

03072

**IMPLANTACIÓN DE TÉCNICAS
MOLECULARES PARA DETERMINAR EL
ESTADO DE p53 EN TUMORES Y LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER CÉRVICO
UTERINO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JESÚS AGUIRRE HERNÁNDEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Insurgentes Sur y Circuito Escolar. Ciudad Universitaria. México, D. F. Código Postal: 04510

UNAM - CCH

**PROYECTO ACADÉMICO DE
LICENCIATURA, MAESTRIA Y DOCTORADO
EN BIOTECNOLOGIA**

OF. AAC/089/97

**DR. ENRIQUE PÍÑA GARCÍA
DIRECTOR GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSGRADO
P R E S E N T E**

Por este conducto hago de su conocimiento que el Comité Académico del Instituto de Biotecnología y el Dr. Patricio Gariglio Vidal tutor del Biol. Jesús Aguirre Hernández dan su apoyo para que, de acuerdo con el artículo 34 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UNAM, pueda presentar el examen para la obtención del grado de maestro en Biotecnología.

Sin otro particular aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. 18 de noviembre de 1997


DR. ALEJANDRO ALAGON CANO
Coordinador de Sede

A mi familia

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CÁNCER CÉRVICO UTERINO.....	2
VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH).....	4
LOS VPH Y EL CÁNCER CÉRVICO UTERINO.....	5
GEN SUPRESOR DE TUMORES p53.....	10
VPH Y p53 EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	17
PULVERIZACIÓN DE LAS BIOPSIAS.....	17
EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	17
EXTRACCIÓN DE ADN.....	18
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES.....	19
PCR PARA AMPLIFICAR β -GLOBINA.....	20
RT-PCR DE p53.....	20
PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR.....	21
a) PURIFICACIÓN POR MEDIO DE MINICOLUMNAS.....	21
b) PURIFICACIÓN POR GEL Y PRECIPITACIÓN.....	22
c) PURIFICACIÓN POR GEL Y MINICOLUMNAS.....	23
SECUENCIACIÓN DE p53.....	23
RESULTADOS	25
MUESTRAS Y LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.....	25
DELIMITACIÓN DE LA REGIÓN A ESTUDIAR EN p53 Y DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.....	26
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	30
PCR DE β -GLOBINA.....	30
RT-PCR DE p53.....	32
PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR Y SECUENCIACIÓN.....	32
DISCUSIÓN	36
OLIGONUCLEÓTIDOS.....	37
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	37
PCR DE β -GLOBINA.....	39
RT-PCR DE p53.....	41
SECUENCIACIÓN.....	42
REFERENCIAS	48

RESUMEN

En México el cáncer es un problema importante de salud pública ya que ocupa el segundo lugar como causa de muerte. Aquí, el cáncer más frecuente es el cérvico uterino, que comprende casi la cuarta parte de todos los casos de cáncer, y se calcula que por su causa muere una mujer mexicana cada tercer hora. Casi todos los casos de cáncer cervical están asociados con la presencia de secuencias genéticas del virus de papiloma humano (VPH). El VPH, por sí solo, no causa el cáncer de cérvix, pero sí tiene un papel importante en su aparición por medio de las proteínas E7 y E6 codificadas en el genoma viral. E7 induce mutaciones y rearrreglos cromosómicos en el genoma celular, mientras que la interacción de E6 con la proteína celular p53 impide que ésta participe en la reparación del daño genético. p53 es el gen que está mutado con más frecuencia en cánceres humanos. En cáncer de cérvix se ha detectado una correlación negativa entre la presencia de ADN de VPH de alto riesgo y la alteración de p53. Se ha pensado que esta relación inversa se debe a que la proteína E6, de VPH de alto riesgo, provoca la degradación acelerada de p53. No obstante, algunas observaciones permiten suponer que la relación entre E6 y p53 en cáncer cervical podría no ser tan sencilla como se pensaba. Por ejemplo, si bien E6 propicia la degradación acelerada de p53 *in vitro*, no está claro que esto mismo ocurra *in vivo*; adicionalmente, en muestras de tumores no es universal la relación inversa entre presencia de ADN de VPH de alto riesgo y mutaciones de p53. En este trabajo se implementaron las técnicas necesarias para obtener ácidos nucleicos de biopsias y líneas celulares de cáncer cervical, para amplificar por RT-PCR los transcritos de estas muestras, y para secuenciar el ADN de p53, con la intención de que esto permita conocer la frecuencia y la distribución de las mutaciones en el gen p53 en tumores cervicales.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER CÉRVICO UTERINO.

El cáncer es un problema importante de salud pública en México. De acuerdo con las estadísticas más recientes, en 1994 hubo 62,725 casos nuevos de cáncer, de los cuales casi dos tercios (el 64.7%) se presentaron en mujeres (SSA, 1996). Estos datos se refieren a la **incidencia** de cáncer. En lo concerniente a la **mortalidad**, datos del INEGI y la SSA, para ese mismo año, indican que el cáncer ocupó el segundo lugar como causa de **muerte** (véase la Tabla 1).

Tabla 1. Principales causas de mortalidad en México, 1994 (INEGI/SSA).

Posición	Causa	Defunciones	%
1	Enfermedades del corazón	60,773	14.50
	-Isquémica	36,025	8.59
2	Tumores malignos	46,423	11.07
	1. Tráquea, bronquios y pulmón	5,847	1.39
	2. Estómago	4,671	1.11
	3. Cuello del útero	4,365	1.04
3	Accidentes	37,234	8.88
	-De tránsito	14,409	3.43
4	El resto	274,644	65.55
TOTAL		419,074	100.00

El cáncer más frecuente en el país es el cérvico uterino (Tabla 2). En 1994 hubo 14,554 casos, que equivalen casi a la cuarta parte de todos los cánceres de ese año y a poco más de un tercio de los casos que se presentaron en la población femenina (Tabla 3) (SSA, 1996). Esto por lo que toca a la **incidencia del cáncer cervical**. En cuanto a **muerdes**, en 1994 el cérvico uterino ocupó el tercer lugar en muertes provocadas por tumores malignos, con 4,365 decesos (Tabla 1), y fue superado únicamente por el cáncer de tráquea, bronquios y pulmón, que ocupó el primer lugar (5,847 muertes), y por el de estómago (4,671 decesos).

Se calcula que muere una mujer mexicana cada tercer hora a causa del cáncer de cérvix (12 muertes diarias) (SSA, 1996).

Tabla 2. Incidencia de cánceres por topografía general en México, 1994.
Fuente: RIIINMM/DGIE/SSA (SSA, 1996).

Lugar	Topografía	Número	%
1	Cuello del útero	14,544	23.2
2	Mama femenina	6,406	10.2
3	Glándula prostática	3,071	4.9
4	Linfomas	2,781	4.4
5	Estómago	2,343	3.7
6	Tejidos blandos	1,691	2.7
7	Leucemias agudas	1,651	2.6
8	Primario desconocido	1,534	2.4
9	Tráquea, bronquios y pulmón	1,455	2.3
10	Ovario, trompa de falopio y ligamento ancho	1,354	2.2
11	El resto	25,845	41.24
Total		62,675	100.00

Tabla 3. Incidencia de cánceres por topografía en la mujer en México, 1994.
Fuente: RIIINMM/DGIE/SSA (SSA, 1996).

Lugar	Topografía	Número	%
1	Cuello del útero	14,544	35.9
2	Mama femenina	6,406	15.8
3	Ovario, trompa de falopio y ligamento ancho	1,354	3.3
4	Linfomas	1,164	2.9
5	Cuerpo del útero	1,049	2.6
6	Estómago	1,004	2.5
7	Primario desconocido	910	2.2
8	Glándula tiroidea	894	2.2
9	Tejidos blandos	791	2.0
10	Leucemias agudas	781	1.9
11	El resto	11,647	28.73
Total		40,544	100.00

Los casos de cáncer de cérvix pueden dividirse en dos grupos:

- los que están asociados con secuencias de virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo, que son la mayoría (85% o más de los casos) (Kurmann y cols., 1992; Schneider, 1994); y
- aquéllos cuya causa se desconoce (no están asociados con la presencia de secuencias de VPH y se desconocen las alteraciones genéticas que lo provocan).

VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH).

Los VPH son virus de la familia Papovaviridae (Kurmann y cols., 1992; Pfister y Fuchs, 1994). Tienen una cápsula icosaédrica compuesta principalmente por la proteína L1 y, en menor medida, por la L2. Su genoma es una cadena doble de ADN circular de alrededor de 8kb, que contiene seis genes de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6, E7), dos de expresión tardía (L1 y L2), y una región reguladora conocida como región larga de control (RLC). Se conocen más de 70 tipos de VPH, que se encuentran en diferentes partes del cuerpo, y aproximadamente 20 de ellos han sido hallados en la región anogenital (zur Hausen y de Villiers, 1994). De estos últimos, algunos, como los tipos 6 y 11, se presentan en lesiones benignas como el condiloma acuminata, rara vez en lesiones malignas. Por esta razón se les conoce como VPH de bajo riesgo. Hay otros cuyo material genético frecuentemente se encuentra en lesiones invasoras, así que son considerados VPH de alto riesgo: tipos 16 y 18. Finalmente, otros son considerados de riesgo intermedio (31, 33, 51 y 52) ya que su material genético se presenta en neoplasias malignas aunque con menos frecuencia que los tipos 16 y 18 (zur Hausen y de Villiers, 1994).

Los VPH infectan células epiteliales del estrato basal, que son indiferenciadas y tienen la capacidad de dividirse; en condiciones normales algunas de las células de la capa basal dejan de dividirse, migran hacia la superficie del epitelio, y en el camino van diferenciándose hasta morir. La replicación del material genético viral, la expresión de sus genes, la síntesis de proteínas de la cápsula, el ensamblado de la partícula viral y su liberación para infectar otros individuos, dependen totalmente de éste proceso de diferenciación y muerte de las células epiteliales. Por ejemplo, en las células de la capa basal no hay replicación del genoma viral; en las células que abandonan esa capa se expresan los genes tempranos E6 y E7, pero estos no se transcriben en las células diferenciadas; es en el estrato granuloso donde se observa replicación del ADN viral y síntesis de proteínas de la cápsula; tanto *in vivo* como *in vitro* (sistemas de cultivo organotípicos), la formación de partículas virales está restringida a las células diferenciadas (Meyers y Laimins, 1991; Fuchs y Pfister, 1994; McDougall, 1994).

Como resultado de la infección por VPH, las células huésped presentan un aumento en la actividad mitótica y un retraso en su diferenciación y senescencia. Sin embargo, no escapan a la diferenciación ni a la muerte, las cuales permiten la liberación de partículas virales susceptibles de infectar a otros individuos. No se sabe a qué se deben el aumento en la actividad mitótica y los retrasos en la diferenciación y en la senescencia (zur Hausen, 1994; zur Hausen y de Villiers, 1994). Estos efectos no pueden atribuirse a la interacción de las proteínas E6 y E7, codificadas por el genoma viral, con las proteínas celulares p53 y Rb, respectivamente, que son supresoras de tumores y que participan en el control del ciclo celular. Esto se entiende cuando se toma en cuenta que las proteínas E6 y E7 de VPH de bajo riesgo tienen una baja afinidad por p53 y Rb y, a pesar de esto, esos VPH provocan una estimulación exuberante de la proliferación celular y un retraso en la diferenciación (zur Hausen, 1994; zur Hausen y de Villiers, 1994).

LOS VPH Y EL CÁNCER CÉRVICO UTERINO.

La infección por VPH de alto riesgo tiene un papel importante en la génesis del cáncer cervical, como lo atestiguan numerosas observaciones, entre las cuales se cuentan las siguientes (Kurmann y cols., 1992; Fisher, 1994; McDougall, 1994; Schiffman, 1994; Schneider, 1994; Stöppler y cols., 1994):

1. La tasa de positividad para ADN de VPH en biopsias de mujeres con cáncer cervical (hasta el 96%) es mucho más alta que en la población en general.
2. Mujeres con historia de lesiones intraepiteliales escamosas son también más frecuentemente positivas para VPH que las controles.
3. La presencia de VPH aumenta linealmente con la severidad de la displasia cervical.
4. Hay una relación inversa entre la presencia de VPH 6 u 11 y el nivel de la neoplasia, y hay una relación directa entre la presencia de VPH 16 o 18 y la severidad de la displasia.
5. El riesgo de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grado I de progresar a NIC-III es mayor si tienen ADN de VPH de alto riesgo, que si éste es de bajo riesgo.
6. Hay similitudes en los factores de riesgo para infección por VPH y cáncer de cérvix que apoyan la relación entre ambos; por ejemplo, el número de parejas sexuales aumenta el

riesgo de positividad para VPH, y la primera relación sexual temprana aumenta el riesgo de cáncer cervical.

7. El estado físico del genoma viral difiere en el cáncer, ya que se integra al ADN de la célula huésped, en contraste con el ADN viral libre en lesiones no malignas.
8. Los carcinomas cervicales tienen genomas de VPH que, aunque alterados y rearrreglados por su integración al genoma celular, expresan uniformemente los genes E6 y E7; en contraste con el resto de los genes tempranos, esta retención y expresión de E6 y E7 en tumores, así como otras observaciones, sugieren que estos genes se requieren para el inicio y el mantenimiento del estado maligno.

La sola infección por VPH de alto riesgo no provoca cáncer cervical. Esto debe entenderse en dos sentidos. En el primero de ellos, quiere decir que el cáncer no es la consecuencia normal, inmediata o inevitable de la infección por VPH de alto riesgo. En su lugar, esta infección da origen a la multiplicación del virus, la cual requiere de células normales, no transformadas, en un evento que parece ser transitorio, ya que la infección tiende a desaparecer al cabo de un tiempo (Schiffman, 1994). En éste sentido se explica que la gran mayoría de la mujeres infectadas por estos virus no sólo no desarrollan cáncer de cérvix (Kurmann y cols., 1992; Altmann y cols., 1994), sino que clínicamente su infección pasa desapercibida y no deja secuelas (Schiffman, 1994). En el otro sentido, la sola infección por VPH no provoca el cáncer debido a que éste resulta de cierto número de alteraciones moleculares en la célula, cuyo número y naturaleza exceden y trascienden la sola presencia del material genético viral y los efectos inmediatos de los productos que éste codifica. En éste segundo sentido, se entiende el largo tiempo que transcurre entre la infección y la aparición del cáncer cervical (Fisher, 1994)...cuando aparece.

Más aún, la infección productiva normal y el estado canceroso son incompatibles entre sí. Esto se debe a que la multiplicación viral está en íntima relación con la diferenciación y la muerte de las células infectadas (Kurmann y cols., 1992; Fuchs y Pfister, 1994; zur Hausen y de Villiers, 1994). Sin embargo, en el estado canceroso las células epiteliales se dividen indefinidamente, son inmortales y no se diferencian, lo cual hace imposible la multiplicación del virus. Es por esto que la infección normal por VPH y el estado celular canceroso son mutuamente excluyentes, y éste último es una condición anómala tanto desde el punto de vista celular como desde el punto de vista de la multiplicación viral. Esta

conclusión es subrayada por el hecho de que **un gran número de mujeres infectadas por VPH no desarrollan cáncer de cérvix** (Kurmann y cols., 1992; Altmann y cols., 1994).

El papel de los VPH de alto riesgo en la aparición del cáncer de cérvix, parece estar asociado con los efectos de las proteínas E6 y E7 codificadas por el genoma viral (McDougall, 1994; Stöppler y cols., 1994; Scheffner y cols., 1994; zur Hausen y de Villiers, 1994). Por un lado, se sabe que E6 y E7, codificadas por VPH de alto riesgo, **interaccionan con proteínas celulares** (Farthing y Vousden, 1994; Stöppler y cols., 1994): E7 de VPH de alto riesgo se une con proteínas celulares involucradas en la regulación del ciclo celular como son RB, p107 y p130, así como ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (cdks) (Dyson y cols., 1989; Münger y cols., 1989; Defeo-Jones y cols., 1991; Davies y cols., 1993). E6, por su parte, interacciona con p53 (Werness y cols., 1990). Por otra parte, se ha observado que E7 y E6, de VPH de alto riesgo, inducen la inmortalización de células epiteliales de piel humana, de cérvix, de riñón, células endoteliales y de músculo liso (Woodworth y cols., 1989; Sedman y cols., 1991; McDougall, 1994). También se ha visto que E7, por sí sola, puede inducir la inmortalización si está bajo el control de un promotor fuerte; en cambio, E6, por sí solo y bajo el control del mismo promotor fuerte, no tiene efecto en la longevidad celular. La presencia simultánea de E6 y E7 aumenta la eficiencia con la cual se induce la inmortalización (McDougall, 1994). Únicamente en células de tejido mamario humano se observa la situación inversa: E6 de VPH 16 puede inducir la inmortalización, pero no E7 (McDougall, 1994).

Conviene reiterar que la inmortalización y la tumorigenicidad no son consecuencias directas, inmediatas o inevitables de la infección por VPH de alto riesgo. Para que se presenten esas características **son indispensables alteraciones en diversos genes celulares** (Altmann y cols., 1994; McDougall, 1994; Pecoraro y cols., 1991; ter Schegget y van der Noordaa, 1994; zur Hausen, 1994; zur Hausen y de Villiers, 1994). Aparentemente, lo que ocurre es que E7, de VPH de alto riesgo, induce rearrreglos cromosómicos y mutaciones en el genoma celular (White y cols., 1994; zur Hausen, 1994). La interacción de E6 con p53 podría, a su vez, interferir con la reparación de ese daño en el ADN celular y, de éste modo, se acumularían mutaciones en el material genético de la célula. Como resultado de éstas, podrían alterarse genes relacionados con diversas

funciones celulares como la senescencia, la diferenciación y el control de la expresión de los genes virales por cascadas de señales intra o intercelulares (Ocadiz y cols., 1987; Altmann y cols., 1994; Fuchs y Pfister, 1994; McDougall, 1994; ter Schegget y van der Noordaa, 1994; zur Hausen, 1994; zur Hausen y de Villiers, 1994; Parkinson y cols., 1997). La evidencia de que se requieren alteraciones celulares para que se desarrolle el cáncer de cérvix, así como la presencia de vías intra e intercelulares que controlan la expresión del genoma viral, y su alteración en el cáncer cervical, se resume en las siguientes observaciones (Altmann y cols., 1994; Fuchs y Pfister, 1994; McDougall, 1994; ter Schegget y van der Noordaa, 1994; zur Hausen, 1994; zur Hausen y de Villiers, 1994):

1. En la infección normal por VPH de alto riesgo se observa senescencia, diferenciación y muerte de las células infectadas; sin embargo, las células neoplásicas, con el mismo tipo de VPH, son inmortales y tumorigénicas.
2. En cultivos de células infectadas por VPH, al cabo de cierto número de pasajes se presenta una crisis en la cual mueren las células; solo a veces sobreviven algunas células y éstas muestran inmortalidad.
3. Cuando diferentes clones de células infectadas por VPH son fusionadas entre sí, puede haber detención del crecimiento y aparición de la senescencia.
4. Cuando se forman híbridos de células normales (v.gr., fibroblastos) con células immortalizadas por VPH o con células tumorales positivas para VPH (v.gr., HeLa), se suprime la transcripción de E6/E7 y las células presentan diferenciación.
5. La inoculación, en ratones desnudos, de células immortalizadas, conduce a la supresión de la transcripción de E6/E7, a la inhibición del crecimiento y a la aparición de la diferenciación.
6. Al cocultivar macrófagos activados, de humanos, con células immortalizadas por VPH o con células no tumorigénicas, híbridas de HeLa y fibroblastos, hay represión transcripcional debida a citocinas, entre las cuales se cuentan $TNF\alpha$, interferón γ , TGF β 1 y 2, factor de crecimiento epidérmico y leucoregulina.
7. Las células immortalizadas por VPH pueden volverse malignas, según se juzga por injertos en animales susceptibles, por el sólo paso del tiempo (más de 60 pasajes), por exposición a carcinógenos químicos o físicos, por infección con otros virus que inducen mutaciones y rearrreglos en el ADN de la célula huésped (v.gr., virus herpes simplex), o por la introducción de oncogenes activados (v.gr., *ras*); todo esto sin que haya alguna diferencia, entre las células no tumorigénicas y las

tumorigénicas, en el número de copias del genoma de VPII o en el nivel de expresión de los productos génicos virales.

8. Cuando se comparan células no malignas y malignas, se observan diferencias en la regulación transcripcional de los genes de VPII. Por ejemplo:
 - a) Después de la conversión maligna de las células immortalizadas, esas células ya no responden a los macrófagos con la supresión de la transcripción de E6 y E7.
 - b) Hay supresión transcripcional de genes de VPII cuando se aplica 5-azacitidina a células híbridas de HeLa (malignas) y queratinocitos immortalizados, pero esa represión no se obtiene con las células progenitoras malignas.
 - c) Las lesiones clínicas de neoplasias intraepiteliales de bajo grado, a diferencia de las neoplasias de alto grado, muestran represión de la transcripción de E6/E7 en las capas de células proliferativas.
 - d) En células no malignas implantadas en animales no hay detección de transcritos de E6/E7, a diferencia de lo que se observa en lesiones clínicas, especialmente de alto grado y de cáncer invasor.
 - e) Al comparar la regulación transcripcional de E6/E7 de células no malignas y malignas, se observa que las no malignas se comportan de un modo en cultivo de tejidos, ya que expresan esos genes, y de otro modo al implantarlas en un animal, pues la inoculación, en ratones desnudos, de queratinocitos immortalizados por VPII, o de híbridos de células normales y HeLa, reduce la actividad transcripcional de E6/E7; en cambio, las células malignas en cultivo expresan E6/E7, y continúan expresándolas al inocularlas en ratones desnudos, donde crecen invasivamente.

La inestabilidad, genética asociada con E7, también podría alterar el genoma viral y esto explicaría que en el cáncer cervical sea frecuente la ruptura e integración del genoma viral al genoma celular, o la presencia de mutaciones en el genoma viral episomal cuando éste está asociado con cáncer de cérvix. Pareciera como si los cambios en la célula, inducidos por el virus para promover su multiplicación, se salieran de control y desembocaran en un estado canceroso que no beneficia al virus sino, por el contrario, lo perjudica ya que deja de multiplicarse y cesan de transmitirse sus

genes a la siguiente generación. La naturaleza accidental de estos acontecimientos estaría subrayada por el carácter excluyente de la infección viral productiva y el estado canceroso, así como por la **baja proporción de mujeres infectadas que desarrollan cáncer de cérvix** (Kurmann y cols., 1992; Altmann y cols., 1994). Es posible que éste accidente genético esté asociado con otro u otros factores de riesgo como podrían ser el tabaquismo, el empleo de anticonceptivos, la paridad, la historia familiar, la presencia de infecciones genitales asociadas o el tipo de alelos de histocompatibilidad (Schneider, 1994). La relación entre cáncer cervical y tabaquismo ha sido documentada por estudios epidemiológicos (Sasagawa y cols., 1997). Adicionalmente, en secreciones cervicales han sido hallados compuestos derivados del tabaco, incluyendo carcinógenos específicos de éste (Schneider, 1994; Prokopczyk y cols., 1997). En cuanto al efecto de los anticonceptivos orales, se sabe que en la RLC de los VPII, hay elementos de respuesta a glucocorticoides, por lo cual el empleo de anticonceptivos hormonales podría resultar en un aumento en el nivel de E6 y E7 en células cervicales infectadas (Fuchs y Pfister, 1994). Más aún, se ha observado, en experimentos, que la progesterona de esos anticonceptivos aumenta la transformación de células por VPII-16 (Fuchs y Pfister, 1994).

GEN SUPRESOR DE TUMORES p53.

La interacción de E6, de VPII de alto riesgo, con p53 ha recibido mucha atención debido a que **p53** es el gen supresor de tumores que aparece mutado con más frecuencia en cánceres humanos (50 al 60% de todos los casos de cáncer) (Hollstein y cols., 1991; Harris y Hollstein, 1993; Levine, 1993; Levine y cols., 1995). En las Figuras 1 y 2 se muestran las características del gen **p53** y de su proteína.

p53 actúa como supresor de tumores por medio de **dos estrategias: preventivas y de contención:**

- Las preventivas impiden que surjan o que persistan células que más adelante pueden originar tumores: cuando hay daño en el ADN aumenta el nivel de p53, ésta actúa como factor de transcripción y activa genes con elementos de respuesta a p53 como son *WAF1/Cip1/p19^{INK4}*, *mdm-2*, *CAD115*, *MDR1*, *hsp70* y otros (Chin y cols., 1992; Ullrich y

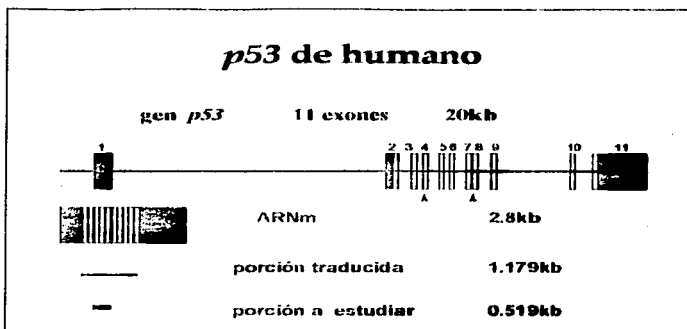


Figura 1. *p53* de humano (Levine, 1993; Matlashewski y cols., 1984; Harlow y cols., 1985; Zakut-Houri y cols., 1985; Lamb y Crawford, 1986; Lane y Beach, 1990; Harris y Hollstein, 1993; Prives y Manfredi, 1993). En la parte superior se representa al gen, el cual se localiza en el cromosoma 17p13.1. Consta de 11 exones, mostrados como cajas. Las cajas blancas representan exones o partes de éstos que se traducen; las cajas negras son exones o partes de éstos que no se traducen. Casi todo el gen está constituido por intrones, tal como se aprecia al comparar la longitud del gen (20kb) con la de su mensajero (2.8 kb). Debajo del gen se muestra al mensajero una vez que el preARNm ha sido procesado. Los cuadros corresponden a los exones mostrados en el gen; las porciones de color negro son los exones o las partes de éstos que no se traducen. La porción traducida tiene una longitud de 1.179 kb (393 residuos de aminoácidos). Se indica con una línea la parte del ARNm que es traducida y, hasta abajo, la longitud relativa de la porción delimitada en éste trabajo por los oligonucleótidos para amplificar *p53*. La posición aproximada de estos oligonucleótidos se presenta con los triángulos debajo de los exones 4 y 8.

cols., 1992; Agoff y cols., 1993; El-Deiry y cols., 1993; Harper y cols., 1993; Harris y Hollstein, 1993; Gottlieb y Oren, 1996). En particular, p21, el producto de *WAF1*, detiene el ciclo celular al inhibir la actividad de *cdks* y la fosforilación de Rb; con esto, la célula no se divide y se impide la inestabilidad genómica que podría llevar a la mutación de genes relacionados con el cáncer (Hartwell, 1992; Kastan y cols., 1992; Lin, y cols., 1992; Livingstone y cols., 1992; Ulrich y cols., 1992; Yin y cols., 1992; Prives y Manfredi, 1993; Waga y cols., 1994; White y cols., 1994; Sherr y Roberts, 1995; Stewart y cols., 1995). *p53* también inhibe la maquinaria de replicación del ADN al unirse a la proteína A de replicación y al activar la expresión de *WAF1*, cuya proteína, p21, se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), e impide que éste participe en la replicación (Gottlieb y Oren, 1996). Una vez que *p53* ha detenido el ciclo celular, puede repararse el daño en el material genético para después reanudar el ciclo; o bien, *p53*

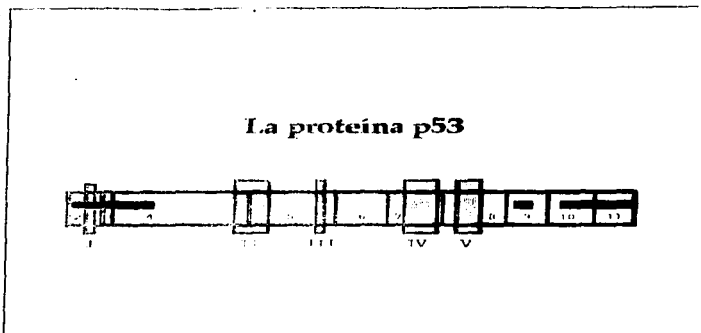


Figura 2. La proteína p53 de humanos consta de 393 residuos de aminoácidos. Los números arábigos (2 a 11) indican el número del exón que codifica cada parte de la proteína. Los rectángulos verticales con los números romanos (I a V) y sombreado vertical son regiones que se encuentran muy conservadas en todos los vertebrados, que son los únicos organismos que poseen esta proteína (Soussi y cols., 1990). Las regiones conservadas de la región central de la proteína (II a V) desempeñan un papel importante en el plegamiento correcto de la proteína y en su unión con el ADN (Cho y cols., 1994); en estas regiones se localiza la mayor parte de las mutaciones de p53 (Nigro y cols., 1989; Hollstein y cols., 1991; Harris y Hollstein, 1993; Levine, 1993; Levine y cols., 1995). El rectángulo horizontal en el extremo amino terminal, arriba de los números 2, 3 y 4, representa el dominio de transactivación de la proteína. El rectángulo horizontal en el extremo carboxilo, arriba del 10 y el 11, indica la región de p53 necesaria para que ésta forme tetrameros. El cuadro pequeño arriba del 9 indica la ubicación de la señal de localización nuclear (Lane y Benichou, 1990; Ulrich y cols., 1992; Privea y Manfredi, 1993).

puede conducir a la célula a la apoptosis, posiblemente mediante la activación de la expresión de *bax* y, quizá, también por otra vía que no requiere la activación de genes (Clarke y cols., 1993; Lowe y cols., 1993; Caelles y cols., 1994; Gottlieb y Oren, 1996). No se sabe que determina que p53 conduzca a la célula a la detención del ciclo celular y no a la apoptosis.

- Las estrategias de contención de p53 son aquéllas que mantienen bajo control al tumor, al impedir que aumente de tamaño. Esto lo lleva a cabo al regular el balance de los factores que promueven e inhiben la angiogénesis (Boucek, 1996): p53 activa la transcripción de trombospondina-1 (TSP-1) y otros inhibidores no identificados de la angiogénesis, e inhibe la producción de VEGF que es un inductor de la formación de vasos sanguíneos.

Quizá podría especularse sobre una tercera estrategia: la correctiva. En esta, p53 eliminaría un tumor cuya formación no se pudo impedir. Esto podría hacerlo si aparecieran daños en el material genético de las células cuando estas ya fueran tumorales: p53 detendría la proliferación de estas células y las conduciría a la apoptosis.

Muchas mutaciones puntuales de p53 tienen un efecto dominante ya que la proteína mutada forma oligómeros con la silvestre y hace que esta adopte una conformación anormal. Esto abole las funciones normales de p53, aun cuando quede un alelo silvestre (Lane y Beachmol, 1990; Prives y Manfredi, 1993). Algunas mutaciones de p53 no sólo abolen las funciones normales, sino que llevan a la adquisición de funciones nuevas que pueden contribuir activamente a la carcinogénesis. Esto sucede, por ejemplo, cuando p53 está mutado en el codón 281 y aumenta la transcripción del gen *MDR1* (Lane y Beachmol, 1990; Prives y Manfredi, 1993; Lin y cols., 1994); estos mutantes también aumentan el potencial tumorigénico de células en cultivo.

VPH Y p53 EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO.

Se ha pensado que la interacción de E6, de VPH de alto riesgo, con p53 es un elemento importante en la aparición del cáncer de cérvix por varias razones:

1. p53 tiene una gran importancia como supresor de tumores y aparece inactivado por mutaciones en 50-60% de todos los tumores malignos en humanos (Hollstein y cols., 1991; Harris y Hollstein, 1993; Levine, 1993; Levine y cols., 1995).
2. En contraste con esto, los estudios de VPH y p53, en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino, permitieron determinar que rara vez había mutaciones en p53; se encontró, en cambio, que las líneas con ADN de VPH tenían p53 silvestre, y las que no tenían secuencias de VPH mostraban mutaciones en p53 (Crook y cols., 1991; Scheffner y cols., 1991; Yaginuma y Westphal, 1991; Chen y cols., 1993; Choo y Chong, 1993).
3. Los primeros estudios de VPH y p53 en tumores malignos de cérvix, confirmaron esta correlación negativa entre secuencias de VPH y mutaciones de p53 (Crook y cols., 1992; Choo y Chong, 1993; Jiko y cols., 1994).

4. La causa de esta escasez de mutaciones de *p53* en cáncer cervical y la participación de E6 en la inactivación de *p53*, se conoció cuando se halló que *in vitro* E6 de VPII de alto riesgo, pero no de bajo riesgo, provoca la degradación acelerada de *p53*; esto ocurre cuando E6 se une a la proteína celular llamada E6-AP y entre las dos actúan como ligasas de ubiquitina, provocando la ubiquitinación de *p53* con la consiguiente degradación de esta proteína (Huibregtse y cols., 1993a, 1993b; Scheffner y cols., 1990; Scheffner y cols., 1993). Con esto parecía haberse hallado el mecanismo mediante el cual la presencia de E6 de VPII de alto riesgo inactiva *p53*, haciendo innecesario que el gen estuviera mutado en cáncer cervical.
5. *In vivo* se halló que la sobreexpresión de E6 de VPII de alto riesgo inhibe la actividad de transactivación de *p53* (Hoppe-Seyler y Butz, 1993).
6. Estudios con diversas técnicas de microscopía suministraron evidencias directas de una asociación estrecha entre *p53* y E6 (Liang y cols., 1993).

Actualmente, sin embargo, hay elementos para pensar que la explicación podría no ser tan sencilla, ya que:

1. Conforme se hicieron más estudios de tumores de cérvix se encontró que en muchos casos había la correlación negativa entre ADN de VPII y mutaciones en *p53*, pero también aparecieron casos en los cuales no había secuencias de VPH y aún así *p53* era silvestre (Børresen y cols., 1992; Bushy-Earle y cols., 1992; Crook y Vousden, 1992; Fujita y cols., 1992; Tsuda e Hirohashi, 1992; Chen y cols., 1993; Kessia y cols., 1993).
2. *In vivo*, la degradación de *p53* por E6 de VPII de alto riesgo parece ser menos pronunciada que *in vitro* (Lechner y cols., 1992).
3. En HeLa, *p53* es capaz de transactivar genes reporteros (Hoppe-Seyler y Butz, 1993) y se puede detectar unido al ADN; sin embargo, en cotransfección, la sobreexpresión de E6 de VPII 16, pero no de VPII 6, reprime esa transactivación (Hoppe-Seyler y Butz, 1993), dado que estas células sí expresan una gran cantidad E6. Esto, y lo expuesto en el punto anterior, podrían indicar que el nivel de expresión de E6, en células HeLa y otras líneas de cáncer cervical, es relativamente bajo (Hoppe-Seyler y Butz, 1993); de hecho, se ha visto que es muy débil la expresión de los genes tempranos de VPH 16 en los estratos basales del epitelio (Fuchs y Pfister, 1994) (en comparación con VPII de bajo riesgo). De esta manera, quizá en el curso de la evolución se restringió la

expresión de E6 y E7 de VPII de alto riesgo, pues de otro modo las células podrían convertirse en neoplásticas más fácilmente y esto no promovería la proliferación del virus (Fuchs y Pfister, 1994).

1. Hay un aumento en el nivel de p53 en células que contienen VPII, cuando son expuestas a agentes genotóxicos como mitomicina, cisplatino o radiación ultravioleta; éste aumento está correlacionado con un incremento en la transcripción de genes activados por p53 (v. gr., WAP7) y también aumenta la cantidad de p53 unida a ADN. Como resultado de la transcripción de WAP7, se detiene el ciclo celular, tal como sucede en ausencia de E6 (Butz y cols., 1995). Esto contrasta con lo que ocurre cuando se emplean células con p53 mutado, en las cuales no se observan estas respuestas (Butz y cols., 1995).
5. Finalmente, en contraste con lo hallado en carcinomas de células escamosas de cérvix, en los adenocarcinomas de cáncer cérvico uterino la frecuencia de mutaciones de p53 es similar a la observada en adenocarcinomas de otros sitios anatómicos (Jiko y cols., 1994), sin importar que en los adenocarcinomas de cérvix normalmente haya secuencias de VPII de alto riesgo, principalmente del tipo 18 (Riou y cols., 1990; Kurmann y cols., 1992; Fisher, 1994; Jiko y cols., 1994).

Todo esto hace pensar que *in vivo* aun no está clara la naturaleza de la interacción entre E6 y p53, por lo cual no es posible valorar la importancia de la supuesta inactivación de p53 en cáncer de cérvix. Cualquiera que sea la explicación, parece ser que no son funcionalmente equivalentes la mutación de p53 y la expresión de E6 de alto riesgo; una posibilidad es que esto se deba a una baja expresión de E6. Esta ausencia de equivalencia funcional parece ser subrayada por el comportamiento y el fenotipo histológico inusualmente más agresivos, que exhiben las neoplasias no asociadas con VPII, comparadas con las que tienen VPII (Riou y cols., 1990), y la asociación de mutaciones de p53 con neoplasias cervicales clínicamente más agresivas y de peor pronóstico (Tsuda e Hirohashi, 1992). Para complicar más el panorama, no está claro si es la presencia de mutaciones de p53, en adenocarcinomas de cérvix, la responsable de su comportamiento más agresivo y de su peor pronóstico (Fisher, 1994; Jiko y cols., 1994), comparados con carcinomas de células escamosas, o la presencia en ellos de VPII 18. En el caso extremo, no debe descartarse que la escasez de mutaciones de p53 en tumores no asociados con VPII indique, junto con los resultados expuestos arriba, que la inactivación de p53 por

mutaciones o por E6 podría no requerirse para el desarrollo del cáncer cervical (Butz y cols., 1995).

Con base en estos antecedentes, se decidió implementar las técnicas moleculares necesarias para obtener ácidos nucleicos de tumores y líneas celulares de cáncer cervical, para amplificar sus transcritos por RT-PCR, y para secuenciar el ADNc de *p53*. Además de permitir determinar la presencia de mutaciones en *p53*, las técnicas a implementar debían cumplir con ciertas condiciones, como la posibilidad de recuperar ambos ácidos nucleicos en cantidades y en calidad suficientes para que fuera posible, en principio, llevar a cabo estudios de secuencias (a partir de genes y transcritos) distintas de *p53* y que están involucradas en cáncer cervical. También, estas técnicas debían ser compatibles en principio con la posibilidad de recuperar y estudiar las proteínas de las muestras. Al elegir las técnicas, se puso énfasis en estas consideraciones debido a que el cáncer es el resultado de la alteración de cierto número de genes, razón por la cual el estudio de varios de ellos, y sus productos en cada una de las muestras, puede suministrar más información sobre sus causas genéticas, que el estudio de un solo gen por muestra.

MATERIALES Y MÉTODOS

PULVERIZACIÓN DE LAS BIOPSIAS.

Las biopsias fueron proporcionadas por el Hospital de la Mujer, de la SSA. Inmediatamente después de que el cirujano obtuvo la biopsia, ésta se congeló en nitrógeno con objeto de preservar en buen estado los ácidos nucleicos, en particular el ARNm. Después de esto se guardaron en un ultracongelador hasta el momento de ser procesadas.

Para extraer los ácidos nucleicos, primero se pulverizaron las muestras (Gramza y cols., 1995; Tam y cols., 1993). Esto se realizó en un cuarto frío (4°C). Las muestras se sacaron del ultracongelador, se sumergieron en nitrógeno líquido y se envolvieron en sobres de papel aluminio. Cada sobre tenía un grosor de por lo menos tres capas de papel aluminio. Cada paquete con su biopsia se sumergió, de nuevo, en nitrógeno líquido, y se le depositó sobre una placa metálica. Esta placa estaba cubierta por papel aluminio y para mantenerla fría se le colocó sobre una cama de hielo seco. Con objeto de pulverizar la muestra, se le golpeó con un martillo enfriado con hielo seco.

En el mismo cuarto frío, se abrió el sobre y el tejido pulverizado se bañó con 500µl del reactivo Trizol (Gibco BRL) incubado en hielo húmedo. Con una micropipeta se transfirió el reactivo con el polvo a un tubo Eppendorf de 1.5ml. Se le agregaron unos microlitros más de Trizol al sobre, para asegurar que todo el tejido en polvo fuera recuperado. Al final se añadió al tubo Eppendorf más del reactivo señalado, hasta que se completó un volumen de 1ml.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

Se colocó el tubo Eppendorf en el vortex hasta homogeneizar la solución con el tejido pulverizado (Chomezynski, 1993). Después se le dejó reposar 5min a temperatura ambiente. En seguida se le añadieron 200µl de cloroformo, se agitó vigorosamente con la mano, durante 15seg, y a continuación se le dejó reposar 3min a temperatura ambiente.

Como siguiente paso, se centrifugaron los tubos 15min a 4°C en una microcentrífuga. Con esto se formó una fase acuosa, transparente, en la parte superior del tubo; una fase inferior translúcida de color rojo; y una interfase blanca y viscosa. La fase acuosa, con el ARN total, se transfirió con una micropipeta a otro tubo. En éste paso se tuvo cuidado de no acercar la punta de la micropipeta a la interfase ni a las paredes del tubo para no contaminar el ARN con ADN ni proteínas. Con éste mismo fin, no se transfirió la totalidad de la fase acuosa, sino únicamente la parte superior de la misma (aproximadamente 500µl). A los tubos con la fase acuosa se les añadieron 500µl de isopropanol y se les sometió a vortex muy ligero por 2 o 3seg, para después dejarlos reposar 10min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron 10min. a 4°C en una microcentrífuga.

Se quitó por decantación el sobrenadante de los tubos y se les añadió 1ml de etanol al 75% (25% de agua tratada con DEPC). Se sometieron a vortex unos 5seg y se a centrifugaron 3min a 4°C en una microcentrífuga.

Se quitó por decantación el sobrenadante y los tubos se dejaron secar en posición invertida sobre una toalla de papel. Cuando estuvieron secos y la pastilla cristalina, se añadieron 30µl de agua tratada con DEPC. Se cerraron lo tubos y se incubaron 10min en un termobloc a 55°C. Después de esto, la solución se pasó varias veces por una punta amarilla.

Para cuantificar el ARN se tomaron 5µl del mismo y se añadieron 495µl de agua tratada con DEPC, para en seguida medir la densidad óptica a 260nm con un espectrofotómetro.

La calidad del ARN se verificó mediante electroforesis. Se pusieron de 1 a 2µl de ARN en un gel de agarosa 1% con TBE IX y bromuro de etidio, para después visualizarlo en un transiluminador de luz UV.

EXTRACCIÓN DE ADN.

A los tubos con la fase orgánica (roja) y la interfase (blanca) se les quitó el remanente de la fase acuosa. Se midió el volumen de aquellas, se añadió un volumen equivalente de amortiguador STE (NaCl 0.1M; Tris-HCl 10mM, pH 8.0; EDTA 1mM, pH 8.0; y SDS 1%) y

se ajustó el pH, con NaOH 5N, hasta obtener un valor de 12.0 (Chevillard, 1983). Los tubos se sometieron a vortex fuerte durante 30seg, para después centrifugar 20min en una microcentrífuga a 4°C. Con esto se formó una fase acuosa con el ADN, y una fase orgánica de color rosado. La fase acuosa se transfirió a dos tubos, colocando volúmenes iguales en ambos, teniendo cuidado de no tomar parte de la fase orgánica. El ADN de la fase acuosa se precipitó con etanol (Sambrook y cols., 1989). Se midió el volumen de la fase acuosa y se añadieron 2 volúmenes de etanol frío (-20°C). Se mezclaron invirtiendo los tubos hasta que quedaron mezcladas la fase acuosa y el etanol. A continuación se guardaron los tubos a -20°C durante 1hr como mínimo. Los tubos se centrifugaron 10min en una microcentrífuga a 4°C. Se quitó el sobrenadante por decantación, para después agregar 1ml de etanol frío al 75%, para lavar la pastilla. Los tubos se colocaron en vortex unos 5seg y posteriormente se centrifugaron 10min a 4°C. Se quitó el sobrenadante por decantación y se dejaron secar los tubos en posición invertida sobre una toalla de papel. Una vez que las pastillas se hubieron secado, se les añadieron 30 o 60µl de NaOH 8mM y se incubaron durante 10 min a 37°C para propiciar la resuspensión del ADN. Para recuperar la mayor cantidad posible del ADN, las paredes del tubo se tallaron con una pipeta pasteur a la cual se le selló su extremo distal a la flama, y la solución se pasó varias veces a través de una punta amarilla.

Para cuantificar el ADN se tomaron 5µl del mismo y se añadió agua bidestilada estéril hasta completar 500µl, para en seguida medir con espectrofotómetro la densidad óptica a 260nm.

La calidad del ADN obtenido se verificó por electroforesis. Se transfirieron unos microlitros de ADN a un gel de agarosa 1% con TBE 1X y bromuro de etidio, para después visualizarlo en un transiluminador de luz UV.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES.

Se decantó el medio de cultivo de las cajas P100 con las líneas celulares crecidas a una confluencia cercana al 100%. Se bañaron las células con 1ml del reactivo Trizol; se agitaron las cajas para que el reactivo alcanzara a todas las células y en seguida se

rasparon con gendarme. El resto del procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos es el que se anotó anteriormente.

PCR PARA AMPLIFICAR β -GLOBINA.

Para verificar que el ADN obtenido tuviera la calidad para ser empleado en PCR se amplificó parte del gen β -globina. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos GH20 y PC04, que dan un producto de 268pb (Greer y cols., 1994). Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 20 μ l. Los componentes de la reacción fueron, en su concentración final, amortiguador 1X, dNTPs (Gibco BRL) a 50 μ M cada uno, MgCl₂ 1.5mM; se añadieron 20ng de cada oligonucleótido, 0.5U de polimerasa Taq (Gibco BRL) y 50ng de ADN genómico. El perfil de la reacción fue de 3min a 94°C; 35 ciclos de 15seg a 95°C, 30seg a 59°C, y 1min a 72°C; con una extensión final de 10min a 72°C. Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 480 o en un aparato Ericomp Delta Cycler II. La mitad de la reacción se puso en un gel de agarosa 1% con TBE 1X y bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV. Se incluyeron controles negativos para detectar posibles contaminaciones.

RT-PCR DE p53.

Para la transcripción inversa se emplearon oligo d(C)₁₂₋₁₈ y la enzima SuperScriptII (ambos de Gibco BRL). La transcripción inversa se llevó a cabo en un volumen de 20 μ l. En cada tubo se pusieron 500ng de oligo d(C)₁₂₋₁₈, 1 a 5 μ g de ARN total y el volumen se llevó a 12 μ l con la adición de agua tratada con DEPC. Los tubos se calentaron 10min a 70°C, después de lo cual fueron transferidos rápidamente a hielo, donde se los dejó 1min, para después centrifugarlos 3seg. A cada tubo se le añadieron los siguientes componentes en la cantidad necesaria para que quedaran a la concentración final que se indica: amortiguador 1X, DTT 10mM y dNTPs a 50 μ M cada uno. Los reactivos se mezclaron suavemente con ayuda de una micropipeta y se recogieron en el fondo del tubo por centrifugación (3seg). Los tubos se incubaron 2min a 40°C para después añadirles 1 μ l de transcriptasa inversa SuperScript II (200U). El contenido de los tubos se mezcló suavemente y se dejaron

incubar 1hr a 40°C. Al término de ese tiempo se inactivó la transcriptasa inversa calentando los tubos 4min a 95°C. En seguida, los tubos se pusieron en hielo.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 50µl. Los componentes de la PCR fueron, en su concentración final, amortiguador 1X, dNTP's a 50µM cada uno, MgCl₂ a 1.5mM; se añadieron 50ng de cada uno de los oligonucleótidos de *p53* (P53H, P53D), 2.5U de polimerasa Taq y 1µl de la reacción de transcripción inversa. El perfil de la reacción fue de 3min a 94°C; 35 ciclos de 15seg a 95°C, 30seg a 59°C, y 1min a 72°C; con una extensión final de 10min a 72°C. La detección del producto de 519pb se llevó a cabo por electroforesis: se pusieron 10µl de la reacción en un minigel de agarosa al 1% con TBE 1X y bromuro de etidio.

PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR.

Se purificó el producto de PCR por tres procedimientos distintos: a) por minicolumnas; b) por gel y precipitación; y c) por gel y minicolumnas.

a) PURIFICACIÓN POR MEDIO DE MINICOLUMNAS.

Se emplearon minicolumnas Wizard (Promega). El volumen de la mezcla con el producto de PCR se llevó a 50µl con la adición de agua de ampolla.

Se quitó el émbolo de una jeringa de 3ml y se puso la jeringa sobre la minicolumna. La resina se agitó vigorosamente y se puso 1ml de la misma en un tubo Eppendorf de 1.5ml, para en seguida agregar la muestra. Esta mezcla se agitó suavemente por inversión hasta que quedaron mezcladas la resina y la muestra. Después, la mezcla se vertió en la jeringa de 3ml, se insertó el émbolo con cuidado y se le presionó de manera suave y uniforme. El líquido que salió de la columna se descartó. La jeringa se desmontó de la minicolumna y se le quitó el émbolo, para volver a montarla en la columna. El contenido de ésta se lavó con 2ml de isopropanol al 80%; éste se puso en la jeringa, se insertó cuidadosamente el émbolo y se le presionó de manera suave y uniforme. El isopropanol se descartó. Se desmontó la jeringa de la minicolumna, y ésta se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5ml que fue

centrifugado 20seg a temperatura ambiente. La columna se dejó 15min a temperatura ambiente para que se evaporaran las trazas de isopropanol. Al finalizar éste tiempo se le transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5ml, se le añadieron a la columna 30 μ l de agua de ampollita a 65°C y se dejó transcurrir 1min para separar el producto de PCR de la columna. Finalmente, para remover el producto de PCR purificado, se centrifugó la minicolumna 20seg en una microcentrifuga a temperatura ambiente.

b) PURIFICACIÓN POR GEL Y PRECIPITACIÓN.

Purificación del producto de PCR por gel y precipitación (Rao, 1994b). Todo el volumen de la reacción de PCR se puso en un pozo de un gel al 0.8%, de agarosa de bajo punto de fusión, con bromuro de etidio. Se dejó progresar la electroforesis hasta que la banda con el producto de PCR llegó al extremo del gel. En ese momento se cortó la banda, se le transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5ml y se le añadieron 300 μ l de amortiguador TBE con NaCl 100mM. Para fundir la agarosa se calentó a 67°C durante 30min, al cabo de los cuales la solución es transparente.

Se midió el volumen y se añadió un volumen equivalente de fenol cuando la banda fundida estaba todavía a 67°C. De inmediato se mezcló vigorosamente con vortex por unos segundos y se centrifugó 15min, a la máxima velocidad, en una microcentrifuga. En la parte superior se formó una fase acuosa con el ADN. Ésta se transfirió a un tubo nuevo y se volvió a extraer, del mismo modo, con fenol. En seguida se extrajo dos veces con cloroformo. En cada extracción se mezcló vigorosamente con vortex por unos cuantos segundos y se centrifugó, también por unos pocos segundos, a la máxima velocidad de la microcentrifuga. Al terminar estas extracciones, se añadieron 3 volúmenes de etanol a -20°C para precipitar el ADN, y se dejó precipitar en un ultracongelador durante toda la noche. A continuación se centrifugó a la máxima velocidad durante 15min en una microcentrifuga a 4°C. Se quitó el sobrenadante por decantación y se añadió 1ml de etanol al 70% para lavar la pastilla. Se agitó con vortex durante 5seg y se centrifugó 10min a 4°C; se desechó el sobrenadante y se repitió éste lavado. Después de quitar el sobrenadante del segundo lavado, se secó la pastilla colocando los tubos en un termobloc a 37°C durante 2min. La pastilla de ADN se disolvió en 30 μ l de agua de ampollita.

e) PURIFICACIÓN POR GEL Y MINICOLUMNAS.

Se puso todo el volumen de la reacción de PCR en un pozo de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8% y con bromuro de etidio. Se dejó progresar la electroforesis hasta que la banda con el producto de PCR llegó al extremo del gel. Se recortó la banda, se le transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5ml y se le añadieron 300µl de amortiguador TE con NaCl 100mM. La agarosa se fundió a 67°C durante 30min y, todavía caliente, se transfirió ésta a 1ml de resina Wizard (Promega), para llevar a cabo el procedimiento de purificación por minicolumnas, tal como se describió anteriormente.

Después de purificar el producto de PCR por cualquiera de los procedimientos anteriores, se tomaron 5µl, se mezclaron con 495µl de agua de ampolleta y se cuantificó a 260nm.

SECUENCIACIÓN DE p53.

Se empleó secuenciación directa y cíclica con la enzima Vent. (exo) (New England Biolabs) (Sears y cols., 1992).

Se etiquetaron cuatro tubos de 0.5ml de acuerdo con el nucleótido terminador (ddNTP) que le correspondiera a cada uno, y se pusieron 3µl de la mezcla correspondiente de dNTPs/ddNTP. En otro tubo se hizo una mezcla con los siguientes componentes: producto de PCR purificado (34ng u 80ng), 1.2pmol de oligonucleótido, 1.5µl de amortiguador CircumVent. 10X, 1µl de Tritón X-100 30X, y agua de ampolleta hasta completar 11.5µl. Estos reactivos se mezclaron con micropipeta y en seguida se agregaron 2.5µl de isótopo $[\alpha\text{-}^{32}\text{S}]\text{dATP}$ (con menos de dos decaídas), así como 1µl de Vent(exo) (equivalente a 2U). Todo esto se mezcló suavemente y se pusieron 3.2µl de la mezcla a cada uno de los tubos con dNTPs/ddNTP; todo se mezcló suavemente. Se añadieron 25µl de aceite mineral a cada tubo y se llevaron al termociclador. El perfil de la reacción de secuencia fue de 30 ciclos de 20seg a 95°C, 20seg a 60°C, 20seg a 72°C, al finalizar los cuales se agregaron 4µl de la solución de terminación y se mezcló con micropipeta.

El gel de poliacrilamida al 6%, de 50cm, se hizo de acuerdo con lo expuesto en Chang y Wu (1992) y Nelson y Krawetz (1994). El gel se calentó hasta alcanzar los 55°C. Se calentaron las muestras 3min a 94°C antes de poner 2.5µl en el pozo del gel y se corrieron manteniendo una temperatura constante de aproximadamente 55°C durante toda la corrida. El gel se puso sobre papel Whatman 3MM, se cubrió con plástico egapack, y se secó, en un secador de geles con vacío y calor, sin haberlo fijado previamente (Reed y cols., 1986; Yang y Waldman, 1994). Se le quitó el egapack y se puso en un sobre con una placa de rayos X que se reveló a los 6 días.

RESULTADOS

En la siguiente figura se muestran los procedimientos implementados en éste trabajo.



Figura 3. Este esquema ilustra el procedimiento que se siguió para implementar las técnicas requeridas para estudiar mutaciones de *p53* en tumores y líneas celulares de cáncer cérvico uterino.

MUESTRAS Y LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.

Para implementar las técnicas se emplearon:

- Líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino que ya han sido caracterizadas (HeLa, CaSki, C33A y HT3).
- Líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino, obtenidas de pacientes mexicanas, que están siendo caracterizadas.
- Muestras de lesiones cervicales (Tabla 4).

Muestra	Diagnóstico Histopatológico	ARN (µg)	ADN (µg)
1	Cervicitis crónica con cambios por VPH.	9	17
2	Cervicitis crónica por cambios por VPH.	12	96
3	Láminas de epitelio exocervical y endocervical, con inflamación aguda y crónica y cambios por VPH.	14	100
4	NIC-I; láminas de epitelio exocervical.	11	90
5	NIC-II; cervicitis crónica con cambios por VPH.	6	139
6	NIC-I; cervicitis crónica con cambios por VPH.	4	180
7	Ca/Cu III-II; carcinoma epidermoide invasor bien diferenciado, de células grandes queratinizante.	84	715
8	NIC-III; fragmento de exocervix y endocervix, con inflamación crónica y células exocervicales libres con displasia.	13	295
9	NIC-III; fragmento de endocervix con inflamación crónica y células exocervicales libres con displasia.	7	198
10	NIC-II; cervicitis crónica con cambios por VPH.	19	206
11	NIC-II; cervicitis crónica con cambios por VPH.	24	245
12	NIC-I; cervicitis crónica con cambios por VPH.	17	269
13	NIC-I; cervicitis crónica con metaplasia epidermoide y cambios por VPH.	48	181

Tabla 4. Muestras de lesiones de cérvix utilizadas en este trabajo. El diagnóstico histopatológico lo realizó el personal del Hospital de la Mujer, de la SSA. En las columnas del lado derecho se anotan las cantidades de ácidos nucleicos obtenidas de cada muestra.

DELIMITACIÓN DE LA REGIÓN A ESTUDIAR EN *p53* Y DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.

En este momento se tienen registradas **5,978 mutaciones en *p53*** (Hollstein y cols., 1996; Hainaut y cols., 1997). A nivel de la proteína, el 90% de las mutaciones se encuentra en la región central de la misma (Levine, 1993; Levine y cols., 1995; Hainaut y cols., 1997). De hecho, 20% de las mutaciones registradas actualmente se localizan en sólo 5 codones, que participan en la unión de *p53* con zinc, o en la interacción de esa proteína con el ADN (Hollstein y cols., 1996; Hainaut y cols., 1997). Más del 80% de las mutaciones de *p53* son puntuales y cambian un aminoácido por otro (Levine, 1993; Levine y cols., 1995).

De las 5,976 mutaciones mencionadas, **49 corresponden a tumores o líneas celulares de cérvix** y todas, sin excepción, se encuentran localizadas en la región central de la proteína (Tabla 5, Figuras 4, 5).

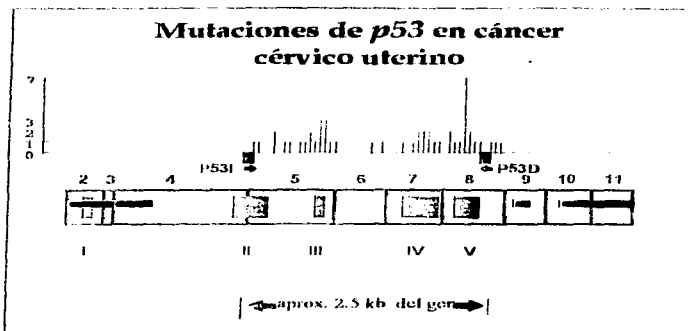


Figura 4. Se muestra la posición de todas las mutaciones reportadas de *p53* en cáncer cérvico uterino. El número de veces que un codón aparece mutado se representa por la altura de la barra correspondiente (véase la escala del lado izquierdo de la Figura). El codón al que corresponde cada una de las barras aparece en la Figura 5. A su vez, los detalles de cada una de las mutaciones reportadas pueden consultarse en la Tabla 5. Los cuadros negros arriba de las flechas gruesas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (P53I/P53D), los cuales cubren una porción de, aproximadamente, 2.5kb de *p53*, y abarcan del codón 121 (exón 4) al 293 (exón 8). En el ADN esto equivale a 519pb.

Al comienzo de este trabajo se conocían 29 mutaciones de *p53* en tumores de cérvix (con número de registro, en la base de datos del EBI, 1072, 1073, 1258, 1259, 1284, 1285, 1286, 1299, 1300, 1301, 1465, 1466, 1467, 2185, 2186, 2436, 2437, 2448, 2804, 2912, 2913, 3644, 3645, 3646, 3647, 3648, 3649, 3650 y 3651; véase la Tabla 5); y se habían descubierto cinco líneas celulares derivadas de cáncer cervical que tienen *p53* mutado (registros 341, 342, 859, 860 y 4840).

Se diseñaron dos oligonucleótidos que flanquearan la región donde se encuentran contenidas todas estas mutaciones. Uno de ellos abarca los últimos codones del exón 4 y los dos primeros del exón 5 (esto corresponde a los codones 121 al 127); el otro se encuentra aproximadamente a la mitad del exón 8 (codones 287 al 293). Sus secuencias son, respectivamente:

P53I 5' TCT GTG ACT TGC ACG TAC TC-3'
 P53D 5' CCC TTT CTT GCG GAG ATT CT-3'

Mutaciones de p53 en tumores y líneas celulares de cáncer cérvico uterino.

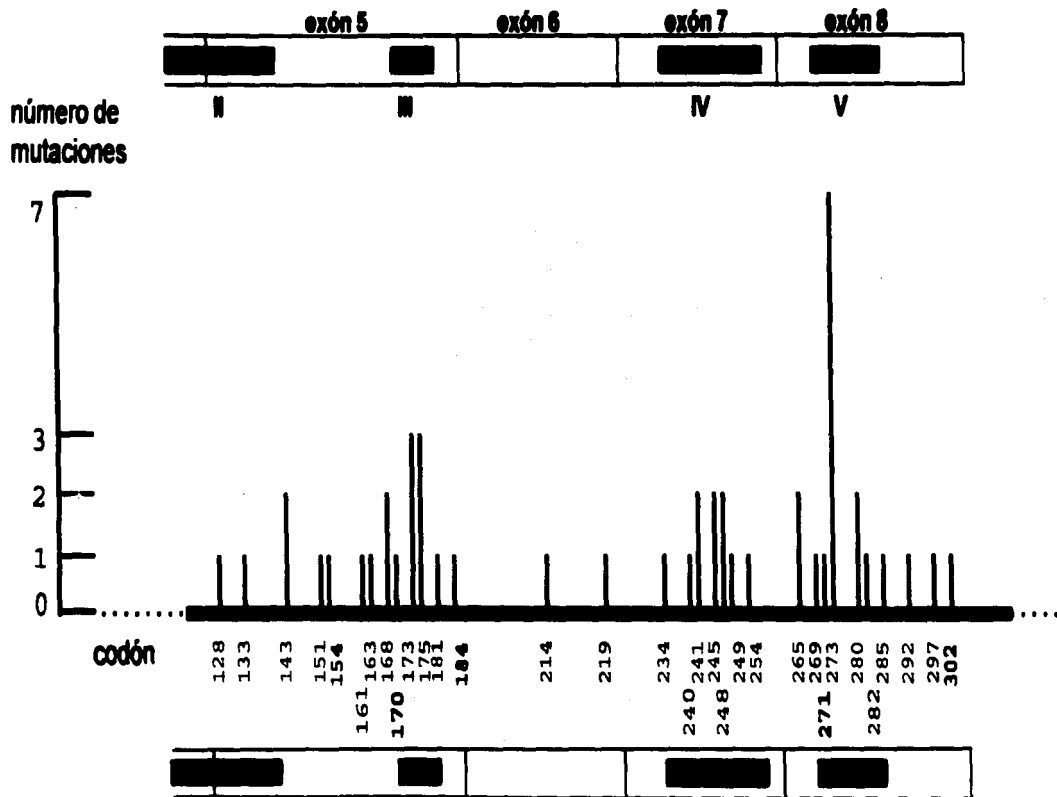


Figura 5. Se muestra con más detalle que en la Figura anterior la localización de las mutaciones de p53 reportadas en tumores y líneas celulares de cáncer cérvico uterino. Cinco de las mutaciones son silenciosas. Véase también la Tabla 5. Los números romanos indican las regiones conservadas.

Tabla 5. Lista de mutaciones de *p53* en cáncer cervicouterino que están reportadas en la base de datos del IHC1 (Database of *p53* somatic mutations in human tumors and cell lines). Este listado está ordenado en orden ascendente del codón mutado (columna con el encabezado "codón"). Las mutaciones se van numerando conforme se reporta su secuencia. Hasta la fecha se han reportado 49 mutaciones de *p53* en cáncer de cérvix, cinco de ellas silenciosas, de un total de 5,976 mutaciones en la base de datos. En la columna que dice "base mutada" la numeración de las bases parte del codón ATG y llega hasta el codón de término. En esa misma columna, solo se indica el número de la base mutada cuando se trata de una sustitución. Esta tabla se modificó de la base de datos del IHC1 (carcinoma multivariado, CCI, carcinoma de células escamosas, AOC, adenocarcinoma, AB, adenocarcinoma, I, línea celular, met-metastasis de un primario de cérvix. Las células vacías de las columnas "notas" y "VPII" indican que no se halló el dato

	# de las mutaciones en la base de datos	codón/ región en la base de datos	base mutada	codón	mutación	aminoácido mutado	notas	VPII	número de la mutación	referencia
1	1465	5/11		128	del (-27)	delección	CT	-	C83729	Tsuda e Hirohashi, 1992. <i>Int J Cancer Res.</i> 83:1184-1191.
2	1258	5/11	397	133	ATG → CTTG	Met → Leu	CCI	-	C83726	Dujita y cols., 1992. <i>Cancer Res.</i> 52:512-519.
3	2185	5	427	133	GTTG → AATG	Val → Met	CAC1	-	Pa-20	Paquette y cols., 1993. <i>Cancer</i> , 72(4):1272-1280.
4	2913	5	427	133	GTTG → AATG	Val → Met	CCI	-	Pa-15	Park y cols., 1994. <i>Oncogene</i> , 9:205-210.
5	3616	5	451	151	CTG → TCG	Leu → Ser	AIDC	-	AC-4	Jiko y cols., 1994. <i>Int J Cancer</i> , 59:601-606.
6	5420	5	460	154	CTG → AATG	Leu → Met	CCI	-	Kim17	Kim y Kim, 1995. <i>Yonsei Med J.</i> 36(5):412-425.
7	1366	5	482	161	CTG → CAGC	Leu → Asp	AIDC	-	C83251	Tsuda e Hirohashi, 1992. <i>Int J Cancer Res.</i> 83:1184-1191.
8	3694	5	488	161	TAC → TACG	Lys → Gln	AIDC	-	AC-2	Jiko y cols., 1994. <i>Int J Cancer</i> , 59:601-606.
9	5421	5	504	168	CAT → CAT	silenciosa	CCI	-	Kim23	Kim y Kim, 1995. <i>Yonsei Med J.</i> 36(5):412-425.
10	5423	5	504	168	CAT → CAT	silenciosa	CCI	-	Kim5	Kim y Kim, 1995. <i>Yonsei Med J.</i> 36(5):412-425.
11	5419	5	508	170	ACC → CCG	Thr → Pro	CCI	-	Kim15	Kim y Kim, 1995. <i>Yonsei Med J.</i> 36(5):412-425.
12	1072	5/11	519	173	GTTG → GTA	silenciosa	CCI	+	A11	Hirotsugu y cols., 1992. <i>Lancet</i> , 340:318.
13	1299	5/11	517	173	GTTG → TTG	Val → Leu	met	+	TC-1	Cronk y Vausden, 1992. <i>EMBO J.</i> 11:3935-3940.
14	2436	5/11	519	173	GTTG → GTA	silenciosa		+	ov 187	Holland y cols., 1993. <i>J Pathology</i> , 171:105-114.
15	1300	5/11	524	175	CTG → CCG	Arg → Pro	met	+	TC-2	Cronk y Vausden, 1992. <i>EMBO J.</i> 11:3935-3940.
16	2804	5/11	523	175	CTG → TCG	Arg → Cys	CCI	-	Du-7	Dunby-Larle y cols., 1994. <i>Br J Cancer</i> , 69:732-737.
17	3978	5/11	524	175	CTG → CAG	Arg → His		-	ICB/Cu60	Duggel y cols., 1995. <i>Int J Oncol.</i> 6:681-686.
18	1301	5/11	542	181	CTG → CTC	Arg → Leu	met	+	TC-3	Cronk y Vausden, 1992. <i>EMBO J.</i> 11:3935-3940.
19	5418	5	552	184	CAT → CAG	silenciosa	CCI	-	Kim11	Kim y Kim, 1995. <i>Yonsei Med J.</i> 36(5):412-425.
20	2448	6	642	214	CAT → CAT	silenciosa	CCI	-	C-5	Kwon y cols., 1993. <i>Am J Pathology</i> , 144(5):1398-1405.
21	3645	6		219	del (-1)	frambesbil	AIDC	-	AC-3	Jiko y cols., 1994. <i>Int J Cancer</i> , 59:601-606.
22	4621	7/11	701	234	TAC → TACG	Lys → Tyr	CCI	-	I-33/965	Hirotsugu y cols., 1995. <i>Cancer</i> , 76:57-66.
23	1284	7/11	719	240	ATG → ATT	Ser → Ile	CCI	-	Tumour 385	Cronk y cols., 1992. <i>Lancet</i> , 339:1070-1073.
24	3648	7/11	722	241	TTC → TAC	Ser → Tyr	AIDC	-	AC-6	Jiko y cols., 1994. <i>Int J Cancer</i> , 59:601-606.
25	3651	7/11	722	241	TTC → TAC	Ser → Tyr	AIDC	-	AC-8	Jiko y cols., 1994. <i>Int J Cancer</i> , 59:601-606.
26	341	7/11	734	245	CTG → GTC	Cys → Val	I.	-	IT-3	Schellings y cols., 1991. <i>PNAS, USA</i> , 88(13):5523-5527.
27	859	7/11	734	245	CTG → GTT	Cys → Val	I.	-	111132	Srivastava y cols., 1992. <i>Carcinogenesis</i> , 13(7):1273-1274.
28	1259	7/11	742	248	CTG → TCT	Arg → Trp	AIDC	-	Canc 36	Dujita y cols., 1992. <i>Cancer Res.</i> 52:512-519.
29	2186	7/11	741	248	CTG → CAG	Arg → Gln	AB	-	Pa-11	Paquette y cols., 1993. <i>Cancer</i> , 72(4):1272-1280.
30	1285	7/11	747	249	ACT → ACT	Thr → Ser	CCI	-	Tumour 343	Cronk y cols., 1992. <i>J Cancer</i> , 339:1070-1073.
31	1467	7/11	762	254	AAT → AATG	Ile → Met	CI	-	Cx22/72	Tsuda e Hirohashi, 1992. <i>Int J Cancer Res.</i> 83:1184-1191.
32	1073	8		265	del (-1)	frambesbil	AIDC	+	A12	Hirotsugu y cols., 1992. <i>Lancet</i> , 340:318.
33	2437	8		265	del (-1)	frambesbil		+	cv 187	Holland y cols., 1993. <i>J Pathology</i> , 171:105-114.
34	1281	8	806	269	ATG → ATG	Ser → Thr	CCI	-	KM-10	Mison y cols., 1995. <i>Br J Cancer</i> , 71:219-226.
35	5424	8/11	811	271	TAC → AAT	Cys → Ile	CCI	-	Kim60	Kim y Kim, 1995. <i>Yonsei Med J.</i> 36(5):412-425.
36	342	8/11	817	271	CTG → TCT	Arg → Cys	I.	-	C33A	Schellings y cols., 1991. <i>PNAS, USA</i> , 88(13):5523-5527.
37	860	8/11	817	273	CTG → TCT	Arg → Cys	I.	-	111131	Srivastava y cols., 1992. <i>Carcinogenesis</i> , 13(7):1273-1274.
38	1286	8/11	817	273	CTG → TCT	Arg → Cys	CCI	-	Tumour 325	Cronk y cols., 1992. <i>J Cancer</i> , 339:1070-1073.
39	2912	8/11	818	273	CTG → CAT	Arg → His	AIDC	-	Pa-5	Park y cols., 1994. <i>Oncogene</i> , 9:205-210.
40	4282	8/11	817	273	CTG → TCT	Arg → Cys	CCI	-	KM-46	Mison y cols., 1995. <i>Br J Cancer</i> , 71:219-226.
41	4622	8/11	817	273	CTG → TCT	Arg → Cys	CCI	-	IM18	Hirotsugu y cols., 1995. <i>Cancer</i> , 76:57-66.
42	4640	8/11	818	273	CTG → CAT	Arg → His	I.	-	CMC-4	Iwasaka y cols., 1993. <i>Cytosol Oncol.</i> 48(1):104-109.
43	3647	8/11	839	280	ATG → AAT	Arg → His	AIDC	-	AC-5	Jiko y cols., 1994. <i>Int J Cancer</i> , 59:601-606.
44	4737	8/11	839	280	ATG → AAT	Arg → His		-	118 caso 2	Skomedal y cols., 1995. <i>Br J Cancer</i> , 72:129-133.
45	3650	8/11	844	282	CTG → TCT	Arg → Cys	AIDC	-	AC-7	Jiko y cols., 1994. <i>Int J Cancer</i> , 59:601-606.
46	3649	8/11	853	285	CTG → AATG	Arg → Asp	AIDC	-	AC-6'	Jiko y cols., 1994. <i>Int J Cancer</i> , 59:601-606.
47	4280	8	875	292	AAA → AAT	Lys → Asp	CCI	-	KM-7	Mison y cols., 1995. <i>Br J Cancer</i> , 71:219-226.
48	5422	8	890	297	CAT → CAG	silenciosa	CCI	-	Kim12	Kim y Kim, 1995. <i>Yonsei Med J.</i> 36(5):412-425.
49	5229	8		302	del (-1)	frambesbil		-	Craig01	Craig et al., 1995. <i>J Clin Oncol</i> , 39(3):423-426.

Estos oligonucleótidos abarcan aproximadamente 2.5kb del gen *p53*, de las cuales cuatro quintas partes corresponden a intrones. La región comprendida por estos oligonucleótidos codifica la parte central de la proteína y, por lo tanto, incluye los dominios de unión con zinc y de unión con el ADN.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Para obtener los ácidos nucleicos de las muestras de tejido cervical, éstas se congelaron para después pulverizarlas. El polvo resultante se transfirió al reactivo Trizol y se extrajo el ARN total. En el caso de las líneas celulares, las cajas con sus cultivos fueron bañadas con ese mismo reactivo, para después llevar a cabo la extracción. En la Figura 6 puede observarse el ARN extraído, tanto de biopsias como de líneas celulares. El ARN es de buena calidad, particularmente el de líneas celulares. El ARN de las biopsias exhibe cierta degradación, posiblemente debida al tiempo que transcurrió entre la obtención de la muestra y su congelación, o bien, debido a las manipulaciones requeridas para pulverizar la muestra. En la Tabla 4 se anota la cantidad recuperada de ARN para cada una de las muestras.

Después de extraer el ARN, se obtuvo el ADN con el empleo del amortiguador STE, seguido de precipitación por etanol. En la Figura 7 se observa el ADN de biopsias que se obtuvo con éste método. La cantidad de ADN que se recuperó se anota en la Tabla 4.

PCR DE β -GLOBINA.

Con objeto de verificar que el ADN obtenido con éste procedimiento puede ser utilizado en reacciones de PCR, se amplificó un fragmento de 268pb del gen de β -globina con los oligonucleótidos G1120/PC04 (Greer y cols., 1994). En la Figura 8 se muestra el resultado de la amplificación de β -globina a partir de ADN de biopsias.

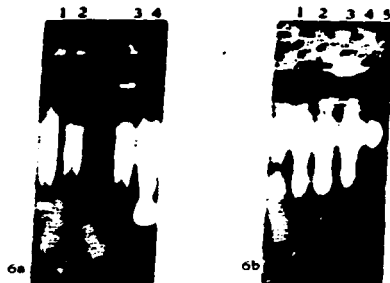


Figura 6. ARN total extraído de líneas celulares y de biopsias de cérvix. Figura 6a. ARN de las líneas celulares C33A, HT3, CaSki y HeLa (de izquierda a derecha). Las concentraciones de ARN total son de 2.4 μ g/ μ l, 1.1 μ g/ μ l, 1.9 μ g/ μ l y 4.8 μ g/ μ l, respectivamente. Se pusieron 2 μ l por carril. Figura 6b. ARN total extraído de biopsias de NICa. Carril 1, NIC III (0.22 μ g/ μ l); carriles 2 y 3, NIC II (0.62 μ g/ μ l y 0.79 μ g/ μ l); carriles 4 y 5, NIC I (0.56 μ g/ μ l y 1.60 μ g/ μ l). Se pusieron 3 μ l por carril. Las biopsias se procesaron como se indica en Materiales y Métodos. Coles de agarosa 1%, TBE IX, 80V.



Figura 7. ADN extraído de biopsias de pacientes con NIC II (carril 1), NIC I (carril 2), CaCu IIIB (carriles 3 y 4), y NIC III (carril 5). Las concentraciones son, respectivamente: 35ng/ μ l, 185 ng/ μ l, 920ng/ μ l, 1,595ng/ μ l y 45ng/ μ l. Las biopsias se pulverizaron y, después de extraer el ARN, se obtuvo el ADN de acuerdo con el procedimiento anotado en Materiales y Métodos. Gel de agarosa 1%, TBE IX, 80V.

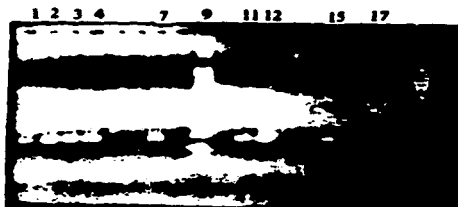


Figura 8. PCR de β -globina (oligonucleótidos GH20/PC04) realizado con ADN de biopsias. Carriles 1 a 3, cervicitis crónica; carril 4 NIC I; carril 7, CaCu IIIB; carril 9 marcador de fragmentos de ADN (múltiplos de 100pb); carriles 11 y 12, NIC II; carril 15, HeLa (control positivo); carril 17, control negativo. El perfil del PCR fue 3' a 94°C; 35 ciclos de 30" a 94°C; 30" a 59°C; y 1' a 72°C; al final, 10' a 72°C. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l (10 μ l se pusieron en cada carril), con 75ng de ADN, dNTPs a 50 μ M c/u, MgCl₂ a 1.5 mM, oligonucleótidos a 1ng/ μ l c/u, y 2.5 U de Taq (como se indica en Materiales y Métodos). Gel de agarosa 1%, TBE IX, 60V.

RT-PCR de p53.

Inmediatamente después de haber obtenido el ARN, se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa. Para esta se utilizó ARN total y oligo d(T). De éste modo, se pudo obtener el ADNc total. Unos microlitros de la reacción de transcripción inversa fueron transferidos a otro tubo para efectuar la amplificación de la porción central de *p53*, a partir del ADNc total.

En las Figuras 9 a 11 se muestran diferentes amplificaciones de *p53* al emplear éste procedimiento de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (*Reverse Transcription y Polymerase Chain Reaction, RT-PCR*). La Figura 9 exhibe un resultado de RT-PCR con un rendimiento pobre. Con objeto de optimizar la reacción, y aumentar su eficiencia, se llevaron a cabo reacciones de transcripción inversa con diferentes cantidades de ARN total: 2.4µg, 1.0µg, 0.5µg, 0.1µg y 0.05µg. A partir de cada una de estas reacciones se efectuaron tres reacciones de PCR, tomando 2µl, 5µl ó 10µl de la reacción de transcripción inversa. En la Figura 10 se observan las amplificaciones resultantes con cada una de las diferentes cantidades empleadas.

La Figura 11 muestra la amplificación del ADNc de *p53* al emplear 2.4µl de ARN total para la reacción de transcripción inversa, y 1µl de esta reacción para la PCR. El rendimiento fue superior al observado en las Figuras 9 y 10. En la RT-PCR de la Figura 11, la transcriptasa inversa fue inactivada antes de llevar a cabo la PCR, a diferencia de lo realizado en las reacciones de las Figuras 9 y 10, en las cuales no se inactivó esa enzima.

PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR Y SECUENCIACIÓN.

Se probaron diversos métodos de purificación del producto de PCR. Uno consistió en pasar el producto de PCR por columnas para después resuspenderlo en agua bidestilada. Otro método consistió en correr el producto de la RT-PCR de *p53* en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, para después cortar la banda y fundirla. La agarosa fundida, caliente, se transfirió a un tubo con resina Wizard y se purificó por columna. En un tercer

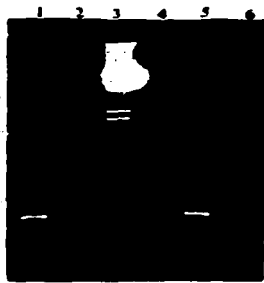


Figura 9. RT-PCR de *p53* a partir de ARN total de líneas celulares. De izquierda a derecha: HeLa, CaSki, marcador de fragmentos de ADN λ Hind III, C33A, HT3 y un control negativo. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 100 μ l, de los cuales se pusieron 25 μ l por pozo. Perfil de la reacción: RT 1hr a 37°C; PCR 3' a 94°C; 30 ciclos de 30'' a 94°C; 30'' a 59°C; 1' a 72°C; con 10' a 72°C de extensión final. dNTPs a 50 μ M c/u; oligonucleótidos a 1ng/ μ l c/u; $MgCl_2$ a 1.5 mM y 2.5 U de Taq (vease Materiales y Métodos). Gel de agarosa 2%, TAE 1X, 60V.



Figura 10. RT-PCR de *p53* con diferentes cantidades de ARN y del producto de la RT. Se empleó ARN total de HeLa. Se probaron diferentes cantidades de ARN para efectuar la RT y, después, se emplearon diferentes volúmenes de esa reacción para llevar a cabo la PCR. El perfil de las reacciones es el mismo que el de la figura anterior, lo mismo que la concentración de los componentes de la reacción, excepto por las cantidades de ARN y del producto de la RT. Carriles 1 a 3: RT con 2.4 μ g de ARN total, PCR con 2, 5 y 10 μ l de la reacción de RT. Carriles 4 a 6: RT con 1.0 μ g de ARN total; PCR con 2, 5 y 10 μ l de la reacción de RT. Carriles 7 a 9: RT con 0.5 μ g de ARN total; PCR con 2, 5 y 10 μ l de la reacción de RT. Carril 10, marcador de fragmentos de ADN (múltiplos de 100pb). Carriles 11 a 13: RT con 0.1 μ g de ARN total; PCR con 2, 5 y 10 μ l de la reacción de RT. Carriles 14 a 16: RT con 0.5 μ g de ARN total; PCR con 2, 5 y 10 μ l de la reacción de RT. Carril 17 control negativo. Carril 18 marcador de fragmentos de ADN (múltiplos de 100pb). De cada reacción se pusieron 10 μ l por carril. Gel de agarosa 2%, TAE 1X, 44V.

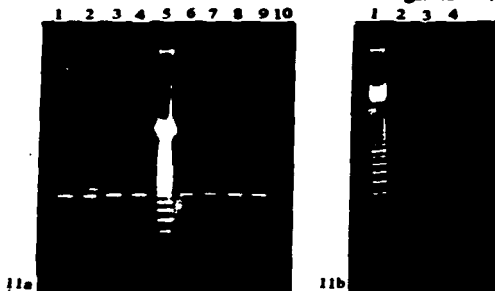


Figura 11. RT-PCR de *p53* con ARN total de líneas celulares mexicanas derivadas de cánceres cervicovaginal. Figura 11a. De izquierda a derecha: T1, T2, T4, T5, marcador de fragmentos de ADN (múltiplos de 100pb), T6, T7, T9, T10, control negativo. Figura 11b. Marcador de fragmentos de ADN (múltiplos de 100pb), SW13 (línea celular de riñón que se utilizó como control positivo), Inb1 y control negativo. Las reacciones de RT fueron de 20 μ l, con 2.4 μ l de ARN total para la RT e incubación de 1hr a 37°C. Para la PCR se efectuaron reacciones en un volumen de 50 μ l (en cada carril del gel se pusieron 10 μ l), con 1 μ l de la reacción de RT. dNTPs a 50 μ M c/u; oligonucleótidos a 1ng/ μ l c/u. $MgCl_2$ a 1.5 mM, y Taq a 2.5 U. Gel de agarosa 2%, TAE 1X, 60V.

procedimiento, se cortó la banda del gel, se fundió y se purificó con fenol, cloroformo y precipitación con etanol, para después llevar a cabo una segunda purificación, esta vez por columna.

El producto purificado de la reacción de RT-PCR se utilizó para secuenciar el ADNc de *p53*, por medio de secuenciación directa y cíclica. Para esta se utilizó uno de los oligonucleótidos que habían sido empleados en la reacción de PCR. En la Figura 12 se observan las secuencias de *p53* obtenidas a partir de la línea celular CEM. La secuencia que corresponde a *p53* (Mullashewski y cols., 1984). Las tres secuencias se llevaron a cabo simultáneamente y su calidad fue similar. Únicamente hubo dos diferencias entre esas reacciones: una fue que se emplearon productos de PCR purificados por medios distintos, lo cual, según se aprecia, no influyó en el resultado; la otra diferencia fue que en la primera secuencia se utilizó una menor cantidad de producto de PCR, que en las otras dos.

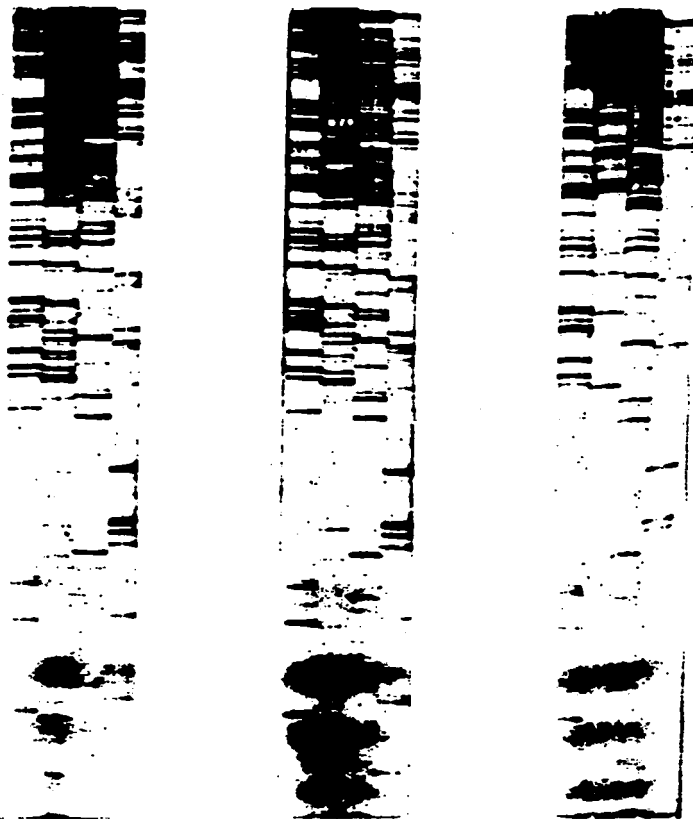


Figura 12. Secuencias de *p53* de C33A. La secuencia del extremo izquierdo se efectuó con 34ng de producto de PCR purificado por minicolumna; para la secuencia del centro se emplearon 80ng de producto de PCR que se purificó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se cortó la banda, se fundió, y el material fundido se purificó por minicolumna; en el extremo derecho la secuencia corresponde a 80ng de producto de PCR purificado por precipitación y después por minicolumna. Se empleó secuenciación cíclica con $[\alpha\text{-}^{32}\text{S}]$ dATP. El gel de acrilamida/bisacrilamida es al 6% y se corrió a 1,300V con una temperatura de 55°C (véase Materiales y Métodos).

DISCUSIÓN

En este trabajo, se buscó implementar las técnicas necesarias para determinar la presencia de mutaciones de *p53* en cáncer cervical. Aún cuando las técnicas debían conducir al estudio de *p53*, al elegirlas se consideró importante que fueran compatibles con el estudio de otras secuencias. Es decir, que las mismas técnicas permitieran, en principio, estudiar otros genes y transcritos. Igualmente, se pensó en la necesidad de que esos procedimientos fueran compatibles con la posibilidad de estudiar proteínas, provenientes de las mismas muestras que los ácidos nucleicos. El énfasis en estas características, de flexibilidad y eficiencia, se debe a que el cáncer es el resultado de numerosas alteraciones moleculares. Por lo tanto, si se desea hallar las alteraciones moleculares asociadas con esta enfermedad, es necesario poder estudiar cierto número de secuencias y productos génicos en las muestras de tumores. En suma, la intención fue implementar las técnicas para saber si *p53* está mutado en cáncer cervical, teniendo en cuenta que no es el único gen de interés en el origen de esta neoplasia.

La mayor parte de los estudios que han buscado mutaciones de *p53* en cáncer cervical (v. gr., Berresen y cols., 1992; Fujita y cols., 1992; Tsuda e Hirohashi, 1992; Chen y cols., 1993; Kessis y cols., 1993; Paquette y cols., 1993; Cho y cols., 1994; Jiko y cols., 1994; Miwa y cols., 1995), parten del ADN y, por PCR, amplifican exón por exón, para después llevar a cabo la secuenciación. Esta se lleva a cabo a veces con clonación y, otras, de manera directa, con Secuencasa (la polimerasa de ADN, recombinante, de T7). Se consideró que podría ser más práctico el empleo de RT-PCR para secuenciar, con una sola reacción, la totalidad de la región amplificada. Adicionalmente, se juzgó, tal como se expone en los párrafos posteriores, que la secuenciación directa y cíclica tendría la ventaja de ser más práctica que la clonación seguida de secuenciación manual.

Aún cuando en los trabajos citados arriba también se rescata el ADN de las muestras, para llevar a cabo la detección de secuencias de VPII, los procedimientos empleados no son compatibles con la recuperación de las proteínas. Esto, porque la disgregación del tejido

cervical, para recuperar los ácidos nucleicos, requiere la digestión del mismo con proteinasa K.

Por lo tanto, la revisión de esos procedimientos llevó a considerar conveniente el uso de otras técnicas que fueran más flexibles y eficientes, tal como se expone en las páginas siguientes.

OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los oligonucleótidos fueron diseñados para abarcar únicamente la porción que codifica la parte central de p53. Se diseñaron así por tres razones: **1)** debido a que en esa región de p53 se encuentra la mayor parte de las mutaciones reportadas para todos los tipos de cáncer humano (Levine, 1993; Levine y cols., 1995; Hainaut y cols., 1997) (Figura 13); **2)** en cáncer cervical, cuando se han buscado mutaciones de p53 en regiones distintas a esa (Crook y cols., 1992; Crook y Vousden, 1992; Paquette y cols., 1993; Miwa y cols., 1995), o incluso en la región reguladora del gen (Choo y Chong, 1993), no se han encontrado; y **3)** al momento de diseñar los oligonucleótidos, éstos flanqueaban la totalidad de los codones mutados de p53 en cáncer cervical.

Puede esperarse que, conforme se acumulen más estudios, podrán ser detectadas mutaciones infrecuentes en codones situados fuera de la región comprendida por los oligonucleótidos diseñados. De hecho, esto ha sucedido, aunque esas mutaciones son raras (véanse las Figuras 4 y 5, y la Tabla 5).

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

El primer paso fue hallar un método que permitiera obtener, de biopsias individuales, ambos ácidos nucleicos de manera simple, rápida, eficiente y en cantidades suficientes como para poder llevar a cabo el estudio de p53 y, eventualmente, de otros genes y proteínas. Esto implicó la necesidad de trabajar con un procedimiento que permitiera recuperar, como mínimo, los dos ácidos nucleicos a partir de muestras muy pequeñas, como son las biopsias que miden unos pocos milímetros.

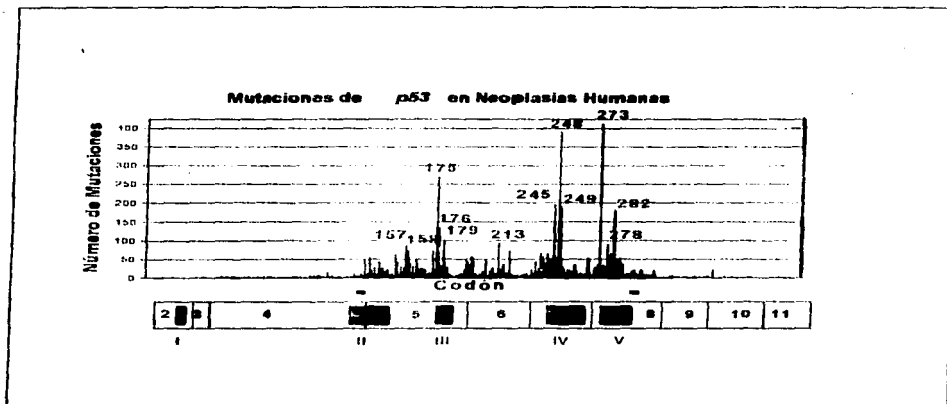


Figura 13. Distribución de todas las mutaciones en p53 reportadas hasta ahora. Los números arriba de las barras indican el codón al que corresponden; únicamente se numeran los doce codones que aparecen mutados con mayor frecuencia, y que juntos, dan cuenta del 37% de las mutaciones reportadas. En la parte inferior de la figura aparece secuenciada la proteína. Los números arábigos indican el exón que codifica la parte correspondiente. Los números romanos señalan las regiones conservadas. Las dos pequeñas barras arriba de la proteína indican la posición de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Existen varios métodos en la literatura que permiten recuperar los dos ácidos nucleicos (por ejemplo, Majumdar y cols., 1991, y las referencias allí indicadas). Se eligió el empleo del reactivo Trizol, el cual permite obtener las tres macromoléculas informacionales en un tiempo relativamente corto y de manera sencilla (Chomezynski, 1993).

Para obtener las macromoléculas informacionales primero hay que destruir el tejido. El cérvix está compuesto de abundante tejido conectivo (Kurmann y cols., 1992) que dificulta la extracción de los ácidos nucleicos. El tejido cervical puede ser disgregado con proteinasa K, pero esto implica la pérdida de las proteínas. Otra posibilidad es macerar el tejido con un homogeneizador, pero éste método tiene dos inconvenientes: el primero es que se requiere invertir bastante tiempo con cada muestra, y el segundo es que no logra destruirse por completo el tejido. En particular, éste último inconveniente es muy importante ya que si no se destruye el tejido no se logra recuperar una buena cantidad de

ácidos nucleicos. A esto hay que sumarle el hecho de que las biopsias contienen ellas mismas, por sus dimensiones, cantidades relativamente pequeñas de ácidos nucleicos.

Por lo tanto, se recurrió a la pulverización del tejido, que se efectuó macerando las muestras previamente congeladas en nitrógeno líquido (Círamza y cols., 1995; Tam y cols., 1993). Este procedimiento tiene la ventaja de que permite la destrucción total del tejido, sin que se pierda ninguna de las macromoléculas informacionales. Después de transferir el tejido pulverizado a un tubo Eppendorf, se llevó a cabo la extracción del ARN con el reactivo Trizol.

Una vez extraído el ARN total, se buscó extraer el ADN. Esto puede ser obtenido mediante precipitación con etanol, para después empastillarlo y lavarlo (Chomezynski, 1993). Sin embargo, éste procedimiento no dio buen resultado ya que el rendimiento de ADN siempre fue muy bajo. Por lo tanto, se buscó un procedimiento alternativo que fuera compatible con el Trizol, con sus ventajas y con el objetivo de recuperar también el ARN. La técnica hallada emplea amortiguador STE, con NaOH y SDS para obtener una fase acuosa con el ADN a partir de la interfase y de la fase orgánica remanentes de la extracción del ARN (Chevillard, 1993). De la fase acuosa se purifica el ADN por precipitación con etanol.

El empleo de estas técnicas fue satisfactorio, ya que la calidad de los ácidos nucleicos fue buena, a juzgar por su estado en geles de agarosa y porque resultaron adecuados para reacciones de PCR y de RT-PCR. Estas técnicas también resultaron satisfactorias desde el punto de vista de la cantidad de material recuperado, que es suficiente para el propósito de éste trabajo, que es secuenciar *p53*; también es compatible con la posibilidad de estudiar otras secuencias (genes o mensajeros) ya que la cantidad de material disponible es suficiente.

PCR DE β -GLOBINA.

La calidad del ADN fue comprobada mediante la amplificación, por PCR, de un fragmento del gen β -globina con los oligonucleótidos G1120/PC04 (Greer y cols., 1994). Para esto, fueron modificadas las condiciones establecidas en esta referencia. Por un lado, se redujo

la cantidad empleada de los reactivos, ya que se llevaron a cabo reacciones de 20 μ l, utilizándose las siguientes concentraciones finales: amortiguador 1X, dNTPS a 50 μ M cada uno, MgCl₂ 1.5mM; y las siguientes cantidades: 0.5U de polimerasa Taq, 2.5ng/ μ l de ADN total y 1ng/ μ l de cada oligonucleótido. Por otro lado, se modificó el perfil de la reacción con la finalidad de hacerla más rápida y eliminar amplificaciones inespecíficas: 3min a 94°C, 35 ciclos de 15seg a 96°C, 30seg a 59°C y 1min a 72°C; con una extensión final de 10min a 72°C (en contraste con 40 ciclos de 1min a 95°C; 1min a 55°C; y 2min a 72°C; con una extensión final de 5min a 72°C, en Greer y cols., 1994).

La base para reducir el tiempo de cada paso en la PCR la da el hecho de que una vez que se alcanzan las temperaturas de desnaturalización o de alineamiento, son instantáneas tanto la desnaturalización del ADN como la unión de los oligonucleótidos a secuencias perfectamente complementarias (es decir, sin "mismatches"). Esto permite emplear tiempos muy cortos para dichos pasos (Willwer y Garling, 1991).

En cuanto al tiempo de extensión, 30 segundos son más que suficientes para obtener una buena amplificación, de un producto de éste tamaño, debido a la alta velocidad de polimerización de las polimerasas de ADN (Huber y cols., 1987; Tabor y Richardson, 1987). Más aún, debe tenerse en cuenta que la polimerización no se lleva a cabo exclusivamente cuando se llega a la temperatura de extensión (72°). En su lugar, comienza en cuanto se unen los oligonucleótidos al templado, a la temperatura de alineamiento, y continúa, aunque de manera lenta, durante el tiempo que le lleva al termociclador incrementar la temperatura hasta alcanzar la óptima para el funcionamiento de la polimerasa. La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos se elevó hasta 59°C (en contraste con los 55°C de Greer y cols., 1994) con objeto de tener una amplificación más limpia, sin inespecificidades.

En la literatura aparecen reportadas, casi invariablemente, reacciones de PCR con condiciones más laxas, en los componentes de la reacción y en su perfil, que las utilizadas aquí. Sin embargo, aquí se buscó utilizar una menor cantidad de algunos reactivos y menos tiempo.

RT-PCR DE p53.

Se decidió realizar RT-PCR de *p53*, en lugar de PCR, debido a que éste gen tiene intrones muy grandes (Figura 1). Al trabajar con el ADNc se reduce el tamaño de la secuencia que se maneja y, al no tener las regiones correspondientes a los intrones, se trabaja únicamente con la región que codifica la proteína. Una alternativa sería no trabajar con el mensajero, sino con el gen, realizando PCR de cada uno de los exones de interés (del 5 al 8 en éste caso). Sin embargo, éste enfoque tiene el inconveniente de incrementar el número de oligonucleótidos y de reacciones que se requieren.

La transcripción inversa (Bashtchian, 1994) se realizó inmediatamente después de haber aislado el ARN total. Hay diversas variantes de ésta técnica. La transcripción inversa y la PCR se pueden llevar a cabo en un mismo tubo (por ejemplo, Wang y cols., 1992; Aatsinki y cols., 1994) o en tubos separados; y se puede utilizar oligo d(CT), hexámeros aleatorios o un oligonucleótido específico para el mensajero de interés. En éste trabajo se decidió llevar a cabo la transcripción inversa con oligo d(CT) por dos razones. La primera es que con éste se obtiene ADNc de todos los ARNm que tengan cola de poli A y, de éste modo, con el mismo ADNc podrían realizarse, en principio, varias PCRs para amplificar diferentes transcritos. En cambio, si se emplea un oligonucleótido específico para un mensajero, únicamente se obtendrá ADNc de ese y solamente podrá hacerse PCR para esa secuencia.

También se decidió llevar a cabo la RT y la PCR en tubos distintos (es decir, en dos pasos, en dos reacciones separadas) por la flexibilidad que esto le confiere a la PCR. Hay varias formas de llevar a cabo la RT-PCR en un sólo tubo, pero en todas ellas se obtiene un sólo producto de PCR a partir del ADNc. Al efectuar la RT-PCR en un solo tubo es necesario llevar a cabo una reacción de RT-PCR por cada secuencia distinta que se desee amplificar. Esto puede representar un inconveniente cuando la cantidad de ARN disponible es limitada, como sucede cuando se trabaja con biopsias.

En cambio, cuando se emplean tubos separados y oligo d(CT), se obtiene el ADNc de todos los mensajeros. Éste se puede almacenar de manera más segura que el ARN, que es más lábil, para después ir tomando pequeñas cantidades y poder realizar PCRs de diversos transcritos, todo con el mismo ADNc total. De éste modo, podrían llegar a estudiarse

diferentes secuencias con ese ADNc si surge el interés por las mismas, o a medida que se descubran nuevos genes relacionados con el cáncer. En cambio, con la RT-PCR en un mismo tubo, es necesario decidir desde el principio las secuencias que se van a estudiar y, una vez que se tiene la reacción, ya no pueden estudiarse otras secuencias si no es con otra reacción de RT-PCR que parta del mismo ARN total.

La implementación de la RT-PCR para *p53* requirió superar el problema de una amplificación inefficiente. Inicialmente, se llevaron a cabo reacciones de RT con 1µg de ARN total y, de la reacción de RT, se tomaron 10µl para agregarlos a una mezcla de PCR de 90µl (100µl, volumen total de la reacción). Con estas condiciones la cantidad de producto obtenida fue muy baja, siendo necesario utilizar hasta la cuarta parte (25µl) de la reacción de PCR para detectar el producto en un gel de agarosa (Figura 9). Se procuró optimizar la reacción utilizando diferentes cantidades de ARN total para llevar a cabo la RT y, después, tomando distintas cantidades de ésta para efectuar la PCR (Figura 10). De éste modo, se halló que las mejores condiciones consistían en emplear 2.4µg ó 1.0µg de ARN total para la RT, y en la adición de 5µl ó 10µl de esa reacción a la mezcla de PCR (volumen total de 100µl). Posteriormente, sin embargo, se encontró que la transcriptasa inversa puede inhibir la PCR cuando aquélla no es inactivada (Chumakov, 1994). Así, cuando al término de la RT se procedió a inactivar por calor la transcriptasa inversa, el rendimiento de la PCR aumentó notablemente y fue posible emplear menos ADNc (1µl de la RT) para efectuar la PCR. Esta, a su vez, se llevó a cabo en un volumen de reacción menor al original (50µl) (Figura 11). Con estos cambios, no sólo aumentó la cantidad del producto, sino que se redujo el empleo de reactivos.

SECUENCIACIÓN.

Se empleó el método de Sanger (Sanger y cols., 1977) en su variante de secuenciación directa y cíclica ya que, comparada con otras técnicas (v. gr., Sequenase), ofrece varias ventajas para secuenciar una gran cantidad de muestras de manera rápida, relativamente sencilla y barata (Kretz y cols., 1994; Rao, 1994a, 1994b): la secuenciación cíclica se efectúa en un volumen muy pequeño de reacción (6.2µl con el método empleado aquí), por lo cual se emplea una menor cantidad de reactivos (v. gr., oligonucleótidos, dNTPs y

ddNTPs); la secuenciación directa no requiere clonar, transformar ni sembrar las bacterias transformadas para después secuenciar: basta con el producto de PCR purificado para hacer la secuencia. Adicionalmente, la secuenciación cíclica tiene la ventaja de que pueden hacerse simultáneamente varias reacciones, más que las tres o cuatro que podrían hacerse al mismo tiempo con los métodos tradicionales.

Podría pensarse que el empleo de productos de PCR para ser secuenciados es poco aconsejable, en virtud de que las polimerasas cometen errores (introducen mutaciones) durante la polimerización (Cha y Thilly, 1993); en particular aquéllas, como la polimerasa Taq, que carecen de actividad de corrección (actividad exonucleasa 3'→5'). La realidad es, sin embargo, que estos errores en la reacción de PCR no llegan a ser detectados al secuenciar ese producto, siempre y cuando se emplee secuenciación directa (en contraste con la secuenciación de productos de PCR clonados) (Rao, 1994b). La razón por la cual estos errores no se reflejan en la secuenciación directa, se debe a que en ésta se obtiene la secuencia de una población de moléculas. Es decir, se toma cierta cantidad de producto de PCR, que contiene muchas moléculas, y se lleva a cabo la reacción de secuencia. Es posible que en esa población de moléculas haya algunas con mutaciones introducidas en la PCR; sin embargo, predominarán las secuencias correctas. Considérese el siguiente caso extremo (Rao, 1994b): Para la reacción de PCR se emplea como templado una sola cadena doble de ADN y la polimerasa comete un error en el primer ciclo de amplificación. Como resultado de éste error, al terminar el primer ciclo sólo una de las cuatro cadenas tiene una mutación; con esto, al finalizar la PCR habrá un 25% de cadenas con esa mutación en particular, y serán minoría frente a las cadenas sin errores (Rao, 1994b). Este ejemplo ilustra el caso extremo, pero, en realidad, para la reacción de PCR normalmente se emplean, como templado, varios miles de moléculas de ADN. Por lo tanto, aún si la polimerasa introduce una mutación, ésta estará representada en una baja proporción en el producto final y no será detectada por la secuenciación directa.

En cualquier caso, las mutaciones que aparezcan al secuenciar, pueden ser confirmadas repitiendo la RT-PCR, o secuenciando directamente el ADN.

En el caso de la secuenciación de productos de PCR clonados, las mutaciones introducidas por la PCR sí deben ser motivo de atención. Ésto, porque en éste tipo de secuenciación se

toma una de las moléculas amplificadas y se clona, para después secuenciarla. Nada impide que, por coincidencia, la secuencia clonada sea una de aquéllas que contienen una mutación introducida por la polimerasa en la PCR.

Para emplear secuenciación directa y cíclica de productos de PCR, resulta fundamental que el templado esté libre de los oligonucleótidos y los dNTPs sobrantes de la PCR, con objeto de que no interfieran con la reacción de secuencia (Ruano y Kidd, 1991; Rao y Saunders, 1992; Rao, 1994a, 1994b). En la PCR normalmente se utiliza un exceso de oligonucleótidos y de dNTPs, la mayor parte de los cuales permanece sin ser utilizada al terminar la reacción (Ruano y Kidd, 1991; Rao y Saunders, 1992; Rao, 1994b). Si se toman unos microlitros de la reacción de PCR (sin purificar el producto) y se ponen en una reacción de secuencia directa y cíclica, los oligonucleótidos sobrantes de la PCR (el sentido y el antisentido) darán lugar a cadenas de secuencia que aparecerán en la placa junto con las cadenas sintetizadas a partir del oligonucleótido utilizado en la secuencia. Aún si éste último oligonucleótido es el mismo que uno de los presentes en la PCR, aparecerán cadenas mezcladas (debidas al otro oligonucleótido de la PCR) y no podrá leerse la secuencia. Por su parte, los dNTPs sobrantes de la reacción de PCR provocarán una disminución en la tasa de ddNTPs/dNTPs, con lo cual habrá pocas cadenas cortas en la secuencia. Esto se debe a que las polimerasas empleadas en la secuencia tienen una mayor afinidad por los dNTPs que por los ddNTPs, así que éstos deben estar en una proporción elevada (con respecto a los dNTPs) para favorecer su incorporación por la polimerasa y que las cadenas de secuencia puedan terminar (Fabor y Richardson, 1989; Rao y Saunders, 1992). Si se hacen reacciones de secuencia sin eliminar los dNTPs de la PCR, se reduce la probabilidad de que la polimerasa tome ddNTPs.

La secuenciación resultó problemática, debido a que las bandas en la autorradiografía fueron muy débiles, impidiendo la lectura de la secuencia. Este problema no logró ser corregido, por lo cual se requiere afinar esta técnica. Las mejores secuencias se muestran en la Figura 12.

Desde un principio se presentó la dificultad mencionada. Para superarla, se probaron diferentes condiciones en la reacción de secuencia, así como distintos métodos de purificación del producto de PCR:

- El empleo del control (pUC19), del kit de secuencia, dió lugar a secuencias de buena calidad. Sin embargo, al llevar a cabo, de manera simultánea, reacciones de secuencia de *p53* y del control, estas últimas salieron bien, mientras que la señal de *p53* fue casi imperceptible. Con esto se pudo descartar que los reactivos para secuenciar estuvieran en mal estado, y se determinó que la dificultad estaba asociada, específicamente, con la secuenciación del producto de PCR de *p53*.
- Se ajustaron las condiciones de la secuenciación cíclica a las características del oligonucleótido empleado, subiendo la temperatura de alineamiento (de 55°C a 72°C). El aumento en la temperatura de alineamiento se puso en práctica para favorecer la unión del oligonucleótido al templado, en lugar de la reasociación de las cadenas recién polimerizadas con el templado: los oligonucleótidos son más cortos y están en mayor abundancia, por lo cual es más fácil que se unan al templado (Liao, 1994a). Esta modificación, junto con el incremento en la temperatura del gel de poliacrilamida (50°C), no dió lugar a un aumento en la calidad de las bandas, aunque fueron eliminadas algunas bandas asociadas con reacciones de paro (bandas que se presentan al mismo nivel en los cuatro terminadores y que, por esta razón, no corresponden a la unión de éstos).
- Para incrementar la intensidad de las bandas, y hacer posible la lectura de la secuencia, se incrementaron algunos valores:
 - el número de ciclo de la reacción de secuencia se elevó de 20 a 30;
 - la cantidad de isótopo ³⁵S se elevó de 2 a 2,5µl, teniendo cuidado de que fuera reciente;
 - se cambió de ³⁵S a ³²P;
 - el tiempo de exposición de la placa, cuando se empleó ³⁵S, se incrementó a diez y aún doce días;
 - se probaron diferentes cantidades de templado: 17ng, 34ng y 80ng.
 Con ninguna de estas modificaciones hubo una mejora razonable en la calidad de la secuencia.
- Se pensó que, quizá, el problema podría no ser la reacción de secuencia en sí, sino el producto de PCR utilizado. Específicamente, su pureza. Como se mencionó en párrafos anteriores, éste es un punto importante cuando se lleva a cabo secuenciación cíclica y directa de productos de PCR. Por esta razón, se compararon distintos métodos de

purificación. No obstante, todos dieron lugar a secuencias de calidad similar (Figura 12).

En suma, los reactivos de secuencia se encontraron en buenas condiciones, a juzgar por el resultado de la secuenciación del control (pUC19), pero no fue posible obtener un resultado satisfactorio con *p53*. Aún cuando no está claro que es lo que provoca que las bandas de *p53* sean tan débiles, los intentos realizados parecen indicar que el problema reside, de algún modo, en el producto de PCR que está siendo empleado para secuenciar.

El objetivo de éste trabajo fue implementar un conjunto de técnicas que permitieran determinar la presencia de mutaciones de *p53* en cáncer cervicecúter. Este cáncer es la neoplasia más frecuente en México, y casi siempre está asociada con secuencias de VPH de alto riesgo. Por su parte, *p53* es el gen supresor de tumores que está mutado con mayor frecuencia en cánceres humanos. Todavía no está suficientemente comprendida la relación entre la oncoproteína E6, codificada por el genoma de VPH de alto riesgo, y *p53*, aunque aquélla parece interferir con las funciones de ésta.

Las técnicas a implementar, para detectar mutaciones de *p53* en cáncer cervical, debían cumplir con ciertas características, como son el poder trabajar con muestras de tamaño pequeño, como las biopsias; que pudieran permitir la recuperación de los dos ácidos nucleicos, además de ser compatibles con la recuperación de las proteínas, todo esto a partir de la misma muestra; que la eficiencia en la recuperación de las macromoléculas informacionales permitiera pensar en el estudio de más de una o dos secuencias por muestra; y que fueran, en la medida de lo posible, de uso sencillo.

El trabajo culminó con la implementación de los procedimientos que van del manejo de la muestra hasta la RT-PCR. El estado de la secuenciación puede mejorar todavía, antes de poder ser aplicada, en tanto que las bandas de las secuencias son débiles y no permiten leer, de manera inequívoca, porciones largas.

Hacia adelante, quedan, como tareas inmediatas, el afinar el procedimiento de secuenciación de *p53*, en primer lugar, para después aplicarlo a líneas y a tumores. Asimismo, aunque ya no tan inmediato como lo anterior, se podrían incorporar algunas

otras técnicas, como serían el manejo de las proteínas, junto con los ácidos nucleicos, y el empleo de estas técnicas en estudios con diversas secuencias, teniendo en cuenta que el cáncer resulta de la alteración de cierto número de genes y no uno sólo.

REFERENCIAS

- Antsioki, J.T., J.T. Lakkakorpi, E.M. Pietilä y H.J. Rujanieni. 1994. A coupled one-step reverse transcription PCR procedure for generation of full-length open reading frames. *BioTechniques*, 16(2):282, 284, 286, 288.
- Agoff, S.N., J. Hou, D.L.-H. Linzer y B. Wu. 1993. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science*, 259:84-87.
- Altman, A., I. Joehms y F. Rösl. 1994. Intra- and extracellular control mechanisms of human papillomavirus infection. *Intervirolgy*, 37(3-4):180-188.
- Berresen, A.L., Å. Helland, J. Nesland, R. Holm, C. Trope y J. Kaern. 1992. Papillomaviruses, p53 and cervical cancer. *Lancet*, 339:1350-1351; corrección en *Lancet*, 340:318.
- Bouck, N. 1996. p53 and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1287(1):63-66.
- Busby-Earle, R.M., C.M. Steel, A.R. Williamson, B. Cohen y C.C. Bird. 1992. Papillomavirus, p53 and cervical cancer. *Lancet*, 339:1,350.
- Busby-Earle, R.M., C.M. Steel, A.R. Williams, B. Cohen y C.C. Bird. 1994. p53 mutations in cervical carcinogenesis -low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status. *British Journal of Cancer*, 69:732-737.
- Butz, K., L. Shahabuddin, C. Geisen, D. Spitkovsky, A. Ullmann y F. Hoppe-Seyler. 1995. Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*, 10:927-936.
- Caelles, C., A. Heisenberg y M. Karin. 1994. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*, 370(6486):220-223.
- Clarke, A.R., C.A. Purdie, D.J. Harrison, R.G. Morris, C.C. Bird, M.L. Hooper y A.H. Wyllie. 1993. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362(6423):849-852.
- Crook, T. y K.H. Vousden. 1992. Properties of p53 mutations detected in primary and secondary cervical cancers suggest mechanisms of metastasis and involvement of environmental carcinogens. *The EMBO Journal*, 11:3935-3940.
- Crook, T., D. Wrede, J.A. Tidy, W.P. Mason, D.J. Evans y K.H. Vousden. 1992. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumors. *Lancet*, 339:1070-1073.
- Crook, T., D. Wrede y K.H. Vousden. 1991. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*, 6:873-875.

- Chang, Y. y G.E. Wu. 1992. A simple and rapid procedure for pouring sequencing gels. **BioTechniques**, 12(1):78.
- Chen, T.M., Ch. A. Chen, Ch. Y. Hsieh, D.Y. Chang, Y.H. Chen y V. Defendi. 1993. The state of *p53* in primary human cervical carcinomas and its effects in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. **Oncogene**, 8(6):1511-1518.
- Chevillard, S. 1993. A method for sequential extraction of RNA and DNA from the same sample, specially designed for a limited supply of biological material. **BioTechniques**, 15(1):22, 24.
- Chin, K.V., K. Ueda, I. Pastan y M.M. Gottesman. 1992. Modulation of activity of the promoter of the human *MDR1* gene by Ras and p53. **Science**, 255:459-462.
- Cho, Y., S. Gorina, P.D. Jeffrey y N.P. Pavletich. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science**, 265(5170):346-355.
- Chomezynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, 15(3):532-534, 536-537.
- Choo, K.B. y K.Y. Chong. 1993. Absence of mutation in the *p53* and the retinoblastoma susceptibility genes in primary cervical carcinomas. **Virology**, 193(2):1042-1046.
- Chumakov, K.M. 1994. Reverse transcriptase can inhibit PCR and stimulate primer-dimer formation. **PCR Methods and Applications**, 4(1):62-64.
- Davies, R., R. Hicks, T. Crook, J. Morris y K. Vousden. 1993. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. **Journal of Virology**, 67(5):2,521-2,528.
- Defeo-Jones, D., P.S. Huang, R.E. Jones, K.M. Haskell, G.A. Vuocolo, M.G. Hanbik, H.E. Huber y A. Cliff. 1991. Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. **Nature**, 352(6332):251-254.
- Dyson, N., P.M. Howley, K. Münger y E. Harlow. 1989. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, 243(4893):934-937.
- El-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler y B. Vogelstein. 1993. *WAF1*, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, 75(4):817-825.
- Farthing, A.J. y K.H. Vousden. 1994. Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. **Trends in Microbiology**, 2(5):170-174.
- Fisher, S.G. 1994. Epidemiology: a tool for the study of human papillomavirus-related carcinogenesis. **Intervirology**, 37(3-4):215-225.
- Fuchs, P.G. y H. Pfister. 1994. Transcription of papillomavirus genomes. **Intervirology**, 37(3-4):159-167.

- Fujita, M., M. Inoue, O. Tanizawa, S. Iwamoto y T. Enomoto. 1992. Alterations of the *p53* gene in human primary cervical carcinoma with and without human papillomavirus infection. **Cancer Research**, 52:5323-5328.
- Gottlieb, T.M. y M. Oren. 1996. p53 in growth control and neoplasia. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1287:77-102.
- Gramza, A.W., J.M. Lucas, R.E. Mountain, D.E. Schuller y J.C. Lang. 1995. Efficient method for preparing normal and tumor tissue for RNA extraction. **BioTechniques**, 18(2):228, 231.
- Greer, C.E., C.M. Wheeler y M.M. Manos. 1994. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. **PCR Methods and Applications**, 3(6):S113-S22.
- Hainaut, P., T. Soussi, B. Shomer, M. Hollstein, M. Greenblatt, E. Hovig, C.C. Harris y R. Montesano. 1997. Database of *p53* gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. **Nucleic Acids Research**, 25(1):151-157.
- Harlow, E., N.M. Williamson, R. Ralston, D.M. Helfman y T.E. Adams. 1985. Molecular cloning and *in vitro* expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. **Molecular and Cellular Biology**, 5(7):1,601-1,610.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi y S.J. Elledge. 1993. The p21 cdk-interacting protein *cip1* is a potential inhibitor of G₁ cyclin-dependent kinases. **Cell**, 75(4):805-816.
- Harris, C.C. y M. Hollstein. 1993. Clinical implications of the *p53* tumor-suppressor gene. **The New England Journal of Medicine**, 329(18):1318-1327.
- Hartwell, L. 1992. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. **Cell**, 71(4):543-546.
- Helland, A., R. Holm, G. Kristensen, J. Kaern, F. Karlson, C. Trope, J.M. Nesland, y A.L. Borresen. 1993. Genetic alterations of the TP53 gene, p53 protein expression, and HPV infection in primary cervical carcinomas. **Journal of Pathology**, 171:105-114.
- Hollstein, M., B. Shomer, M. Greenblatt, T. Soussi, E. Hovig, R. Montesano y C.C. Harris. 1996. Somatic point mutations in the *p53* gene of human tumors and cell lines: updated compilation. **Nucleic Acids Research**, 24(1):141-146.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein y C.C. Harris. 1991. *p53* mutations in human cancers. **Science**, 253(5015):49-52.
- Hoppo-Seyler, F. y K. Butz. 1993. Repression of endogenous p53 transactivation function in HeLa cervical carcinoma cells by human papillomavirus type 16 E6, human *mdm-2*, and mutant p53. **Journal of Virology**, 67(6):3,111-3,117.
- Huber, H.E., S. Tabor y Ch.C. Richardson. 1987. Escherichia coli thioredoxin stabilizes complexes of bacteriophage T7 DNA polymerase and primed templates. **Journal of Biological Chemistry**, 262(33):16224-16232.

- Huibregtse, J.M., M. Scheffner y P.M. Howley. 1993a. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. **Molecular and Cellular Biology**, 13(2):775-784.
- Huibregtse, J.M., M. Scheffner y P.M. Howley. 1993b. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association, and ubiquitination of associated proteins. **Molecular and Cellular Biology**, 13(8):4,918-4,927.
- Ikenberg, H., K. Matthay, B. Schmitt, T. Bauknecht, M. Kiechle-Schwarz, A. Göppinger y A. Pfeleiderer. 1995. *p53* mutation and *mdm-2* amplification are rare even in human papillomavirus-negative cervical carcinomas. **Cancer**, 76:57-66.
- Jiko, K., H. Tsuda, S. Sato y S. Hirohashi. 1994. Pathogenetic significance of *p53* and *c-Ki-ras* gene mutations and human papillomavirus DNA integration in adenocarcinoma of the uterine cervix and uterine isthmus. **International Journal of Cancer**, 59:601-606.
- Kustan, M.B., Q. Zhan, W.S. El-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W.V. Walsh, B.S. Plunkett, B. Vogelstein y A.J. Fornace, jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. **Cell**, 71(4):587-597.
- Kessis, T.D., R.J. Slebos, S.M. Han, K. Shah, X.F. Bosch, N. Muñoz, L. Hedrick y K.R. Cho. 1993. *p53* mutation and *mdm-2* amplification are uncommon in primary carcinomas of the uterine cervix. **American Journal of Pathology**, 14(5):1398-1405.
- Kretz, K., W. Callen y V. Hedden. 1994. Cycle sequencing. **PCR Methods and Applications**, 3(5):S107-S112.
- Kurmann, R.J., H.J. Norris y E. Wilkinson. 1992. **Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Cervix, Vagina, and Vulva**. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 262p.
- Lamb, P. y L. Crawford. 1986. Characterization of the human *p53* gene. **Molecular and Cellular Biology**, 6(5):1,379-1,385.
- Lane, D.P. y S. Beachmol. 1990. *p53*: oncogene or anti-oncogene? **Genes and Development**, 4(1):1-18.
- Lechner, M.L., D.H. Mack, A.B. Finicle, T. Crook, K.H. Vousden y L.A. Laimins. 1992. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 *in vivo* and abrogate p53-mediated repression of transcription. **The EMBO Journal**, 11(8):3,045-3,052.
- Levine, A.J. 1993. The tumor suppressor genes. **Annual Review of Biochemistry**, 62:623-651.
- Levine, A.J., M.C. Wu, A. Chang, A. Silver, E.F. Attiyeh, J. Lin y Ch. B. Epstein. 1995. The spectrum of mutations at the *p53* locus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 768:111-128.
- Liang, X.H., M. Volkmann, R. Klein, B. Herman y S.J. Lockett. 1993. Co-localization of the tumor-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human carcinoma cell lines. **Oncogene**, 8:2,645-2,652.

- Lin, D., M.T. Shields, S.J. Ulrich, E. Appella y W.E. Mercer. 1992. Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G₁ phase. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 89(19):9,210-9,214.
- Lin, J., X. Wu, J. Chen, A. Chang y A.J. Levine. 1994. Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, LIX:215-223.
- Livingstone, L.R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks y T.D. Tlsty. 1992. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. **Cell**, 70(6):923-935.
- Lowe, S.W., E.M. Schmitt, S.W. Smith, B.A. Osborne y T. Jacks. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. **Nature**, 362(6423):847-849.
- Majumdar, D., Y.J. Avissar y J.H. Wyche. 1991. Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: a new approach for isolating DNA. **BioTechniques**, 11(1):94-96, 98-101.
- Matlashewski, G., P. Lamb, D. Pim, J. Peacock, L. Crawford y S. Benchimol. 1984. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. **The EMBO Journal**, 3(13):3,257-3,262.
- McDougall, J.K. 1994. Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. **En: zur Hausen, H., dir. 1994. Human pathogenic papillomaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology**, vol. 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp 101-119.
- Meyers, C. y L.A. Laimins. 1994. *In vitro* systems for the study and propagation of human papillomaviruses. **En: zur Hausen, H., dir. 1994. Human pathogenic papillomaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology**, vol. 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp 199-215.
- Miwa, N., S. Miyamoto, H. Kato, T. Imamura, M. Nishida, Y. Yoshikawa, Y. Nagata y N. Wake. 1995. The role of p53 inactivation in human cervical cell carcinoma development. **British Journal of Cancer**, 7:219-226.
- Münger, K., B.A. Werness, N. Dyson, W.C. Phelps, E. Harlow y P.M. Howley. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 protein with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **The EMBO Journal**, 8(13):4099-4105.
- Nelson, J.E. y S.A. Krawetz. 1994. Easy-read DNA sequencing gels. **BioTechniques**, 17(3):416-418.
- Nigro, J.M., S.J. Baker, A.C. Preisinger, J.M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S.H. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, D. Devilee, T. Glover, F.S. Collins, A. Weston, R. Modali, C.C. Harris y B. Vogelstein. 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, 342:705-708.

- Oendiz, R., R. Saucedo, M. Cruz, A.M. Graef y P. Gariglio. 1987. High correlation between molecular alterations of *c-myc* oncogene and carcinoma of the uterine cervix. **Cancer Research**, 47:4173-4177.
- Paquette, R.L., Y.Y. Lee, S.P. Wilczynski, A. Karmakar, M. Kizaki, C.W. Miller y H.P. Koeffler. 1993. Mutations of *p53* and human papillomavirus infection in cervical carcinoma. **Cancer**, 72(4):1272-1280.
- Park, D.J., S.P. Wilczynski, R.L. Paquette, C.W. Miller y H.P. Koeffler. 1994. *p53* mutations in HPV-negative cervical carcinoma. **Oncogene**, 9:205-210.
- Parkinson, K.K., R.F. Newbold y W.N. Keith. 1997. The genetic basis of human keratinocyte immortalization in squamous cell carcinoma development: the role of telomerase reactivation. **European Journal of Cancer**, 33(5):727-734.
- Pecoraro, G., M. Lee, D. Morgan y V. Defendi. 1991. Evolution of *in vitro* transformation and tumorigenesis of HPV 16 and HPV 18 immortalized primary cervical epithelial cells. **American Journal of Pathology**, 138(1):1-18.
- Pfister, H. y P.G. Fuchs. 1994. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. **Intervirology**, 37(3-4):143-149.
- Prives, C. y J.J. Manfredi. 1993. The p53 tumor suppressor protein: meeting review. **Genes and Development**, 7:529-534.
- Prokopczyk, B., J.E. Cox, D. Hoffmann y S.E. Waggoner. 1997. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and non-smokers. **Journal of the National Cancer Institute**, 89(12):868-873.
- Rao, V.B. 1994a. Strategies for direct sequencing of PCR-amplified DNA. **PCR Methods and Applications**, 4(1):S15-S23.
- Rao, V.B. 1994b. Direct sequencing of polymerase chain-reaction-amplified DNA. **Analytical Biochemistry**, 216(1):1-14.
- Rao, V.B. y N.B. Saunders. 1992. A rapid polymerase-chain-reaction-directed sequencing strategy using a thermostable DNA polymerase from *Thermus flavus*. **Gene**, 113:17-23.
- Rashtchian, A. 1994. Amplification of RNA. **PCR Methods and Applications**, 4(2):S83-S91.
- Reed, A.P., T.A. Kost y T.J. Miller. 1986. Simple improvements in ³²S dideoxy sequencing. **BioTechniques**, 4(4):306, 308.
- Riou, G., M. Favre, D. Jeannel, J. Bourhis, V. Le Doussal y G. Orth. 1990. Association between poor prognosis in early stage invasive carcinomas and non-detection of HPV DNA. **Lancet**, 335:1,171-1,174.
- Ruano, G. y K.K. Kidd. 1991. Coupled amplification and sequencing of genomic DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 88:2815-2819.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

- Sanger, F., S. Nicklen y A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 74:5463-5467.
- Sasagawa, T., Y. Dong, K. Saijoh, S. Satake, M. Tateno y M. Inoue. 1997. Human papillomavirus infection and risk determinants for squamous intraepithelial lesion and cancer in Japan. **Japanese Journal of Cancer Research**, 88(4):376-384.
- Scheffner, M., J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra y P.M. Howley. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, 75(3):495-505.
- Scheffner, M., K. Münger, J.C. Byrne y P.M. Howley. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 88(13):5523-5527.
- Scheffner, M., H. Romanczuk, K. Münger, J.M. Huibregtse, J.A. Mietz y P.M. Howley. 1994. Functions of human papillomavirus proteins. **En: zur Hausen, H., dir. 1994. Human pathogenic papillomaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology**, vol. 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp 83-99.
- Scheffner, M., B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine y P.M. Howley. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, 63(6):1,129-1,136.
- Schiffman, M. H. 1994. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. **En: zur Hausen, H., dir. 1994. Human pathogenic papillomaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology**, vol. 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp 55-81.
- Schneider, A. 1994. Natural history of genital papillomavirus infections. **Intervirology**, 37(3-4):201-214.
- Scars, L.E., L.S. Moran, C. Kissinger, T. Creasey, H. Perry-O'Keefe, M. Roskey, E. Sutherland y B.E. Slatko. 1992. CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable Vent(exo) DNA polymerase. **BioTechniques**, 13(4):626-630, 632-633.
- Sedman, S.A., M.S. Barbosa, W.C. Vass, N.L. Hubbert, J.A. Haas, D.R. Lowy y J.T. Schiller. 1991. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. **Journal of Virology**, 65(9):4,860-4,866.
- Sherr, Ch.J. y J.M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. **Genes and Development**, 9(10):1,149-1,163.
- Soussi, T., C. Caron de Fromental y P. May. 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. **Oncogene**, 5:945-952.

- Srivastava, S., Y.A. Tong, K. Devadas, Z.-Q. Zou, Y. Chen, K.F. Pirolo y E.H. Chang. 1992. The status of the *p53* gene in human papilloma virus positive or negative cervical carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, 13(7):1273-1275.
- SSA. 1996. **Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México**. Dirección General de Epidemiología, SSA, México. 130p.
- Stewart, N., G.G. Hicks, F. Paraskevas y M. Mowat. 1995. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene*, 10:109-115.
- Stöppler, H., M.C. Stöppler y R. Schlegel. 1994. Transforming proteins of the papillomaviruses. *Intervirolgy*, 37(3-4):168-179.
- Tabor, S. y Ch.C. Richardson. 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 84:4767-4771.
- Tabor, S. y Ch.C. Richardson. 1989. Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86:4076-4080.
- Tam, P.E., A.M. Schmidt y R.P. Messner. 1993. Modified tissue pulverization technique and evaluation of dihydrofolate reductase amplification as a pan-tissue RT PCR control. *PCR Methods and Applications*, 3(1):71-72.
- ter Schegget, J. y J. van der Noordaa. 1994. Protein phosphatase 2A and the regulation of human papillomavirus gene activity. En: zur Hausen, H., dir. 1994. Human pathogenic papillomaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp 123-129.
- Tsuda, H. y S. Hirohashi. 1992. Frequent occurrence of *p53* gene mutations in uterine cancers at advanced clinical stage and with aggressive histological phenotypes. *Japanese Journal of Cancer Research*, 83:1184-1191.
- Ullrich, S.J., C.W. Anderson, W.E. Mercer y E. Appella. 1992. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(22):15,259-15,262.
- Waga, S., G.J. Hannon, D. Beach y B. Stillman. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369(6481):574-578.
- Wang, R.F., W-W. Cao y M.G. Johnson. 1992. A simplified, single tube, single buffer system for RNA-PCR. *BioTechniques*, 12(5):702, 704.
- Werness, B.A., A.J. Levine y P.M. Howley. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248(4,951):76-79.
- White, A.E., E.M. Livanos y T.D. Tlsty. 1994. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes and Development*, 8:666-677.

- Wittwer, C.T. y D.J. Garling. 1991. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *BioTechniques*, 10(1):76-78, 80-83.
- Woodworth, C.D., J. Doniger y J.A. DiPaolo. 1989. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *Journal of Virology*, 63(1):159-164..
- Yaginuma, Y. y H. Westphal. 1991. Analysis of the *p53* gene in human uterine carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 51:6505-6509.
- Yang, D. y A.S. Waldman. 1994. Production of autoradiographs from unfixed ³⁵S-labeled DNA sequencing gels. *BioTechniques*, 16(2):224, 226.
- Yin, Y., M.A. Tainsky, F.Z. Bischoff, L.C. Strong y G.A. Wahl. 1992. Wild-type *p53* restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant *p53* alleles. *Cell*, 70(6):937-948.
- Zakat-Houri, R., B. Bienz-Tadmor, D. Glivol y M. Oren. 1985. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *The EMBO Journal*, 4(5):1,252-1,255.
- zur Hausen, H. 1994. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. En: zur Hausen, H., dir. 1994. Human pathogenic papillomaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. Pp 131-156.
- zur Hausen, H. y E.M. de Villiers. 1994. Human papillomaviruses. *Annual Review of Microbiology*, 48:427-447.