspendidas en amortiguador de carga (Xilencianol 0.02%; Azul de Bromofenol 0.02% y Formamida 80%), aproximadamente a 30 cps/ μ l.

Las muestras se colocaron a ebullición por 3 minutos antes de cargarse en el gel de secuenciación (Acrilamida 8% y Urea 7 M) (Sanger, 1978), que se corrió de 1000-1500 V (15 - 30 Watts) hasta que el Azul de Bromofenol salió del gel.

El gel se secó y se expuso a una placa autorradiográfica Kodak X-OMAT por una noche.

b) Secuenciación de ADN por el método de terminación de cadena.

El ADN marcado por uno de sus extremos se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, con 10 ng de DNasa I de páncreas bovino y 20 U de ADN polimerasa I de E. coli en un amortiguador de reacción que contenía 100 μ M de un ddNTP, 40 μ M de los dNTPs restantes y cofactores enzimáticos.

La reacción se detuvo con EDTA (0.2M) y el ADN se precipitó con HZ stop-etanol, siguiéndose la metodología anterior a partir de este paso.

RESULTADOS

Clonación de Fragmentos Hind III del Tumor T68 en pBR-322.

Las clonas obtenidas fueron seleccionadas en medio Luria adicionado con ampicilina (50 ug/ml) y contraseleccionadas con tetraciclina (25 ug/ml), dada la característica del corte Hind III en pBR-322 que resulta en la inactivación insercional ocasional del gene de resistencia a tetraciclina (tet). Así, resultaron 20 clonas ampicilina resistentes y tetraciclina sensibles, las cuales mostraron contener plásmidos de 3 diferentes tamaños moleculares (Ver figura 6). Para determinar la naturaleza celular de los fragmentos clonados, estos plásmidos se hibridizaron contra el fragmento EcoRI/Xba I del plásmido HLMXba, el cual contiene el primer exon de c-myc (Ver figura 5a). Diecisiete clonas tuvieron señal positiva para c-myc (Ver figura 7), y de ellas tres (108, 136 y 142) poseían un tamaño molecular relativo lo suficientemente alto como para contener un inserto grande (6.6 kb), que pudiese poseer secuencias de myc y VPH 16.

De esta forma, se hibridizó pCUT-136 contra el genoma completo de VPH 16 para demostrar la presencia de secuencias virales provenientes del tumor, obteniéndose una fuerte señal positiva (Ver figura 9). Por análisis de restricción se determinó que estos plásmidos (pCUT) se hallaban de alguna manera rearrreglados y eran idénticos entre sí, dada la presencia de una sola banda de alrededor de 3.8 kb con los cortes Hind III

Fig. 6. Detección de ADN plasmídico en clones amp resistentes y tet sensibles. Las colonias bacterianas fueron resuspendidas en un regulador con SDS 5%-EDTA 0.1M e incubadas a 70° C y el lisado se corrió directamente en un gel de Agarosa al 1%. Marcador de peso molecular (Hind III); C600 (E. coli K 12 C600). Tamaños moleculares en kilobases.

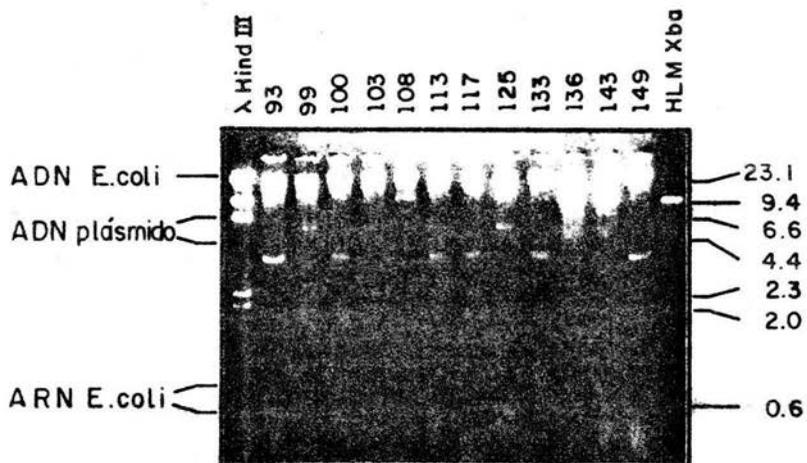
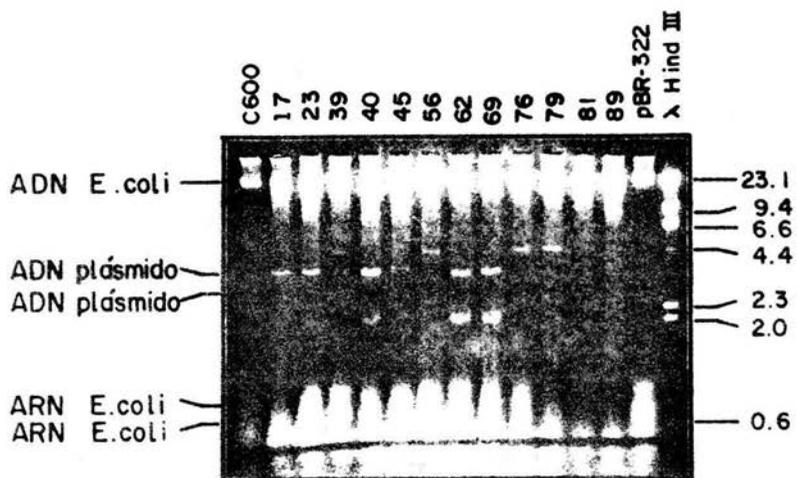
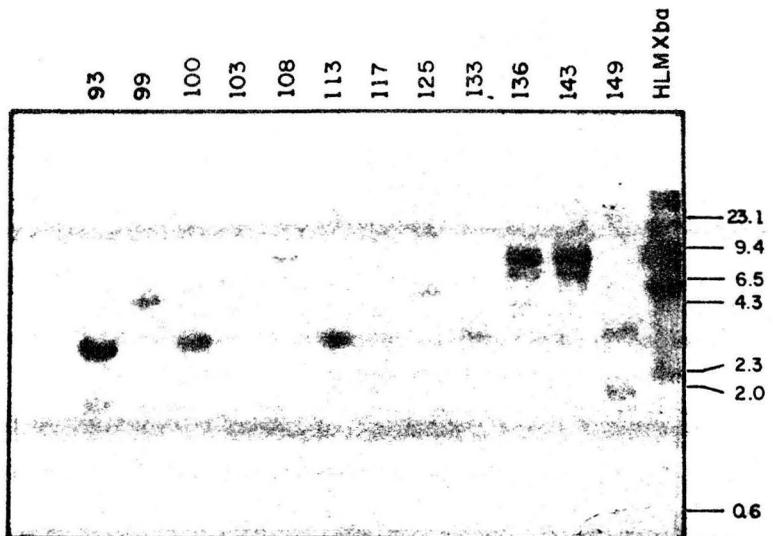
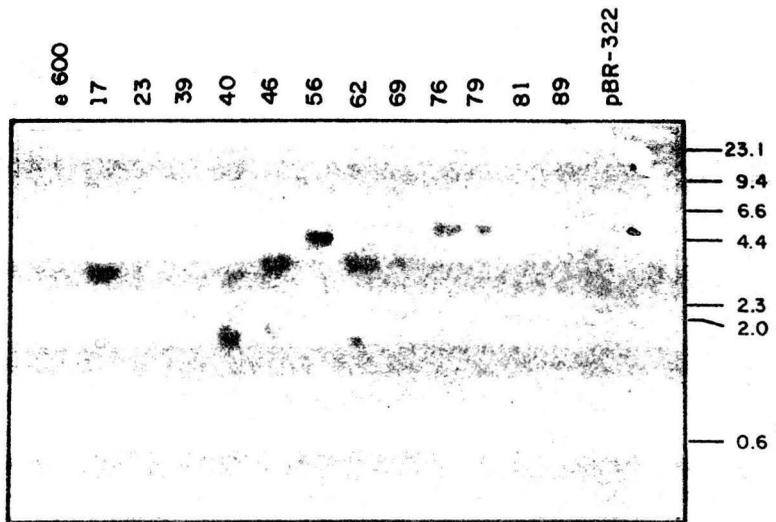


Fig. 7. Hibridización de las clonas am^r resistentes y tet sensibles. Los geles con lisados bacterianos fueron transferidos a nitrocelulosa e hibridizados con el fragmento EcoRI/XbaI (exon 1 de c-myc) del plásmido HLMXba (Act. esp. 100 millones cpm/ug de ADN, 10 000 cpm/ml sol. prehib.), en condiciones de alta astringencia. Marcador de peso molecular (λ Hind III); C600 (E. coli K 12 C600). Tamaños moleculares en kilobases.



, EcoR1 y BamH1 (Ver figura 9a, carriles 3 y 4). Esto se explica por los fenómenos de excisión, recombinación y delección sitio específica (Kopecko, 1975; Bedbrook, 1976; Iida, 1983) que ocurren cuando se realiza la clonación de fragmentos que contienen secuencias palindrómicas con el vector, lo que lleva a la delección de las secuencias que se ubican entre las zonas de reconocimiento (Ver figura 11).

No obstante, el corte Xho1 presentó una sola banda de alrededor de 8 kb (Ver figura 9b, carril 9), lo que sugiere la presencia de un sitio único en el plásmido que correspondería al exon 1 de c-myc, dada la ausencia de sitios Xho 1 de pBR-322 y VPH 16.

Con la evidencia de dos bandas (2.4 y 1.4 kb) en el corte Hind III/EcoR1 de pCUT (Ver figuras 9a y 10), una de las cuales (2.4) presenta al menos un sitio Pvu 1 (característico del gene amp de pBR-322) que separa dos bandas de alrededor de 1 y 1.4 kb (esperadas para un corte Pvu 1 de la region Pvu II/EcoR1 de pBR-322) como se muestra en la figura 10, y además la sensibilidad a tetraciclina (que sugiere daño al gene tet de pBR-322); se supuso que el rearrreglo comprendió una delección de la región del gene tet de pBR-322 con una porción del inserto de ADN tumoral, que llevó a la formación de un plásmido simétrico de 8 kb, dímero de un plásmido de 3.8 kb, en el cual el sitio Xho 1 es único por encontrarse dentro de la zona de reconocimiento que quedó en el plásmido (Ver figura 11).

Fig. 8. Hibridización del plásmido pCUT-136 con el genoma completo de VPH 16 (linearizado en el sitio BamHI), proveniente del plásmido pSHPV-16 (Seedorf, 1985), y contra el exon 1 de c-myc (Fragmento HindIII/XbaI del plásmido HLMXba). Las hibridizaciones fueron realizadas en condiciones similares a las descritas en la Fig. 7. E1/16, Fracción EcoRI/EcoRI del VPH 16.

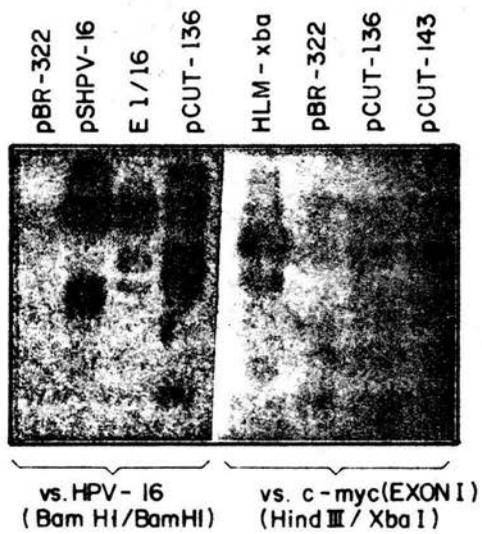
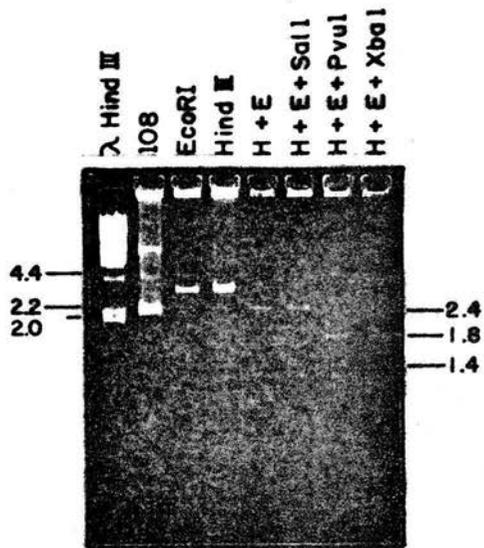


Fig. 9. Análisis de restricción del plásmido pCU1-136. a) Digestión completa del ADN, mostrando las bandas correspondientes a sitios simétricos en el plásmido. b) Digestiones parciales demostrando el tamaño molecular lineal (8 kb) y el número de sitios de corte para cada enzima dentro del plásmido. 1 µg de plásmido fué digerido con cada una de las enzimas señaladas a 37°C, el tiempo requerido para la digestión parcial o total y los fragmentos separados en un gel de Agarosa al 1%. Marcador de peso molecular (A Hind III), BamHI (B), EcoRI (E), Hind III (H), Pvu I (P), Pvu II (PII), Xho I (X).

A)



B)

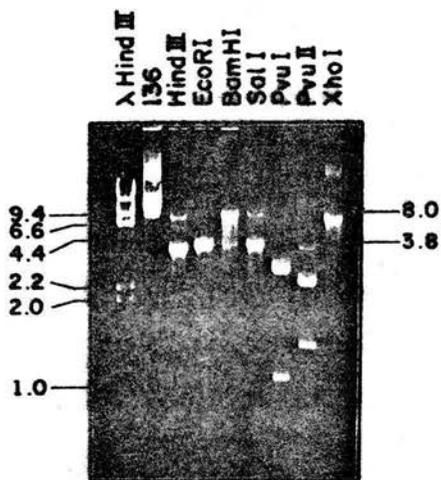
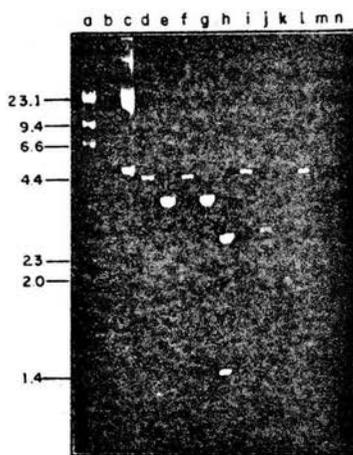


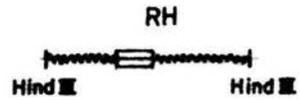
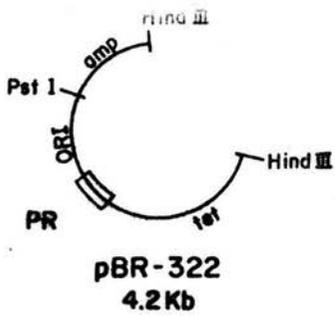
Fig. 10. Aislamiento de fragmentos de 1.4 y 2.4 kb de pCUT-136 (Hind III/EcoR1). Marcador de peso molecular (λ Hind III).



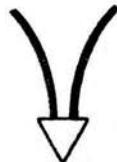
Restricciones del plásmido pCUT-108 con Hind III, EcoRI y PvuI

- | | |
|-----------------------|---|
| a) λ Hind III | h) pCUT-108 Hind III/EcoRI |
| b) pBR-322 %c | i) pBR-322 |
| c) pCUT-108 %c | j) Fragmento 2.4 Hind III/EcoRI de pCUT-108 |
| d) pBR-322 Hind III | k) Fragmento 1.4 |
| e) pCUT-108 | l) pBR-322 PvuI |
| f) pBR-322 EcoRI | m) Fragmento 2.4 PvuI |
| g) pCUT-108 | n) Fragmento 1.4 PvuI |

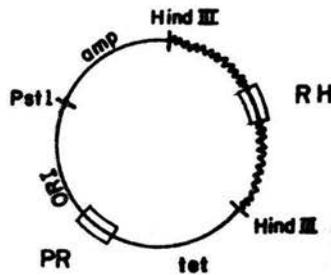
Fig. 11. Modelo de rearrreglo y delección sitio específica de los plásmidos pCUT durante la clonación. Resistencia a ampicilina (amp), resistencia a tetraciclina (tet), origen de replicación (ori).



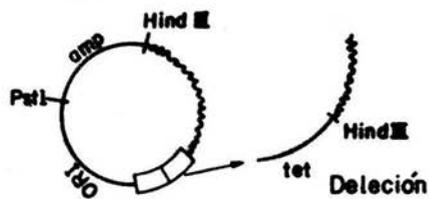
Fragmento Hind III / Hind III
T₆₃



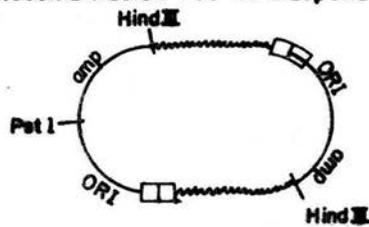
Ligación



Transformación



Recombinación rec-A independientes



pCUT
~8 Kb

Así, pCUT-136 contiene secuencias de c-myc y VPH 16 derivadas de tumor clonadas en un fragmento de pBR-322 que incluye su origen de replicación y el gene amp (Ver figura 12).

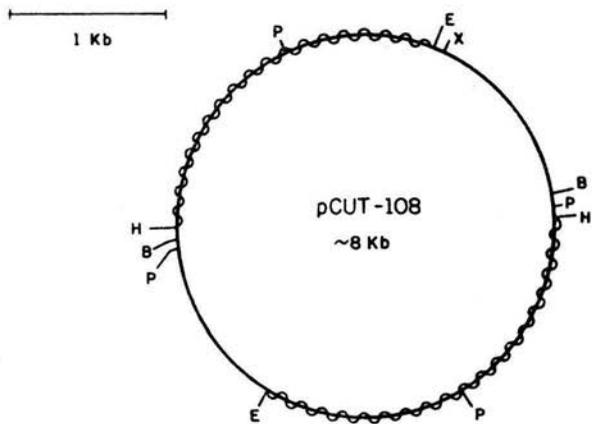
Caracterización de las Secuencias de c-myc y VPH 16 clonadas en pCUT-136. Ante el rearrreglo ocurrido en la clonación, se realizaron digestiones con las enzima Sau 3AI (que reconoce secuencias tetranucleotídicas comunes) para determinar las secuencias virales y celulares clonadas en pCUT-136. De esta forma, los residuos de restricciones parciales Sau3AI del plásmido pCUT-136 fueron subclonados en el vector pUC-19 (Yanisch-Ferron, 1985), para facilitar el análisis de los fragmentos derivados de tumor (Datos no mostrados).

En la figura 13 se muestra que las secuencias tumorales contenidas en pCUT-136 corresponden al exon I de c-myc y el LTR de VPH 16.

Estructura de las Secuencias Clonadas. Los fragmentos provenientes del tumor T68 fueron parcialmente secuenciados por el método de Maxam y Gilbert (1977), y el de Sanger (1977). Se analizó así la estructura nucleotídica de la integración viral en las inmediaciones de c-myc determinándose, por homología a las secuencias reportadas de c-myc y VPH 16 (Gazin, 1984; Seedorf, 1985).

La secuencia PuPuPuPuPyPuPuPuPyPuPuPuPuPu (Fig 14a), se encuentra siete veces dentro del genoma de c-myc, dos de ellas dentro del exon I (bases 1234 y 2606 de la secuencia de Gazin, 1984), y está ausente de los genomas de VPH 16 y pBR-322.

Fig. 12. Mapa de los plásmidos pCUT. BamHI (B). EcoRI (E), Hind III (H), Pvu I (P).

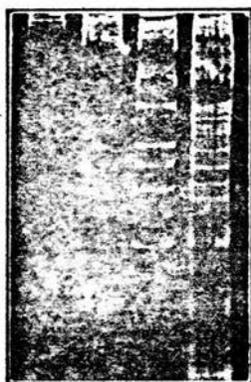


~~~~~ pBR-322

H = Hind III  
 P = Pvu I  
 B = Bam HI  
 E = EcoRI  
 X = Xho I

Fig. 13. Análisis de restricción de los plásmidos pBR-322, pSHPV-16, pCUT-136 y HLMXba con Sau3A1 (Sau). Las llaves indican las bandas comorantes entre pCUT-136, VPH 16 y C-myc.

pBR-322 Sau  
pSHPV-16 Sau  
pCUT-136 Sau  
HLM Xba Sau



800 Secuenci del ICR  
534 de VPH-16

243 Secuencias del  
183  
166 Exon I de c-myc

Kb

Fig. 14. Secuencias parciales del plásmido pCOT-136. a) Regiones relacionadas a c-myc, las reacciones de secuenciación se realizaron de acuerdo a Maxam ( 1977 ) y Kosenthal ( 1985 y 1984 ). Purinas ( Pu ), Pirimidinas ( Pv ).; b) Secuencia relacionada al residuo 100-130 del LCR del VPH 16 en el ADN clonado del tumor T6R, las reacciones fueron realizadas con modificación al método de Sanger ( 1977 ). Adeninas ( A ), Guaninas ( G ), citosinas ( C ) y timinas ( T ).

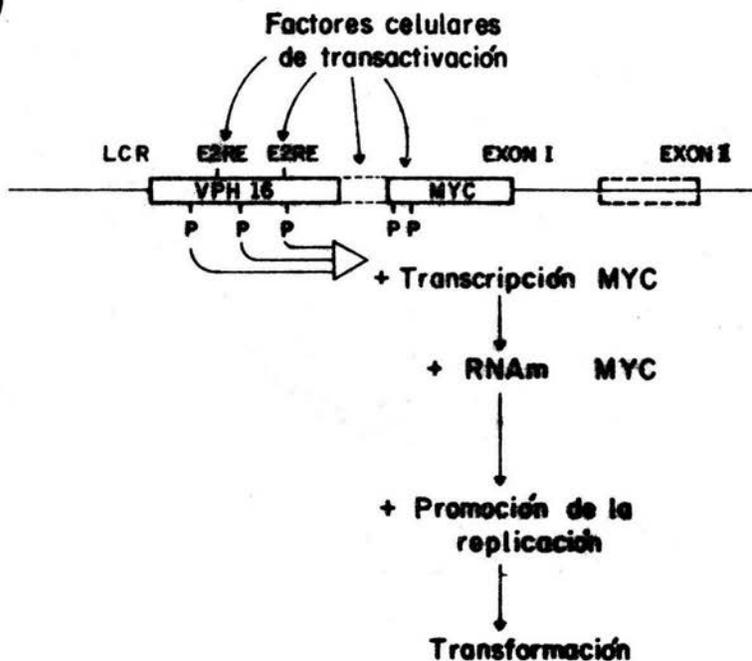


Por su parte la secuencia ilustrada en la figura 14b, muestra alrededor del 80% de homología con la secuencia comprendida entre las bases 100 y 130 dentro del LCR del VPH-16. Esta evidencia sumada a las de hibridización y restricción permiten sugerir que la presencia de secuencias regulatorias virales dentro de un oncogene pueden tener un papel dentro del desarrollo de un tumor.

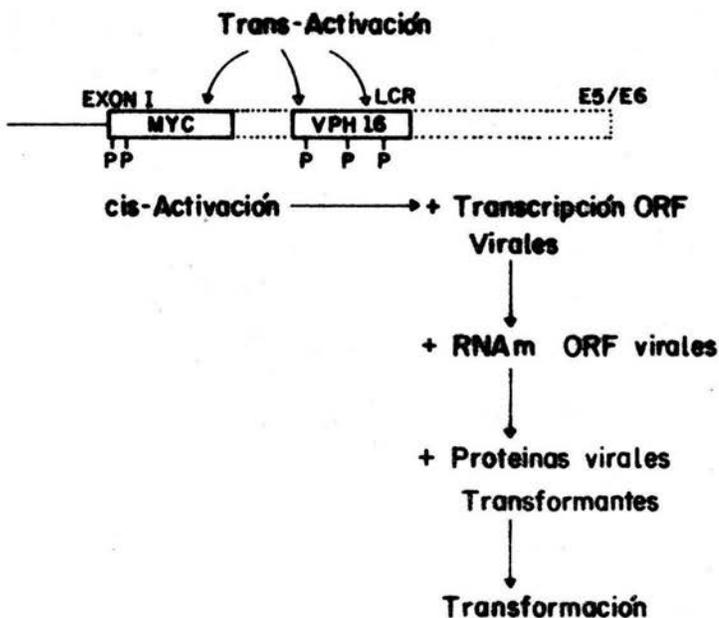
El rearreglo y delección del plásmido impidieron conocer la ubicación y extensión de la integración, no obstante la posibilidad de que las secuencias de c-myc y VPH 16 se hallan unido por este efecto parece remota. De cualquier forma, la clonación de segmentos pertenecientes a c-myc y VPH-16 es evidencia para afirmar que ambas secuencias se encontraban adyacentes en el tumor. Así, se realizaron dos modelos de integración en c-myc por el VPH 16 ( Fig. 15 ), en el que se propone la desregulación de c-myc por la intervención del enhacer viral en la región promotora-reguladora del exon I de c-myc y la probable producción de proteínas virales transformantes por efecto aditivo de los promotores virales y celulares presentes.

Fig. 15. Modelos de integración del VPH 16 en el oncogene c-myc en el tumor 68. A) Ubicación 5' del LCR de VPH 16 en relación a c-myc. B) Ubicación 3' del genoma viral en relación a c-myc. Regiones responsivas a E2 ( E2RE ), promotores transcripcionales virales y celulares ( P ), proteínas virales con actividad transformante ( E5/E6 ).

A)



B)



## DISCUSION

La activación de oncogenes celulares mediante la acción de secuencias virales o sus productos es un fenómeno ya descrito (Durst, 1987). Dada la alta correlación que existe entre la presencia de secuencias virales del VPH 16 integradas al genoma celular con la presencia de carcinomas genitales (Bissman 1986; Lorincz, 1987), la posibilidad de una interrelación virus-célula en el desarrollo de una malignidad se abre con interesantes perspectivas.

El oncogene c-myc se encuentra alterado en un gran número de malignidades (Revisado en Alitalo, 1987), y ya que se encuentra relacionado con la promoción de la replicación en células eucarióticas (Iguchi-Arigo, 1987), es factible que su activación desregulada promueva una proliferación descontrolada de células. Más aún, el hecho de que myc disminuya su transcripción con inductores de la diferenciación (Polack, 1987), indica que la cantidad del producto de c-myc pudiese determinar en un momento dado la génesis de alguna malignidad.

La característica de los papilomavirus de poseer proteínas transactivadoras (E2), similares a las presentes en otros virus de eucariotes (Baker, 1987b; Spalholz, 1987; Thierry, 1987), señala una posible vía de activación de oncogenes con la capacidad de responder a la acción de dichas proteínas. Así, la infección viral llevaría a la producción de elementos regulatorios transactivadores y la integración al genoma celular

propiciaría que esta producción fuese constitutiva llevando así a la activación, también constitutiva, de oncogenes celulares responsivos a ella.

No obstante lo anterior, las observaciones en cuanto a la disrupción de el ORF E2 de los papilomavirus humanos 16 y 18 por efecto de la integración en líneas celulares provenientes de CaCU ( Schwarz, 1986; Baker, 1987a ), parecen apoyar el hecho de que quizás la producción de otras proteínas ( E6 o E7 ), o la actividad de elementos virales cisactivadores sean los responsables del proceso oncogénico.

El cómo un virus es capaz de integrarse a c-myc, y de que este fenómeno sea un hecho generalizado son materia de controversia. Una de las características más interesantes de este estudio, es el hecho de que la integración se llevó a cabo dentro de una región involucrada frecuentemente con fenómenos de translocación ( Ver fig. 1 ). De esta forma puede ser que la secuencia clonada se trate de un rearrreglo secundario a la integración original, ya que el hecho de que se presenten varias secuencias de myc y VPH 16 en el tumor T68 ( Ver fig. 3 ) y que estas no correspondan ni en tamaño ni en características de corte a las de las secuencias completas, sugieren que alguna alteración extra a la integración ocurrió muy probablemente como consecuencia de la misma. La evidencia presentada en este trabajo indica que la integración de secuencias derivadas del VPH 16 se encuentran alrededor del primer exon de c-myc, así un tamaño anormal de una secuencia con una relativamente alta capacidad de

recombinación pudiera propiciar su translocación y/o amplificación, llevando consigo las secuencias adyacentes.

Aunque la inserción de los papilomavirus en el genoma celular es de carácter aleatorio, la presencia de secuencias virales en las inmediaciones de c-myc en un proceso canceroso manifiesta en el tumor T6B, deja entrever la factibilidad de la desactivación de oncogenes por secuencias virales. Así, la inserción de la región promotora y reguladora del papilomavirus ío cerca del exon I de c-myc puede desembocar en dos posibles mecanismos de carcinogénesis ilustrados en la figura 15.

Por un lado ( Fig. 15a ), la inserción del LCR viral cerca o en el exon I de c-myc, puede propiciar la activación del oncogene mediante el uso de los 4 promotores virales presentes en el LCR ( P7185, P7940, PB9 y PL ), o la acción de los elementos potenciadores ( enhancer ) responsivos a señales de regulación transcripcional aparentemente comunes entre eucariontes que posee ( E2RE ); esto llevaría a que la transcripción de myc se viera aumentada al responder a sus propias señales de activación con el efecto aditivo de los elementos de regulación virales. Con una mayor producción de RNAm de myc, la cantidad de su proteína pudiera ser mayor a la normal, promoverse una acelerada proliferación celular que impediría la diferenciación normal de la célula infectada, teniendo así el desarrollo del tumor.

Dado a que el exon I de c-myc juega un papel en la regulación transcripcional del oncogene, existe la posibilidad de que los promotores y elementos cisregulatorios que posee propicien la sobreproducción de proteínas virales con un conocido

efecto transformante ( E5, E6 o E7 ), o bien que por efecto de la integración, el virus pierda su propia regulación y sea manejado por secuencias y/o factores regulatorios celulares. De esta manera, la producción de proteínas virales se vería asociada directamente a la activación de myc, posiblemente en el momento en que la célula afectada se prepara para dividirse ( Fig. 15b ). Es decir, cada vez que la célula promueve la replicación de su ADN, estará produciendo una mayor cantidad de proteínas virales transformantes y así, un proceso oncogénico tiene la oportunidad de desarrollarse.

A estas posibilidades hay que añadir el hecho de que las secuencias están amplificadas, es decir, existen un gran número de copias dentro del genoma celular, y así la cantidad de sus productos fuera quizás mayor a lo que podría esperarse por lo ya descrito, o bien que se presentase un arreglo de secuencias virales orientadas en línea e invertidas respecto al sentido 5'-3' de la transcripción. Con el hecho de que las dos cadenas de c-myc son transcritas ( Kindy, 1987; Nepveu, 1987 ), se podría propiciar que ambos efectos de integración ocurriesen simultáneamente, dependiendo de la orientación de la inserción. Esto es, que si la inserción en línea del virus propicia la desregulación de c-myc en su cadena con sentido, la cadena sin sentido del oncogene podría promover la transcripción de las secuencias virales que estuvieran invertidas, teniendo así, ambos efectos al mismo tiempo.

La producción de proteínas híbridas virales-celulares es un hecho que no se descarta con la evidencia presentada. Sin

embargo, el LCR de VPH 16 y el exon I de c-myc son regiones no traducidas ( Aunque Gazin ( 1986 ), reporta la existencia de un péptido codificado por el exon I que de cualquier forma es independiente a la proteína myc ), así no existe evidencia para sospechar la presencia de productos híbridos.

Desafortunadamente, la delección comprendida durante la clonación nos impide conocer con certeza cual de las posibilidades descritas es la correcta. No obstante, definitivamente es factible el hecho de que la inserción estudiada pudiese desembocar en el desarrollo de un cáncer y sienta un precedente al estudiar con mas profundidad otros tumores con características similares.

Con la clonación de fragmentos adyacentes de VPH 16 y c-myc provenientes del tumor T6B, es posible afirmar que estas secuencias se encontraban asociadas en el genoma del tumor y ésta asociación puede hipotéticamente ser capaz de generar un fenotipo transformado, sin embargo queda por demostrar la significancia biológica de esta relación estructural.

No obstante, el hecho de que la relación estudiada comprenda dos regiones de regulación genética dentro de sus respectivos genomas ( exon I de c-myc y LCR de VPH 16 ), da la pauta para profundizar en el estudio de la interrelación a nivel estructural y funcional entre oncogenes y virus en el cáncer cérvico-uterino.

## GLOSARIO

**ADN Ligasas.** Enzimas que catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre dos extremos de ADN, uno con un grupo 3'-OH y el otro con el grupo 5'-P.

**ADN Polimerasas.** Enzimas cuya función consiste en sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de una cadena doble.

**Astringencia.** Condición de fuerza iónica y temperatura ó concentración de formamida en que se permite la hibridización de cadenas de ADN.

**Desactivación.** Regulación transcripcional de genes ubicados en la misma secuencia de ADN que los elementos de control ( Promotores, Potenciadores, etc. )

**Endonucleasa.** ADNasa que hidroliza ADN en secuencias que no se ubican en los extremos.

**Enzima de Restricción.** Endonucleasas secuencia-específicas. Hidrolizan el ADN dejando extremos simétricos ( Rasurados ) o asimétricos ( Cohesivos ).

**Exonucleasa.** ADNasa que hidroliza ADN a partir de sus extremos.

**Hibridización.** Enlace de cadenas sencillas y complementarias de ADN.

Marco de Lectura Abierta ( ORF ). Región comprendida entre un codón de iniciación ( AUG ), y un codón de terminación ( UAG ).

Oncogene. Versión alterada de un protooncogene, asociada generalmente a un proceso canceroso.

Plásmido. Cadena circular extracromosomal de ADN, con replicación y transcripción autónoma.

Promotor. Secuencia de ADN de la cual se origina la transcripción. Se caracteriza por poseer las regiones consenso CAAT y TATA, que se supone intervienen en la unión y alineamiento de la ARN polimerasa.

Región Potenciadora ( Enhancer ). Secuencia de ADN que aumenta la transcripción de un promotor determinado, independientemente de su distancia u orientación respecto del promotor.

Replicón. Unidad de material genético con la información necesaria para autoduplicarse.

Transactivación. Regulación transcripcional de genes ubicados en secuencias de ADN distintas a los elementos de control.

Transformación. Pérdida de la regulación reproductiva y metabólica de células eucarióticas en cultivo. Mecanismo mediante el cual ADN libre en el medio, penetra y se expresa en células bacterianas.

Vector de Clonación. Cadena de ADN ( plásmido o virus ), con alta capacidad replicativa . Posee marcadores genéticos ( Resistencia a antibióticos, expresión de enzimas, etc. ) que permiten seleccionarlos y sitios de inserción de secuencias heterólogas de ADN en su genoma.

## APENDICE

### Acetato de Potasio 5M ( Acetato 3M )

60 ml de Acetato de Potasio 5M  
11.5 ml de Acido Acético Glacial  
28.5 ml de Agua.

### Acrilamida 40 %

190 gr de Acrilamida

10 gr de Bis-acrilamida

Disolver con 500 ml de agua bidestilada. Este reactivo es neurotóxico. Usar guantes y tapabocas para manejarlo.

### ADN sonicado de esperma de salmón 10 mg/ml

Agitar a ebullición la cantidad de ADN deseada en agua bidestilada de 2 a 4 hrs. Pasar varias veces por una aguja de jeringa calibre 18. Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ajustar a pH 4.8. Esterilizar por autoclave.

### Ampicilina 25 mg/ml

Añadir la cantidad deseada de ampicilina a la cantidad adecuada de agua bidestilada. Ajustar a pH 8.0 con NaOH 2N para disolver. Alicuotar y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Bromuro de Etidio 10 mg/ml

1 gr de Bromuro de Etidio

100 ml de Agua bidestilada

Agitar varias horas. Este compuesto es un mutágeno extremadamente activo. Manejar con guantes y tapabocas.

Cloranfenicol 34 mg/ml

Disolver la cantidad deseada en etanol absoluto. Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

DIT 1M

3.09 gr de DIT

20 ml de Acetato de Sodio 0.01M pH 5.2.

Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Muy volátil

EDTA 0.5M

168.1 gr EDTA dibásico

500 ml de agua bidestilada

Agitar y ajustar a pH 8.0 con NaOH para disolver. Autoclavear.

Solución Derhardt 50X

5 gr Ficoll 400

5 gr Polivinilpirrolidona

5 gr Albumina Sérica Bovina ( Pentax Fraccion U )

Disolver en 500 ml de agua bidestilada. Filtrar por Millipore 0.45  $\mu$  ). Almacenar a  $20^{\circ}\text{C}$ .

## Solución Salina-Citrato 20X ( SSC )

175.3 gr de Cloruro de Sodio

86.2 gr Citrato de Sodio

Disolver en 800 ml de agua bidestilada. Ajustar a pH 7.0. Aforar a 1 lit y esterilizar por autoclave.

## Solución Tris-Boratos EDTA 10X ( TBE )

108 gr Trizma-base

55 gr Acido bórico

6.72 gr EDTA

Disolver en 800 ml de agua bidestilada y ajustar a pH 8. Aforar a 1 lit.

## Solución Tris-EDTA 10X ( TE )

50 ml de Tris-HCl 1M pH 8.0

10 ml de EDTA 0.5M

Añadir agua bidestilada cbp 500 ml.

Tetraciclina 12.5 mg/ml

Disolver la cantidad deseada en agua bidestilada. Alicuotar y guardar a  $-20^{\circ}$  C en oscuridad.

Tris-HCl 1M

121.1 gr Trizma-base

300 ml de agua bidestilada

Ajustar el pH deseado con HCl concentrado. Aforar a 1 lit.

## BIBLIOGRAFIA

Alessandra, E.; et al. ( 1982 ). Cellular Genes Analogous to Retroviral onc Genes are Transcribed in Human Tumour Cells. Nature, 295: 116.

Alitalo, K.; et al. ( 1987 ). myc Oncogenes: Activation and Amplification. Biochemica et Biophysica Acta, 907: 1.

Ar-Rushdi, A.; et al. ( 1983 ). Differential Expression of the Translocated and the Untranslocated c-myc Oncogene in Burkitt Lymphoma. Science, 222: 390.

Baker, C.C.; et al. ( 1987a ). Structural and Transcriptional Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Sequences in Cervical Carcinoma Cell Lines. J. of Virology, 61: 962.

Baker, C.C. y Howley, P.M.. ( 1987b ). Differential Promoter Utilization by the Bovine Papillomavirus in Transformed Cells and Productively Infected Wart Tissues. EMBO J., 6: 1027.

Barnes, W.M.. ( 1977 ). Plasmid Detection and Sizing in Single Colony Lysates. Science, 195: 393.

Barroso, E.; et al . ( 1986 ). Registro Nacional de Cancer; Estado Actual y Perspectivas. Rev. del INC, 32: 190.

Bedbrook, J. R. y Ausubel, F.M.. ( 1976 ). Recombination Between Bacterial Plasmids Leading to the Formation of Plasmids Multimers. Cell, 7: 707.

Broome, H.E.; et al. ( 1987 ). Differential Promoter Utilization by the c-myc Gene in Mitogen- and Interleukin-2

--Stimulated Human Lymphocytes. Mol. and Cell. Biol., 7: 2988.  
Cole, S.T. y Danos, O.. ( 1987 ). Nucleotide Sequence and  
Comparative Analysis of the Human Papillomavirus Type 18 Genome.  
J. Mol. Biol., 193: 599.

Collins, S. y Groudine, M.. ( 1982 ). Amplification of  
Endogenous myc-Related DNA Sequences in a Human Myeloid Leukaemia  
Cell Line. Nature, 298: 679.

Chow, L.T.; et al. ( 1987 ). Human Papillomavirus Gene  
Expression. Cancer Cells, 5: 55.

Danos, O. y Yaniv, M.. ( 1987 ). E6 and E7 Gene Products  
Evolved by Amplification of a 33 Amino-acid Peptide with a  
Potential Nucleic-Acid-Binding Structure. Cancer Cells, 5: 145.

Dony, C.; Kessel, M. y Gruss, P.. ( 1985 ). Post  
Transcriptional Control of myc and p53 Expression During  
Differentiation of the Embryonal Carcinoma Cell Line F9. Nature,  
317: 636.

Dretzen, G.; et al. ( 1981 ). A New and Reliable Method for  
Extract DNA From Agarose and Acrylamide Gels. Anal. Biochem.,  
112: 295.

Durst, M.; et al. ( 1983 ). A Papillomavirus DNA From a  
Cervical Carcinoma and its Prevalence in Cancer Biopsy Samples  
From Different Geographic Regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:  
3812.

Durst, M. ; et al. ( 1985 ). The Physical State of Human  
Papillomavirus Type 16 Dna in Benign and Malignant Genital  
Tumors. J. of Gen. Virol, 66: 1515.

Durst, M. ; Schwarz, E. y Gissman, L..( 1986 ). Integration and Persistence of Human Papillomavirus DNA in Genital Tumors. En Peto, R. y Zur Hausen, H. ( eds. ). Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21, CSH Laboratory Press, USA.

Durst, M.; et al. ( 1987 ). Papillomavirus Sequences Integrate Near Cellular Oncogenes in some Cervical Carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1070.

Eick, D.; et al. ( 1985 ). Aberrant c-myc RNAs of Burkitt's Lymphoma Cells have Longer Half-Lives. EMBO J., 4: 3717.

Gariglio, P.; et al. ( 1987a ). Theoretical Model for the Post-Transcriptional Regulation of the Human c-myc Gene Expression, Involving Double Stranded RNA Processing. J. theor. Biol., 125: 83.

Gariglio, P; Ocádiz, R. y Saucedo, R.. ( 1987b ). Human Papillomavirus DNA Sequences and c-myc Oncogene Alterations in Uterine Cervix Carcinoma. Cancer Cells, 5: 343.

Gazin, C.; et al. ( 1984 ). Nucleotid Sequence of the c-myc locus: Provocative Open Reading Frame Within the First Exon. EMBO J., 3: 383.

Gazin, C.; et al. ( 1986 ). Immunochemical Detection of Proteins Related to the Human c-myc Exon 1. EMBO J., 5: 2241.  
Gissman, L. y Schneider, A..( 1986 ). Human Papillomavirus DNA in Preneoplastic and Neoplastic Genital Lesions. En Peto, R. y Zur Hausen, H. ( eds. ). Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21, CSH Laboratory Press, USA.

Haluska, F.G.; Tsujimoto, Y. y Croce, C.M.. ( 1987 ).  
Oncogene Activation by Chromosome Translocation in Human  
Malignancy. *Ann. Rev. Genet.*, 21: 321.

Hann, S.R. y Einsenman, R.N.. ( 1984 ). Proteins Encoded by  
the Human c-myc Oncogene: Differential Expression in Neoplastic  
Cells. *Mol. and Cell. Biol.*, 4: 2486.

Haugen, T.H.; et al. ( 1987 ). Trans-Activation of an  
Upstream Early Gene Promoter of Bovine Papillomavirus 1 by a  
Product of the Viral E2 Gene. *EMBO J.*, 6: 145.

Hayday, A.C.; et al. ( 1984 ). Activation of a Translocated  
Human c-myc Gene by an Enhancer in the Immunoglobulin Heavy-Chain  
Locus. *Nature*, 307: 334.

Hayward, W.S.. ( 1983 ). The v-myc and c-myc Genes: Roles in  
Oncogenesis. En Weinstein, I.B. y Vogel, H.J. ( eds. ). *Genes and  
Proteins in Oncogenesis*. Academic Press, USA.

Howley, P.M.; et al..( 1986 ). Molecular Aspects of  
Papillomavirus-Host Cell Interactions. En Peto, R. y Zur Hausen,  
H. ( eds. ). *Viral Etiology of Cervical Cancer*. Banbury Report  
21, CSH Laboratory Press, USA.

Hughes, C. y Meynell, C.. ( 1977 ). Rapid Screening for  
Plasmid DNA. *Mol. gen. Genet.*, 151: 175.

Iguchi-Ariga, S.M.M.; et al. ( 1987 ). Possible Function of  
the c-myc Product: Promotion of Cellular DNA Replication. *EMBO J.*  
, 6: 2365.

Iida, S.; Meyer, J. y Arber, W.. ( 1983 ). Prokariotic IS  
Elements. En Shapiro, J.A. ( ed. ). *Mobile Genetic Elements*.  
Academic Press, USA.

Kindy, M.S.; et al. ( 1987 ). Independent Regulation of Transcription of the Two Strands of the c-myc Gene. Mol. and Cell. Biol., 7: 2857.

Kopecko, D.J. y Cohen, S.N.. ( 1975 ). Site-Specific rec-A Independent Recombination Between Bacterial Plasmids: Involvement of Palindromes at the Recombinational Loci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 1373.

Lambert, P.F.; Spalholz, B.A. y Howley, P.M.. ( 1987 ). Evidence that Bovine Papillomavirus Type 1 may Encode a Negative Transcriptional Regulatory Factor. Cancer Cells, 5: 15.

Leder, P.; et al. ( 1983 ). Translocations Among Antibody Genes in Human Cancer. Science, 222: 765.

Lehn, H.. ( 1986 ). Human Papillomavirus DNA Replication Mediated by Simian Virus 40 T Antigen in Trans. J. gen. Virol., 67: 1581.

Little, C.D.; et al. ( 1983 ). Amplification and Expression of the c-myc Oncogene in Human Lung Cancer Lines. Nature ( London ), 306: 194.

Lorincz, A.T.; et al. ( 1987 ). Oncogenic Association of Specific Human Papillomavirus Types With Cervical Neoplasia. JNCI, 79: 671.

Mallon, R.G.; Wojciechowicz, D. y Defendi V.. ( 1987 ). DNA-Binding Activity of Papillomavirus Proteins. J. of Virology, 61: 1655.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F. y Sambrook, J.. ( 1982 ). Molecular Cloning; A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, USA.

Maxam, A.M. y Gilbert, W.. ( 1977 ). A New Method for Sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 560.

Miyamoto, C.; et al. ( 1985 ). Molecular Cloning and Regualted Expression of the c-myc Gene in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae: Comparision of the Protein Products. Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 82: 7232.

Nepveu, A.; et al. ( 1987 ). Alternative Modes of c-myc Regulation in Growth Factor-Stimulated and Differentiating Cells. Oncogene, 1: 243.

Nishimura, S. y Sekiya, T.. ( 1987 ). Human Cancer and Cellular Oncogenes. Biochem. J., 243: 313.

Ocadiz, R; et al. ( 1987 ). High Correlation between Molecular Alterations of the c-myc Oncogene and Carcinoma of the Uterine Cervix. Cancer Research, 47: 4173.

Persson, H.; et al. ( 1984 ). Antibodies to Human c-myc Oncogene Product: Evidence of an Evolutionary Conserved Protein Induced During Cell Proliferation. Science, 225: 687.

Phelps, W.C. y Howley, P.M.. ( 1987 ). Transcriptional Trans-Activation by the Human Papillomavirus Type 16 E2 Gene Product. J. of Virology, 61: 1630.

Pirisi, L.; et al. ( 1987 ). Transformation of Human Fibroblasts and Keratinocytes with Human Papillomavirus DNA. J. of Virology, 61: 1061.

Polack, A.; et al. ( 1987 ). Trucation does not Abrogate Transcriptional Downregulation of the c-myc Gene by Sodium Butyrate in Burkitt's Lymphoma Cells. EMBO J., 6: 2959.

Rabitts, P.H.; et al. ( 1985 ). Truncation of Exon I from the c-myc Gene Results in Prolonged c-myc mRNA Stability. EMBO J., 4: 3727.

Ralston, R. y Bishop, J.M.. ( 1984 ). Evolutionary Relationships Among Oncogenes of DNA and RNA Tumor Viruses: myc, myb and Adenovirus E1A. Cancer Cells, 2: 165.

Ramsay, G.; Evan, G.I. y Bishop, M.. ( 1984 ). The Protein Encoded by the Human Protooncogene c-myc, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7742.

Rooney, C.M.; et al. ( 1986 ). Endemic Burkitt's Lymphomas: Phenotypic Analysis of Tumor Biopsy Cells and of Derived Tumor Cell Lines. JNCI, 77: 681.

Rosenthal, A.; et al. ( 1985 ). Solid-Phase Methods for Sequencing of Nucleic Acids I. Simultaneous Sequencing of Different Oligodeoxyribonucleotides Using a New, Mechanically Stable-Anion Exchange Paper. Nucl. Acid. Res., 13: 1173.

Rosenthal, A.; Jung, R. y Hunger, H.. ( 1986 ). Optimized Conditions for Solid-Phase Sequencing: Simultaneous Chemical Cleavage of a Series of Long DNA Fragments Immobilized on CCS Anion-Exchange Paper. Gene, 42: 1.

Saito, H.; et al. ( 1983 ). Activation of the c-myc Gene by Translocation: A Model for Translational Control. Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 7476.

Sanger, F.; Nicklen, S. y Coulson, A.R.. ( 1977 ). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463.

Sanger, F. y Coulson, A.R.. ( 1978 ). The Use of Thin Acrylamide Gels for DNA Sequencing. FEBS Lett., 87: 107.

Sakaguchi, A.Y.; Lalley, P.A. y Naylor, S.L.. ( 1983 ). Human and Mouse myc Protooncogenes Reside on Chromosomes Involved in Numerical and Structural Aberrations in Cancer. Som. Cell Gen., 9: 391.

Sassone-Corsi, P. y Borrelli, E.. ( 1987 ). Promoter Transactivation of Protooncogenes c-fos and c-myc, but Not c-Ha-ras, by Products of Adenovirus Early Region 1A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 6430.

Schneider-Hanoury, S.; Croissant, D. y Orth, G. ( 1987 ). Integration of Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequences: a Possible Early Event in the Progression of Genital Tumors. J. of Virology, 61: 3295.

Schwarz, E.; et al.. ( 1986 ). Expression of Human Papillomavirus DNA in Cervical Carcinoma Cell Lines. En Peto, R. y Zur Hausen, H. ( eds. ). Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21, CSH Laboratory Press, USA.

Seedorf, K.; et al. ( 1985 ). Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequence. Virology, 145: 181.

Sheiness, D.K.; et al. ( 1980 ). The Vertebrate Homolog of the Putative Transforming Gene of AMV: Characteristics of the DNA Locus and its Transcripts. Virology, 105: 415.

Smotkin, D. y Wettstein, F.D.. ( 1986 ). Transcription of Human Papillomavirus Type 16 Early Genes in a Cervical Cancer and Cancer-Derived Cell Line and Identification of the E7 Protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 4680.

Smotkin, D. y Wettstein, F.O.. ( 1987 ). The Major Human Papillomavirus Protein in Cervical Cancer is a Cytoplasmatic Phosphoprotein. *J. of Virology*, 61: 1686.

Southern, E.M.. ( 1975 ). Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. of Mol. Biol.*, 98: 503.

Spalholz, B.A.; et al. ( 1987 ). Bovine Papillomavirus Transcriptional Regulation: Localization of the E2-Responsive Elements of the Long Control Region. *J. of Virology*, 61: 2128.

Stone, J.; et al. ( 1987 ). Definition of Regions in Human c-myc That Are Involved in Transformation and Nuclear Localization. *Mol. and Cell. Biol.*, 7: 1697.

Telford, J.; et al. ( 1977 ). Novel Screening Procedure for Recombinant Plasmids. *Science*, 195: 391.

Thierry, F.; Carranca, A.G. y Yaniv, M.. ( 1987a ). Elements that Control the Transcription of Genital Human Papillomavirus Type 18. *Cancer Cells*, 5: 23.

Thierry, F.; et al. ( 1987b ). Characterization of a Transcriptional Promotor of Human Papillomavirus 18 and Modulation of its Expression by Simian Virus 40 and Adenovirus Early Antigens. *J. of Virology*, 61: 1.

Watt, R.A.; Shatzman, A.R. y Rosenberg, M.. ( 1985 ). Expression and Characterization of the Human c-myc DNA-Binding Protein. *Mol. and Cell. Biol.*, 5: 448.

Yanisch-Perron, C.; Viera, J. y Messing, J.. ( 1985 ). Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors. *Gene*, 33: 103.

Zur Hausen, H. ( 1981 ). Papilloma Viruses. En Troze, J. ( ed. ). DNA Tumor Viruses. CSH Laboratory Press, USA.