

157



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la cooperación entre Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 en regeneración de la epidermis

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A:
KATARZYNA OKTABA SOSIN



DIRECTOR DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION COLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Evaluación de la cooperación entre Sonic hedgehog y los oncogenes
E6/E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 en regeneración de
la epidermis."

realizado por Katarzyna Oktaba Sosin

con número de cuenta 09777026-2, quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Propietario

Dr. Jean Louis Charli Casalonga

Propietario

Dra. Diana María Escalante Alcalde

Suplente

Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl

Suplente

Biól. David Garcíaadiego Cázares

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Dla Róźziców, dla Ewy i dla Dziadków

A Eugenio

A Fiorella

Agradecimientos

A Luis Covarrubias por la dedicación y la enseñanza.

A Diana Escalante, David Garcíadiego, Jean Louis Charli y Lourdes Gutiérrez por la revisión y los comentarios.

A Patricia Joseph por acercar a la Facultad de Ciencias con el Instituto de Biotecnología.

A todos mis compañeros del laboratorio, especialmente a David Hernández y a Conchita Valencia por contestar siempre de buena gana a mis preguntas.

A Elizabeth Mata y el personal de la Unidad de Bioterio por el cuidado y el suministro de los animales.

A Carmen Muñoz y Graciela Blancas por el mantenimiento del laboratorio y la posibilidad de contar con material limpio.

A mis amigos Nalliely y Felipe, a Irene, Bernardo y Ximena, a Rocio, Argel y Arlene, a Paula y Diego, a Lakshmi, Mariana y Alonso, a Andrés y Marcos por hacerme feliz los últimos años.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo del Departamento de Genética y Fisiología Molecular, del Instituto de Biotecnología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles y con el apoyo de los programas de becas PAEA y PROBETEL.

Abreviaturas

ADN	ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BCC	carcinoma basocelular
CaCu	cáncer cérvico-uterino
Cdk	quinasas dependientes de ciclina
CpG	dinucleótido citosina-guanina
CT	célula troncal
E6AP	proteína asociada a E6
EGFR	receptor al factor de crecimiento epidérmico
GJIC	uniones gap
IL-1 α	interleucina-1 alfa
K	queratina
LCR	región larga de control
MAPK	cinasa activada por mitógenos
NBCCS	síndrome de carcinoma nevo basocelular
NIC	neoplasia intraepitelial cérvica
PCR	reacción de polimerización en cadena
PI3K	cinasa de fosfatidilinositol 3
PNET	tumores primitivos neuroectodérmicos
Ptc	Patched
Rb	gene supresor de retinoblastoma
RT-PCR	transcripción reversa y reacción de polimerización en cadena
SCC	carcinoma espinocelular
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
TGF β	factor de crecimiento transformante beta
VPH	Virus del Papiloma Humano
wt	cepa silvestre (<i>wild type</i>)

Índice

Introducción	1
1. Cáncer	1
1.1. Eventos genéticos y epigenéticos	3
1.2. Eventos celulares	6
2. Carcinoma	7
3. Regeneración	9
Antecedentes	12
1. Cáncer cérvico-uterino	12
1.1. Virus del Papiloma Humano	13
1.2. Histopatología	13
1.3. Oncogenes del Virus del Papiloma Humano	14
1.3.1. Oncogenes E6 y E7	16
1.3.2. Oncogene E5	21
2. Cooperación	22
2.1. Oncogenes virales	22
2.2. Oncogenes virales y celulares	23
2.2.1. Sonic hedgehog	24
3. El ratón como modelo de estudio del cáncer	27
Justificación	31
Hipótesis	33
Objetivos	34
Materiales y métodos	35
1. Animales	35
2. Plásmidos	35
3. Adenovirus	35
4. Electroporación de plásmidos pQBI25, pCH110 y p β Actina β -gal	36
5. Purificación de los plásmidos pQBI25, pCH110 y p β Actina β -gal a gran escala	37
6. Repurificación de los plásmidos pQBI25, pCH110 y p β Actina β -gal	39

7. Extracción de ADN genómico de la cola del ratón	40
8. Reacción de polimerización en cadena (PCR) específico para los oncogenes E6/E7	41
9. Transcripción reversa y reacción de polimerización en cadena (RT-PCR) específico para HPRT, Shh, Ptc1 y Gli1	42
10. Anestesia con éter	45
11. Anestesia con avertina 2.5 %	45
12. Inclusión en parafina	45
13. Desparafinación	47
14. Cortes en el criostato Leica CM1100	47
15. Cortes en el microtomo de rotación Leica RM2125RT	48
16. Tinción para detectar actividad de β -galactosidasa (LacZ)	48
17. Tinción con hematoxilina de Harris	49
18. Tinción con safranina	49
19. Fotos con cámara Photometrics CoolSNAP	50
20. Fotos con cámara Nikon Coolpix900	51
21. Soluciones	51
Resultados	56
1. Sistemas de regeneración de la epidermis	56
2. Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis	57
3. Cooperación de Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis	61
3.1. Métodos <i>in vivo</i> para modificar genéticamente la piel	62
3.1.1. Electroporación	62
3.1.2. Transfección con adenovirus	66
3.2. Evaluación de la cooperación	70
4. Cooperación de Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 en regeneración del cartílago	74
Discusión	76
1. Sistemas de regeneración de la epidermis	76
2. Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis	77

3. Cooperación de Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis	79
3.1. Métodos <i>in vivo</i> para modificar genéticamente la piel	79
3.1.1. Electroporación	80
3.1.2. Transfección con adenovirus	81
3.2. Evaluación de la cooperación	83
4. Cooperación de Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 en regeneración del cartilago	85
Conclusiones	87
Perspectivas	88
Bibliografía	90

Figuras

Figura 1.	Capacidades adquiridas por las células cancerosas.	2
Figura 2.	Cooperación.	3
Figura 3.	Eventos genéticos.	4
Figura 4.	Eventos epigenéticos.	6
Figura 5.	Eventos celulares.	7
Figura 6.	Estructura de la piel, la epidermis y localización de células troncales.	9
Figura 7.	Regeneración.	11
Figura 8.	Casos de cáncer cérvico-uterino en el mundo.	12
Figura 9.	Virus del Papiloma Humano.	15
Figura 10.	Oncogenes E6/E7.	16
Figura 11.	Vía de señalización de Sonic hedgehog.	26
Figura 12.	Construcción del ratón TgbK6-E6/E7.	29
Figura 13.	Plásmidos.	36
Figura 14.	Sistemas de regeneración de la epidermis de ratón.	56
Figura 15.	PCR específico para los oncogenes E6/E7.	57
Figura 16.	Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de piel dorsal.	58
Figura 17.	Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de piel dorsal.	59
Figura 18.	Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de oreja.	60
Figura 19.	Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de oreja.	61
Figura 20.	Electroporación <i>in vivo</i> de la piel dorsal.	64
Figura 21.	Transfección <i>in vivo</i> con adenovirus de la piel dorsal y la oreja.	67
Figura 22.	Evaluación de la cooperación de Shh y los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de piel dorsal	71

Figura 23.	Evaluación de la respuesta celular a Shh por medio de RT-PCR en piel dorsal.	72
Figura 24.	Evaluación de la cooperación de Shh y los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de oreja.	73
Figura 25.	Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración del cartílago.	75

Introducción

1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética que se produce como resultado de diversos cambios en el genoma. Estas alteraciones tienen un efecto en la maquinaria molecular que controla la proliferación, la diferenciación y la muerte de las células. En la mayoría de los casos, el cáncer se origina a partir de una sola célula somática que empieza a dividirse. La clona de células comienza a acumular una serie de cambios genéticos o epigenéticos que modifican la actividad de los genes, lo cual origina fenotipos alterados que son sujetos a selección (Ponder, 2001). Así, tanto la génesis como el desarrollo de los tumores están regulados por procesos análogos a los evolutivos, donde la selección natural actúa sobre una diversidad de clones somáticas, promoviendo el crecimiento excesivo de aquellas que posean alguna ventaja en su forma de propagación (Evan y Vousden, 2001), dando pie a la transformación progresiva de células normales hacia células cancerígenas. Todo el proceso se desarrolla a través de varias etapas, comenzando con la iniciación y la promoción, para continuar con la progresión donde los tumores ya formados se transforman, invaden otros tejidos y culminan en metástasis.

La carcinogénesis es un proceso complejo y heterogéneo. Lo anterior se ve reflejado en la gran variedad de manifestaciones que tiene el cáncer, surgiendo por diferentes causas, en diversos tejidos, a distintos tiempos y en poblaciones heterogéneas, siguiendo además patrones de progresión frecuentemente impredecibles, lo que en conjunto ha complicado a su vez el desarrollo de terapias adecuadas para su tratamiento. Sin embargo, Hanahan y Weinberg (2000) sugieren que, aunque existen más de 100 tipos diferentes de cáncer además de diversos subtipos que pueden ser encontrados en algunos órganos, existen 6 alteraciones esenciales en la fisiología celular que de manera colectiva dictan el progreso maligno de las células y que son comunes a la mayoría, si no es que a todos los tumores humanos. Estas capacidades, que van siendo adquiridas a lo largo del desarrollo del tumor, son las siguientes: 1) la autosuficiencia de señales de crecimiento, 2) la insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento, 3) la evasión de la muerte celular programada (apoptosis), 4) un potencial replicativo sin límites, 5) el continuo crecimiento

de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y, por último, 6) la invasión de tejidos y la colonización de nuevos nichos (metástasis) (Figura 1).

Hanahan y Weinberg, 2000.

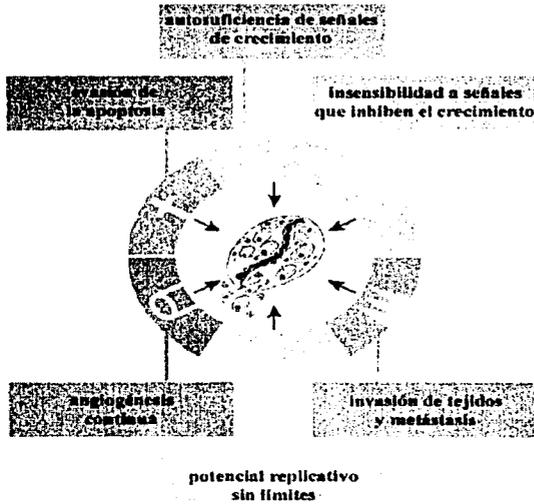


Figura 1. Capacidades adquiridas por las células cancerosas. Las 6 capacidades que van siendo adquiridas a lo largo del desarrollo del tumor y que son comunes a la mayoría, si no es que a todos los tumores humanos.

Es importante destacar, que debido a que se necesita de la mencionada acumulación de varias alteraciones para el desarrollo del cáncer, se sabe que existe una cooperación entre los diferentes eventos etiológicos a lo largo de este proceso (Figura 2). En este contexto, la cooperación consiste en que dos o más elementos actúan sinérgicamente para que una célula normal se establezca como cancerígena, mientras que cada uno por separado carece de esta capacidad. Esta cooperación, en algunos casos, es esencial ya que las células pueden controlar la proliferación, la diferenciación y la muerte por distintas vías que, por tanto, sólo pueden ser anuladas gracias a varios sucesos en conjunto.

Además, la evolución del cáncer puede estar influenciada por diversos factores que afectan la probabilidad de que ocurran los eventos carcinogénicos. Dentro de estos factores se encuentran los carcinógenos, las radiaciones, la alimentación y el sobrepeso, la

Evan y Vousden, 2001.

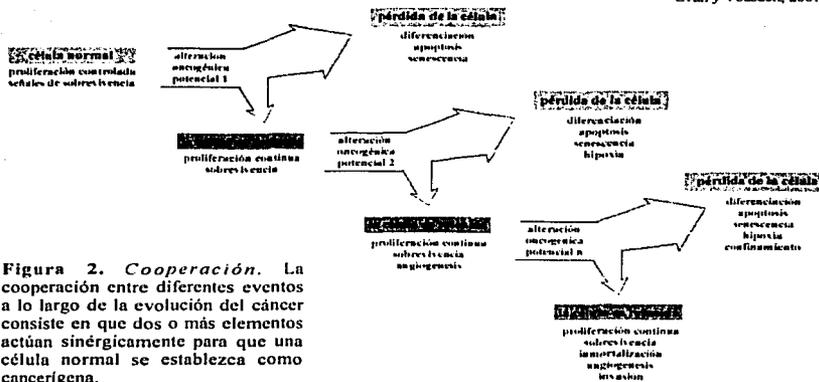


Figura 2. Cooperación. La cooperación entre diferentes eventos a lo largo de la evolución del cáncer consiste en que dos o más elementos actúan sinérgicamente para que una célula normal se establezca como cancerígena.

reproducción y las hormonas, los virus oncogénicos, las bacterias y los parásitos, las heridas y la inflamación crónica, la edad, la predisposición hereditaria, etc., que eventualmente son contrarrestados por los genes del individuo que pueden eliminar, reducir o potenciar el impacto de cada contribuidor (Klausner, 2002; Ponder, 2001; Peto, 2001).

1.1. Eventos genéticos y epigenéticos

Los eventos genéticos son los que se relacionan con mayor frecuencia con las capacidades que van adquiriendo las células durante la carcinogénesis. En estos casos se han reconocido dos clases de genes que son sujetos a alteraciones como mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, translocaciones cromosómicas o amplificaciones génicas que contribuyen al desarrollo de tumores. Por un lado están los oncogenes que son proto-oncogenes que presentan una mutación que deriva en la ganancia de una función y, por el otro, están los genes supresores de tumores que al ser mutados pierden su función original. La activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores puede ocurrir tanto en las primeras etapas de la formación de tumores, es decir en la iniciación, así

como en etapas posteriores como la transformación y la progresión (Groopman y Skipper, 1991) (Figura 3).

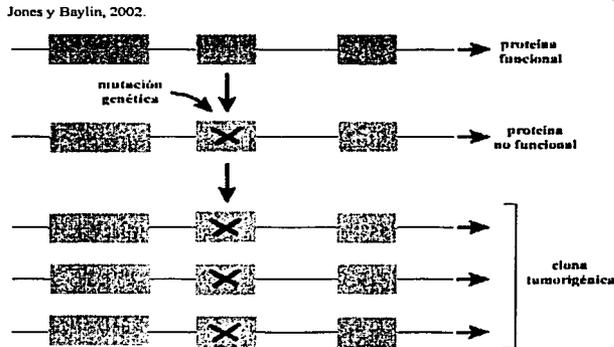


Figura 3. Eventos genéticos. Las mutaciones somáticas que ocurren en proto-oncogenes o genes supresores de tumores contribuyen al desarrollo del cáncer.

Los oncogenes, que originalmente fueron descubiertos en retrovirus capaces de inducir tumores, codifican para proteínas que están involucradas principalmente en el control de la proliferación celular. Entre estas oncoproteínas se encuentran factores de crecimiento, factores de transcripción, antiapoptóticos, tirosina cinasas, proteínas G asociadas a membrana, serina cinasas citoplásmicas, serina treonina cinasas, reguladores citoplásmicos, reguladores del ciclo celular, nucleoporinas, proteínas de unión a ácido ribonucleico (ARN), etc. (Hesketh, 1997). Las alteraciones más frecuentes que activan a los proto-oncogenes son las mutaciones puntuales (Weber, 2002) que son dominantes, por lo que basta que un alelo adquiera una modificación para que se altere su función o su nivel de expresión.

Los genes supresores de tumores se describieron inicialmente en experimentos de híbridos de células somáticas, donde la fusión de células no cancerosas con cancerosas no propiciaba el desarrollo de tumores a menos que se suscitaran pérdidas cromosómicas, y prácticamente a la par en estudios de las bases moleculares del retinoblastoma (Marshall, 1991). La mayoría de los genes supresores de tumores funcionan como reguladores del ciclo celular, son factores de transcripción, pro o antiapoptóticos, reparadores de ácido desoxirribonucleico (ADN), procuradores de la integridad del genoma, inhibidores de

cinastas dependientes de ciclinas, etc. (Hesketh, 1997). A diferencia de los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores son desactivados al adquirir mutaciones en ambas copias del gene, a menos que una sola mutación derive en la versión dominante negativa del supresor (Lewin, 2000). Una de estas mutaciones puede heredarse a través de la línea germinal o ambas pueden surgir en células somáticas como sucede en los casos no hereditarios. Entre las mutaciones más comunes se encuentran las deleciones que derivan en la pérdida de heterocigosidad de sitios polimórficos, los cuales han sido muy útiles para encontrar nuevos miembros de esta clase de genes (Alberts *et al.*, 2002).

En los últimos años, además de los eventos genéticos, se ha empezado a dar una mayor importancia a los eventos epigenéticos que apagan la expresión de ciertos genes durante el desarrollo de cáncer desde sus primeras fases hasta la metástasis. Estas alteraciones se dan tanto en oncogenes como en genes supresores de tumores y son resultado principalmente de la metilación del ADN, así como de modificaciones en la estructura de la cromatina. La inactivación de genes por hipermetilación, que se descubrió en 1989 en un gene supresor de tumores, tiene repercusiones en la reparación de ADN, la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la adhesión celular, la desintoxicación, etc. (Esteller, 2002). Este tipo de metilación aberrante en las células somáticas se presenta en las regiones ricas en dinucleótidos citosina-guanina ("islas" de CpG) localizadas primordialmente cerca de los promotores (Ponder, 2001) (Figura 4). A diferencia de las mutaciones, la hipermetilación es un evento progresivo y heterogéneo, ya que la presencia de islas CpG puede variar entre las copias de un mismo gene dentro de una población de células cancerígenas (Jones y Baylin, 2002). Además, la metilación está muy estrechamente ligada a las modificaciones en la estructura de la cromatina que propician una represión en la transcripción de los genes, como por ejemplo la hipoacetilación de histonas o la formación de cromatina resistente a nucleasas por la presencia de proteínas de unión a metilo (Esteller, 2002).

Jones y Baylin, 2002.

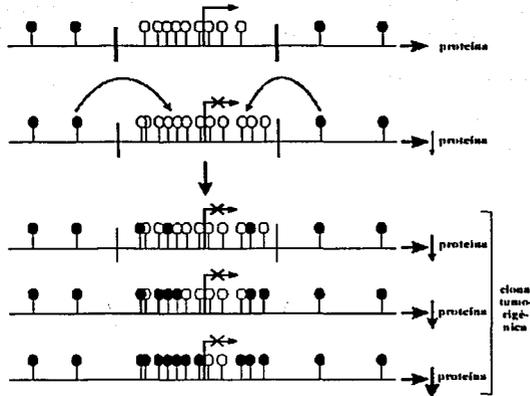
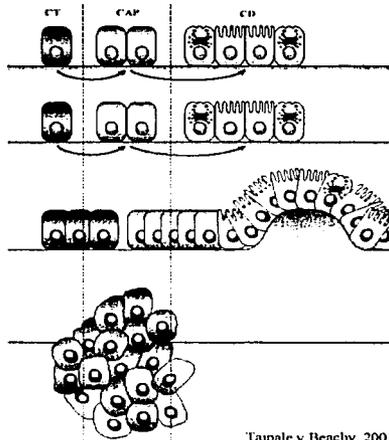


Figura 4. Eventos epigenéticos. La metilación del ADN en las células somáticas, que se presenta en las "islas" de CpG localizadas cerca de los promotores, apaga la expresión de genes durante el desarrollo del cáncer.

1.2. Eventos celulares

La idea de que el cáncer es una enfermedad de las células troncales (CT) no es totalmente nueva, sin embargo últimamente ha vuelto a cobrar fuerza debido a una serie de evidencias que han surgido como consecuencia del reciente auge de la biología de este tipo de células. Las CT se caracterizan por tener la habilidad, según las señales que reciben, de perpetuarse al dividirse y crear nuevas CT, o de generar células maduras pertenecientes a un tejido específico a través de la diferenciación (Fuchs y Segre, 2000). Las CT son muy importantes en la diversificación de tipos celulares durante el desarrollo embrionario y en la renovación de tejidos en los adultos. Según Reya *et al.* (2001) la relación entre las CT y el cáncer se basa en que, en primera, hay una similitud entre los mecanismos que regulan la auto-renovación de ambos tipos de células. Así, las células cancerígenas adoptan las maquinarias de proliferación que se expresan normalmente en las CT y, por otro lado, las vías que se asocian de manera típica al cáncer pueden regular el desarrollo normal de las CT. En segunda, existe la probabilidad de que las células cancerígenas se originen a partir de CT normales, ya que como estas células ya tienen activadas las vías de auto-renovación

entonces es más fácil mantenerlas, que activarlas *de novo* en células más diferenciadas. Además, debido a que las CT son más longevas en comparación a las diferenciadas hay mayores oportunidades de que acumulen alteraciones cancerígenas. En tercera, los tumores pueden contener “células troncales cancerosas”, es decir, pequeñas poblaciones de células con un amplio potencial proliferativo que son las que derivan en la formación y el desarrollo de cáncer, y que atraviesan por procesos análogos de auto-renovación y diferenciación a los de las CT normales (Figura 5).



Taipale y Beachy, 2001.

Figura 5. Eventos celulares. El desarrollo de tumores puede estar relacionado con las células troncales (CT), que pueden adquirir alteraciones y dar origen a células de amplificación pasajera (CAP) que se diferencian (CD) y forman una neoplasia, que acumula más alteraciones y culmina en invasión y metástasis.

2. Carcinoma

Los carcinomas son los tumores malignos que se originan en las células epiteliales. En los mamíferos, alrededor de dos terceras partes de los tejidos diferenciados son epitelios y su función está relacionada frecuentemente con la secreción y la absorción de sustancias, así como con la integridad mecánica de las superficies (Slack, 2000). Una característica particular de estos tejidos es que están sujetos a una constante y rápida regeneración y/o reparación, como parte de un proceso normal o a consecuencia de lesiones, la cual está

regulada de manera precisa para evitar proliferaciones anómalas que puedan derivar en carcinomas. Aún así, estadísticamente, las células epiteliales dan origen a 90% de los tumores en humanos adultos (Taipale y Beachy, 2001).

Algunos de estos tejidos epiteliales, como la epidermis de la piel o el epitelio que recubre los ductos del aparato reproductivo como el cérvix o cuello uterino, forman estructuras estratificadas. En este tipo de epitelios, la proliferación ocurre normalmente en la capa basal, que es un estrato de grosor unicelular encontrado en la parte más interna del tejido. En esta capa por tanto, además del área de la protuberancia (*bulge*) del fólículo piloso cuya capa externa forma un continuo con la epidermis, se encuentran las CT que dan origen a las nuevas células diferenciadas (Fuchs y Segre, 2000) (Figura 6). Alberts *et al.* (2002) describen que la capa basal descansa sobre un tejido conjuntivo formado por la dermis rica en colágena y la hipodermis constituida por adipocitos. La división constante de las células basales hace que aumente su población y se propicie el desplazamiento de algunas hacia las capas suprabasales con lo que comienza su diferenciación. Así, las células llegan primero al estrato espinoso, caracterizado por una amplia presencia de desmosomas, y después se desplazan hacia la capa granular donde comienzan a perder el núcleo y los organelos citoplásmicos, y se transforman en queratinocitos, que finalmente se funden formando escamas que acaban por desprenderse de la superficie. El denominado estrato córneo es la capa más externa formada por estas células queratinizadas muertas, las cuales están embebidas en una matriz extracelular de ceramidas, colesterol y ácidos grasos, que la hacen ser una barrera poco permeable (Prausnitz *et al.*, 1993) (Figura 6).

Cuando la proliferación de las células de la capa basal se vuelve anormal, éstas pueden progresar y transformarse en carcinomas invasivos. Por ejemplo, según Cairns (1981) los carcinomas de piel más comunes son de dos tipos. Uno es el carcinoma basocelular (BCC), donde las células derivadas de la capa basal invaden la dermis y los tejidos subyacentes formando una úlcera erosiva e irregular, pero sin que haya metástasis. El otro es el carcinoma espinocelular (SCC), donde las células también invaden la dermis pero no pierden su capacidad de diferenciación normal hacia escamas, y aunque es un tipo en general menos invasivo que el anterior, ocasionalmente sí puede llegar a colonizar nuevos nichos distantes. Éste último es un tipo de cáncer que también se presenta frecuentemente en el tracto anogenital.

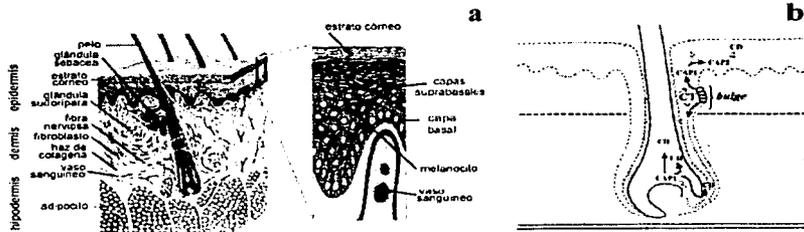
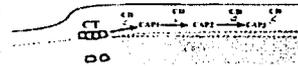


Figura 6. Estructura de la piel, la epidermis y localización de células troncales. La piel está formada por la hipodermis, la dermis y la epidermis. La epidermis está compuesta por la capa basal que está en constante división, las capas suprabasales donde ocurre la diferenciación de los queratinocitos y el estrato córneo que es la capa más externa y poco permeable del tejido epitelial (a). Las células troncales se encuentran en la protuberancia (*bulge*) del folículo piloso y en la capa basal de la epidermis (b). CT, células troncales; CAP, células de amplificación pasajera; CD, células diferenciadas.



Taylor et al., 2000.

3. Regeneración

Los carcinomas pueden resultar de una mala regulación durante la regeneración de tejidos epiteliales. Sin embargo la regeneración, que puede ocurrir en la reparación o el mantenimiento de los individuos adultos, es un proceso fundamental para la supervivencia de los organismos y está basado en su capacidad de regular la pluripotencialidad de las células. Evolutivamente hablando, la regeneración es un proceso primitivo que se restringe proporcionalmente al grado de complejidad de los animales, por lo que probablemente fue seleccionado en contra a lo largo de la evolución debido al alto costo de mantener o producir células troncales, que resulta incompatible con la longevidad de ciertas especies, derivando, por ejemplo, en los mencionados tumores (Sánchez-Alvarado, 2000).

En los mamíferos, la regeneración de tejidos es un proceso limitado, pero no se considera en absoluto como una capacidad perdida. En realidad cuando estos organismos tienen algún tipo de lesión la respuesta biológica plausible, a excepción de algunos casos, es la cicatrización, más que la regeneración que es un proceso que implica el reemplazo y la

restauración total de masas completas de tejido, incluyendo órganos. Brevemente, de acuerdo con Goldsmith (1991), la cicatrización de tejido epitelial consiste en tres eventos que se sobrelapan: la inflamación, la formación de tejido nuevo y la remodelación de la matriz extracelular. Después de que se produce una herida, la inflamación inicia con la agregación de plaquetas y la coagulación sanguínea. El coágulo se convierte en sustrato para la migración de células hacia el lugar de la lesión, a donde también llegan los leucocitos para evitar una posible contaminación, los cuales acaban por ser fagocitados por macrófagos o fibroblastos. Tanto los macrófagos como las plaquetas son esenciales para el siguiente evento, que es el inicio de la formación de tejido nuevo que se manifiesta por la repitelización, que comienza 24 horas después de que ocurrió la lesión, y el origen de tejido granular (Figura 7a). La repitelización se caracteriza por la repavimentación del área por medio de la migración de células epiteliales de la orilla de la herida, las cuales presentan un fenotipo particular y son llamadas "lengua epidérmica", y que después de 1 ó 2 días empiezan además a proliferar generando una población nueva de células migrantes (Figura 7b). La formación de tejido granular, que comprende la acumulación de macrófagos, la migración y proliferación de fibroblastos, la deposición de tejido conectivo laxo y la angiogénesis comienza a los 5 días (Figura 7b). El establecimiento de estos nuevos vasos capilares provee al tejido del oxígeno y los nutrientes necesarios para que continúe su crecimiento. Finalmente, la fibronectina y el ácido hialurónico son los principales participantes en las primeras fases de la formación y la remodelación de la matriz extracelular, que inicia desde la génesis del tejido granular. Conforme va madurando la estructura, ambos factores desaparecen, dando pie a la acumulación de colágena y de proteoglicanos, que aumentan respectivamente la rigidez y la resistencia a la deformación de la herida. No obstante, según Clark *et al.* (1998) es raro que se restablezcan los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas, además de que no se recupera totalmente ni la arquitectura ni la función normal del tejido epitelial, por lo que no es un caso de regeneración propiamente dicho. Aunque por otro lado, Muller *et al.* (1999) consideran que, debido a que la cicatrización es el evento inicial y crítico de cualquier respuesta regenerativa, si ésta ocurre de manera perfecta, es decir sin que quede huella de la cicatriz, entonces se puede considerar que hubo regeneración del tejido.

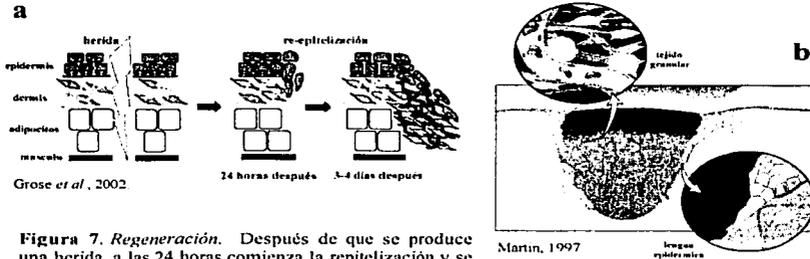


Figura 7. Regeneración. Después de que se produce una herida, a las 24 horas comienza la repitelización y se origina el tejido granular (a). La repitelización se caracteriza por la migración de células epiteliales llamadas "lengua epidérmica" (b). El tejido granular está formado por macrófagos, fibroblastos, tejido conectivo laxo y vasos sanguíneos (b).

De acuerdo con Sánchez-Alvarado (2000) la regeneración en general que ocurre en los metazoarios se clasifica en dos, la llamada morfálaxis que ocurre en ausencia de proliferación celular y la epimorfosis que requiere de proliferación, y que se subdivide en dos categorías: la regeneración no blastemal y la blastemal. La regeneración no blastemal involucra la transdiferenciación del tejido presente en aquel que está ausente después de una lesión, con una limitada desdiferenciación y proliferación de las células sobrevivientes, pero con proliferación y diferenciación de las células troncales presentes en el tejido dañado. La regeneración blastemal implica la formación de una estructura de células epiteliales y mesenquimales que eventualmente se diferencian para formar el nuevo tejido.

Antecedentes

1. Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino (CaCu), que pertenece al grupo de los carcinomas del tracto anogenital, es el séptimo cáncer más frecuente en todo el mundo, según un estudio realizado por Parkin *et al.* (1999) durante 1990. Entre las mujeres es el tercero de mayor incidencia, comprendiendo el 9.8% de todos los casos. Sin embargo en los países en vías de desarrollo se presenta como el segundo más frecuente (Figura 8), siendo un grave problema de salud pública en América Latina donde se reportan las tasas más altas de ocurrencia. Particularmente en México, Lazcano-Ponce *et al.* (2001) indican que el CaCu es el más común de todos los tumores que desarrollan las mujeres, presentándose 44.4 casos por cada 100,000 individuos del sexo femenino.

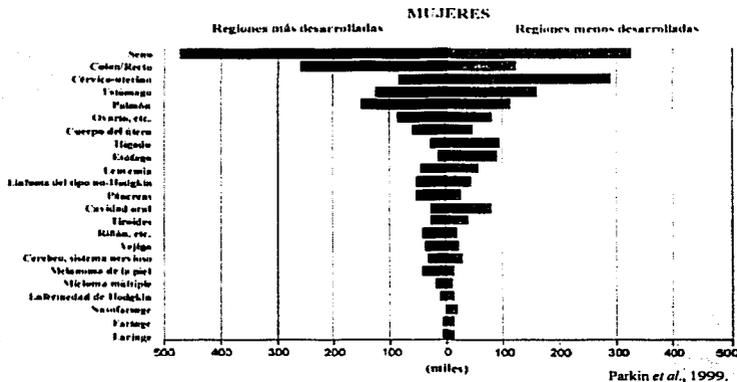


Figura 8. Casos de cáncer cérvico-uterino en el mundo. El CaCu es el segundo tipo de cáncer más frecuente en los países menos desarrollados, y el tercero si se considera a las regiones más desarrolladas.

1.1. Virus del Papiloma Humano

La evidencia epidemiológica indica que el CaCu está fuertemente ligado al Virus del Papiloma Humano (VPH), asociándolo como el factor principal que afecta la probabilidad de iniciación y desarrollo de este tipo de cáncer. El VPH es un virus de genoma circular de doble hélice de ADN, constituido por un total de entre 6800 y 8000 pares de bases (ver más adelante), que infecta específicamente tejido epitelial, incluyendo el del tracto anogenital. Hasta la fecha se han descrito más de 80 diferentes tipos de VPH, los cuales pueden clasificarse básicamente en dos grupos. Por un lado los VPH de “bajo riesgo” que dan origen a tumores benignos, y por el otro los de “alto riesgo” que están asociados al 90% de los carcinomas cervicales, dentro de los cuales según Bosch *et al.* (1995) el 50% se relaciona con la presencia del VPH tipo 16.

En general, el VPH es un virus de transmisión sexual que, al llegar al tracto anogenital inocular las células basales del epitelio, se establece como episoma dentro del núcleo (pero fuera de los cromosomas), y permanece, prácticamente, en estado latente replicándose en sincronía con la célula. El virus se activa una vez que las células migraron hacia las capas suprabasales, ahí se replica y forma las proteínas de la cápside. Las partículas virales acaban su ensamblaje en las capas más externas del tejido y son liberadas hacia la superficie, pudiendo infectar otras células. Eventualmente el genoma del VPH termina por integrarse en los cromosomas de las células hospederas, lo cual está altamente asociado a la transformación maligna de los tumores (zur Hausen, 2002).

1.2. Histopatología

El estado de latencia del VPH dentro del hospedero puede prolongarse durante largos periodos. Sin embargo, una vez activo es capaz de desencadenar todo un proceso de desarrollo de cáncer derivado del epitelio del cérvix.

Este proceso de formación de carcinoma cervical, visto desde una perspectiva histológica, comienza con lesiones llamadas neoplasia intraepitelial cérvica (NIC) que se clasifican según su grado de progresión en NIC I, NIC II y NIC III (Giuliano, 1998).

Alberts *et al.* (2002) resumen que en las lesiones más suaves o NIC I las células de la capa basal ocupan un tercio de todo el epitelio, pero aún se puede apreciar una diferenciación de las células localizadas en las partes más externas del tejido. Las NIC I presentan una alta tasa de retroceso espontáneo, sin embargo algunas progresan hacia lesiones más severas. En estas NIC II y III todas las capas del epitelio están compuestas por células no diferenciadas de tamaño y forma variable, que están proliferando y que además presentan núcleos de forma y tamaño también variables. Sin embargo, aún en NIC III las células siguen confinadas a la parte superior de la capa basal. No obstante, finalmente pueden transformarse en un carcinoma invasivo, que atraviesa o rompe esta barrera, invade el tejido conectivo subyacente y resulta en metástasis.

1.3. Oncogenes del Virus del Papiloma Humano

La expresión génica del VPH permanece prácticamente apagada durante toda la inoculación del virus en las células basales del epitelio cérvico-uterino. Sólo los genes denominados "tempranos" empiezan a transcribirse en esta fase, pero lo hacen de manera limitada. En sí la transcripción activa de genes, tanto "tempranos" como "tardíos", ocurre durante la replicación del virus ya en las capas suprabasales del tejido. De manera general, los genes "tempranos" codifican para proteínas que interactúan con el genoma del hospedero para producir nuevas partículas virales y los "tardíos" para las proteínas que componen la cápside (Cheah y Looi, 1998). Posteriormente, cuando el ADN viral se integra en el genoma del hospedero, los únicos genes que continúan expresándose son aquellos que se incorporaron sin alteración. Estos genes se transcriben junto con los que se encuentran cercanos al lugar de inserción, bajo la regulación de los promotores de la célula hospedera (zur Hausen, 2002).

En conjunto, entre genes "tempranos" y "tardíos", los marcos de lectura abierta del VPH son ocho: E1, E2, E4, E5, E6, E7 ("E" de *early*, temprano en inglés), L2 y L1 ("L" de *late*, tardío en inglés). No obstante, durante la inserción del virus en los cromosomas del hospedero, que frecuentemente sucede en las regiones 8q24 y 12q13 (Lazo *et al.*, 1992), algunos de estos genes son deletados (por ello el virus puede estar constituido por entre

6800 y 8000 pares de bases). Aunque cabe señalar que no se ha encontrado un patrón preciso, es común que E2, que suele ser el punto de apertura del genoma circular del virus, al igual que los genes adyacentes E1, E4, E5 y L2 sean deletados durante la integración del ADN. En cambio E6 y E7, junto con la región larga de control (LCR), son los que habitualmente se integran sin alteración y continúan transcribiéndose (Choo *et al.*, 1987; Choo *et al.*, 1988; Shirasawa *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1994) (Figura 9).

zur Hausen, 2002.

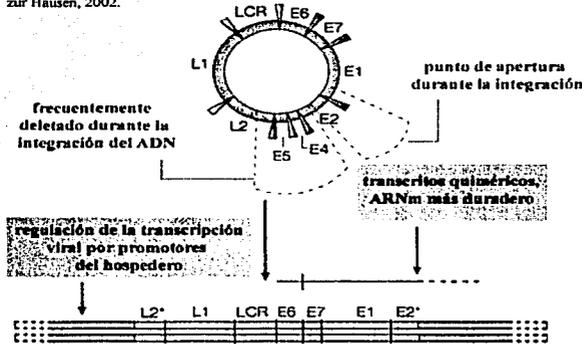


Figura 9. Virus del Papiloma Humano. El VPH presenta ocho marcos de lectura abierta (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2) y un LCR. Cuando se inserta en el genoma del hospedero, generalmente el punto de apertura es cercano a E2 y los genes adyacentes son deletados. E6 y E7, junto con el LCR, se integran frecuentemente sin alteración y continúan su transcripción, que ahora es regulada por los promotores del hospedero.

Como consecuencia, y debido a su capacidad de alterar los ciclos de proliferación, diferenciación y muerte de las células, se ha propuesto que E6 y E7 son oncogenes y que juegan un papel más significativo en las etapas finales de transformación maligna de los tumores cérvico-uterinos iniciados por el VPH. A diferencia de E5, que también es un oncogene que estimula la proliferación, pero que parece ser más importante en las primeras etapas de infección viral, ya que posteriormente es deletado. Sin embargo, según zur Hausen (2002), actualmente es difícil concluir sobre el papel que juegan otras proteínas "tempranas" como E1, E2 y E4 en este proceso. Aunque se ha visto que E2 puede funcionar como represor de la transcripción de E6 y E7 y, por tanto, como inhibidor de la proliferación (Goodwin y DiMaio, 2000). Lo que sí se ha demostrado es que las proteínas estructurales L1 y L2 no se expresan ni en las células pre-cancerosas, ni en las malignas.

exonucleasa pudiendo intervenir en la reparación de ADN durante la replicación (Hesketh, 1997). La asociación específica entre E6 y p53 es posible gracias a que E6 forma un complejo con una proteína celular llamada proteína asociada a E6 (E6AP), que interacciona con p53 haciendo que se degrade rápidamente por la vía proteolítica dependiente de ubiquitina (Scheffner *et al.*, 1993). E6AP es una ligasa que se une a la ubiquitina y la transfiere a los residuos de lisina de p53, haciendo que sea reconocida y degradada por el proteosoma (Oda *et al.*, 1999). Esta degradación influye, por ejemplo, en la activación de la transcripción de p21, que es uno de los genes regulados positivamente por p53 implicado en la detención del ciclo celular. p21 se une a, e inhibe la actividad de, los complejos formados por las cinasas dependientes de ciclina (Cdk) y sus subunidades reguladoras que son las ciclinas, de las cuales un subconjunto está involucrado en la entrada a la fase S del ciclo celular (Xiong *et al.*, 1993). Así mismo, la disminución de los niveles de p53 bloquea la expresión de Bax. p53 regula la inducción y la función de Bax (Miyashita y Reed, 1995), que es un gene promotor de la apoptosis, que presenta homología con la proteína Bcl-2. Por tanto, la supresión de Bax mediada por E6 tiene un efecto negativo en el proceso apoptótico (Ma *et al.* 2002).

De igual forma, E6 inhibe la apoptosis al inducir la reducción de los niveles de Bak, que es un gene activado transcripcionalmente por p53. Bak es un promotor de la apoptosis, miembro de la familia de las proteínas Bcl-2, que regula la activación de procaspasas por medio de la estimulación de la liberación de citocromo c de la mitocondria. Las procaspasas son una familia de proteasas clave en la regulación de los procesos apoptóticos. E6 promueve la degradación de Bak por la vía proteolítica dependiente de ubiquitina, lo cual deriva en la inhibición de la inducción de la muerte celular programada en células precancerosas, que puede resultar en la acumulación de cambios mutacionales que incrementan la inestabilidad cromosómica de las células (Jackson *et al.*, 2000).

Además, E6 induce aneuploidía, es decir la presencia de un número anormal de cromosomas, que contribuye a la tumorigénesis. La aneuploidía está asociada a la inactivación de la función de p53 que está involucrado en la regulación de la duplicación de los centrosomas. El centrosoma es un centro de organización que asegura la simetría y la bipolaridad del proceso de división celular, al duplicarse de manera precisa durante la interfase de la mitosis. La expresión de E6 está relacionada con una acumulación anómala

de centrosomas en células que, además, presentan múltiples núcleos de formas irregulares. Así, en las primeras etapas del desarrollo de los tumores, E6 puede inducir deficiencias en la mitosis relacionadas con la multiplicación del centrosoma, contribuyendo a que incremente la probabilidad de que ocurran eventos que resulten en la progresión hacia la carcinogénesis (Fukasawa *et al.*, 1996; Duensing *et al.*, 2001).

Así mismo, E6 activa las telomerasas, que son ribonucleoproteínas que reconocen las secuencias repetitivas de ADN que se encuentran en los extremos de los cromosomas, los telómeros, y las extienden usando un templado de ARN que es, a la vez, parte de su estructura. La actividad de las telomerasas está asociada a la expresión de su subunidad catalítica, la hTERT que es inducida por E6 principalmente a nivel transcripcional. Esta activación puede abrogar la senescencia celular relacionada con la ausencia de telomerasa (Veldman *et al.*, 2001).

Por último, hay evidencia que indica que la oncoproteína E6 estimula la proliferación celular al inhibir la degradación de proteínas de la familia Src. La familia Src contiene enzimas del grupo de las tirosina cinasas que no tienen receptores y que están unidas a la membrana celular, como Lck y Blk. Normalmente estas enzimas se mantienen fosforiladas y por tanto inactivas, pero en estado desfosforilado inducen la síntesis de ADN y la proliferación celular. E6 puede interferir con la degradación de la forma activa de algunas de estas enzimas, ya que desvía a E6AP de sus sustratos habituales que son las tirosina cinasas, hacia la degradación de p53, lo que resulta en un aumento de la estabilidad de las proteínas de la familia Src (Oda *et al.*, 1999).

En cambio, E7 puede asociarse con la proteína Rb que es producto del gene supresor de retinoblastoma, llamado así por su asociación a un tipo de cáncer pediátrico que surge en la retina del ojo. Rb es una fosfoproteína nuclear que principalmente regula de manera negativa la actividad de factores de transcripción, que a su vez regulan genes que son esenciales para el progreso de la fase G₁ a la S del ciclo celular. E7 se une a la forma hipofosforilada de Rb, y otras proteínas de la misma familia, lo cual anula su capacidad de asociarse e inactivar la función del factor de transcripción celular E2F (Dyson *et al.*, 1989; Chellappan *et al.* 1992). Así mismo, E7 inactiva la vía Rb/p16 que controla la detención del ciclo celular. p16, también llamado INK4a, inhibe el progreso del ciclo al prevenir la

formación del complejo activo de la ciclina D1 y Cdk₄ (G₁-Cdk₄) que fosforila a Rb, que en este estado estimula la entrada a la fase S (Khleif *et al.*, 1996). Cuando E7 se une a Rb, aumenta la actividad de E2F que activa la expresión de p16, sin embargo Kiyono *et al.* (1998) demostraron que aún con un incremento de la actividad de p16, éste se vuelve inactivo y Rb continua fosforilado, lo cual hace suponer que hay una alteración de la vía, que hace que las células proliferen. Además, según Boyer *et al.* (1996), la unión de E7 a Rb hace que se degrade por la vía proteolítica dependiente de ubiquitina, lo que reduce aún más sus funciones.

Por otro lado, E7 induce de manera directa e indirecta la expresión constitutiva de la ciclina E y la ciclina A. En el caso de la ciclina E, E7 activa directamente su transcripción por medio de la unión del dominio cd2 al promotor de la ciclina. La ciclina A, en cambio, se activa por medio del dominio cd1 además del cd2, y de manera indirecta a través de la síntesis de otras proteínas aún no definidas. Así mismo, E7 puede activar de manera directa la transcripción de la ciclina A por medio de los sitios de unión al factor de transcripción E2F que se encuentran en el promotor del gene. La ciclina E es una limitante de la progresión por la fase G₁ del ciclo celular que se asocia a la Cdk₂ formando el complejo G₁/S-Cdk₂. Por su parte, la ciclina A forma el complejo S-Cdk₂ que es necesario durante la fase S, relacionándose con la replicación de ADN, el control de la transcripción y con la progresión a través de G₂. Esta activación de ambas ciclinas por E7, que está acompañada por un incremento en la actividad de las cinasas con las que se asocian, deriva en la promoción de la proliferación y la transformación celular (Zerfass *et al.*, 1995).

Además, E7 bloquea la función de los inhibidores de las Cdk como p21 y p27, también llamados Waf1 y Kip1 respectivamente. La unión de p21 y p27 con Cdk₂ inhibe la acción de esta cinasa en el control de la fase G₁ y la fase S del ciclo celular. E7 puede interactuar directamente formando complejos tanto con p21, como con p27, y por tanto suprime la inhibición de la cinasa, haciendo que las células proliferen. Además como se ha propuesto que ambas proteínas juegan un papel importante en los mecanismos que acoplan la diferenciación y el control de la división celular, la intervención de E7 implica que tiene indirectamente la capacidad de alterar el programa celular de diferenciación y permitir la replicación de ADN en células que ya estaban comprometidas (Jones *et al.*, 1997; Zerfass-Thome *et al.*, 1996).

E7 también puede suprimir la acción de señales que regulan negativamente el crecimiento celular, como el factor de crecimiento transformante β (TGF β) que puede ser considerado como un gen supresor de tumores. E7 se une directamente a Smad2, Smad3 y Smad4, los mediadores directos de la vía de señalización de TGF β , que al formar complejos y translocarse al núcleo activan la transcripción de diferentes genes que inhiben la proliferación. Además E7 bloquea la interacción de Smad3 con su sitio de unión al ADN. De esta forma, E7 induce una resistencia a los efectos antiproliferativos que pueden tener ciertos factores (Lee *et al.*, 2002).

Por otro lado la oncoproteína E7 puede estimular la apoptosis que resulta en la liberación de interleucina-1 α (IL-1 α). La IL-1 α es una citosina, producida y secuestrada por los queratinocitos, que promueve la inflamación, la remodelación de los tejidos y la proliferación anormal de los epitelios, activando genes que codifican para otras citosinas, receptores y moléculas de adhesión. E7 unido a Rb puede inducir la apoptosis, en parte, dependiente de p53 y, en parte, estimulada debido a que la actividad de E2F no es regulada negativamente en la fase S del ciclo celular. La muerte celular provoca la liberación de IL-1 α de los queratinocitos en las lesiones del cérvix con una consecuente inflamación del tejido, que en condiciones normales provoca una respuesta inmune. Sin embargo si no hay una respuesta efectiva, la liberación continua de IL-1 α estimula la mitogénesis y la liberación de factores mutagénicos, lo que al parecer puede incitar la angiogénesis y la metástasis de los tumores (Iglesias *et al.*, 1998).

Finalmente, E7 también induce aneuploidía. La aneuploidía, que es una manifestación de la inestabilidad genómica, puede presentarse cuando E7 incrementa la síntesis de centriolos, lo que deriva en la presencia de un número anormal de centrosomas que provoca el desarrollo de diferentes anomalías nucleares, incluyendo la multiplicación de los núcleos. Lo anterior, dado a que E7 puede alterar la regulación de la maquinaria implicada en el ciclo celular y el inicio de la duplicación de los centrosomas, modificando por ejemplo la actividad de Cdk₂. De esta forma, E7 causa anomalías mitóticas al afectar la homeostasis del centrosoma en las primeras fases de la progresión de los tumores y por tanto es un elemento importante en la ruta hacia la desestabilización genómica (Duensing *et al.*, 2001).

1.3.2. Oncogene E5

La expresión de E5 también se relaciona fundamentalmente con la inducción de la proliferación, con lo que se expande la población de células infectadas con VPH e incrementa la producción viral. Lo anterior debido a que favorece las vías de señalización que inician con los receptores a factores de crecimiento, actúa como un factor de sobrevivencia y afecta la sensibilidad de las células a señales que controlan el ciclo celular. Aunque en contraste, Tomakidi *et al.* (2000) proponen que debido a que E5 influye en la disminución de uniones *gap* entre las células, también puede estar relacionado con el inicio de la transformación maligna de los tumores.

El oncogene E5 estimula la proliferación celular al formar complejos con diferentes receptores ligados a tirosina cinasas como el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y el receptor al factor estimulante de colonias 1 (CSF-1R). Así, en estos casos E5 funciona como un mitógeno modulando la actividad de diferentes proteínas transmembranales (Hwang *et al.*, 1995).

Por otro lado, E5 disminuye la degradación del EGFR que se encuentra adentro de la célula, lo que permite su reciclaje hacia la membrana plasmática y, además, el aumento de su fosforilación. La inhibición de la degradación ocurre indirectamente, ya que E5 se une a una subunidad de la ATPasa que se encuentra en la vacuola celular y esta unión inhibe la acidificación del endosoma, la cual es necesaria para la degradación del receptor. Esta inhibición, por medio de E5, de la disminución de los niveles de EGFR incrementa la acción del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que estimula la proliferación celular (Conrad-Stoppler *et al.* 1996).

Además la activación de EGFR por E5, así como de otros receptores de su tipo, inicia diversos eventos bioquímicos que derivan en la transcripción constitutiva de proto-oncogenes como c-jun, junB y c-fos, que activan genes que son esenciales para la proliferación. Dicha inducción de c-jun, a su vez, inhibe la expresión de p21, que también

puede ser reprimido a nivel transcripcional por E5 promoviendo el crecimiento celular (Tsao *et al.*, 1996).

Más aún, la activación de EGFR a través de E5 puede prevenir la apoptosis. Esto sucede debido a que EGFR induce la acción de dos enzimas, la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K) y la cinasa activada por mitógenos ERK1/2 (ERK1/2 MAPK) que están involucradas en las vías de señalización de supervivencia en respuesta a estrés. De esta forma E5 también puede actuar como un factor antiapoptótico (Zhang *et al.*, 2002).

Por otra parte, E5 induce una reducción en la comunicación celular que se lleva a cabo a través de las uniones *gap* (GJIC). Las GJIC conectan directamente el citoplasma de las células por medio de canales angostos que permiten el intercambio de pequeñas moléculas intracelulares como Ca^{2+} o AMP cíclico. Las proteínas que forman estos canales se llaman conexinas. Al parecer E5 provoca la desfosforilación de la conexina 43 (Cx43), que se localiza predominantemente en el estrato espinoso menos diferenciado de la epidermis y que podría tener propiedades de supresor de tumores. Esta desfosforilación, que hace que cambie la estructura de las uniones *gap*, se lleva a cabo por medio de la disminución de la actividad de ciertas cinasas, o incrementando la actividad de algunas fosfatasas específicas, o ambas. La interrupción de la comunicación entre las células mediada por E5 hace que sean menos sensibles a las señales de las células normales que las rodean y más susceptibles a la acción de otras que llevan hacia la proliferación (Oelze *et al.* 1995).

2. Cooperación

2.1. Oncogenes virales

Además del efecto individual que tiene cada uno de los oncogenes E6, E7 y E5, se ha visto que existe una cooperación entre ellos, durante el proceso de carcinogénesis relacionado con el VPH.

Así, la expresión únicamente de E6 o de E7 puede incrementar la proliferación de células en cultivo o *in vivo* (Song *et al.*, 1999; Halbert *et al.*, 1991; Herber *et al.*, 1996), sin

según Song *et al.* (2000), E7 actúa en la fase de promoción y E6 en la progresión del desarrollo del tumor. Inicialmente E6 y E7 se complementan para promover la proliferación celular, después E6 influye en la transformación de las células y E7 continúa contribuyendo con la proliferación del carcinoma. Por otro lado, E6 o E7 pueden inducir por separado inestabilidad genómica, pero juntos cooperan en la inducción de aneuploidía. En este proceso E7 se asocia en sí con la duplicación anormal de los centrosomas, mientras que E6 incrementa la probabilidad de que las células anormales permanezcan proliferando y por tanto, acumulando anomalías nucleares (Duensing *et al.*, 2001). También hay una cooperación entre las oncoproteínas en el caso de la inducción de la actividad de la telomerasa. En este caso, aunque la activación por medio de E6 es suficiente para mantener constante la longitud de los telómeros de células en cultivo, las únicas que continúan proliferando son las que expresan además E7, que inactiva la vía de RB/p16 promoviendo la progresión del ciclo celular. De igual forma, aunque p16 contrarresta las acciones de E6, p16 se vuelve funcionalmente inactiva en presencia de E7. Además, aunque E7 puede inducir apoptosis dependiente de p53, la presencia de E6 hace que no haya tal respuesta debido a la degradación de la proteína (Figura 10).

Así mismo, existe cooperación entre E5 y E6, ya que bajo ciertas condiciones E6 no es capaz de apagar totalmente la síntesis de p21 al inactivar p53, por lo que la represión de p21 a través de E5 puede aumentar el efecto de E6 al reducir aún más los niveles de expresión de p21. E5 coopera con E7, siendo que la inhibición de p21 por medio de E5 puede derivar en la formación de complejos de la ciclina D1 y Cdk4 (G_1 -Cdk4) más activos, que a su vez fosforilan a la proteína Rb y la inactivan, complementando el efecto de la unión de E7 con Rb (Tsao *et al.*, 1996). Además, la interrupción de la comunicación entre las células mediada por E5 hace que sean más susceptibles a la acción de las oncoproteínas E6 y E7 que llevan hacia la proliferación (Oelze *et al.* 1995).

2.2. Oncogenes virales y celulares

Aún cuando el cáncer cérvico-uterino está fuertemente asociado a la infección con VPH, sólo un pequeño porcentaje de las mujeres infectadas desarrolla cáncer, lo que indica que

hay otros factores que contribuyen al desarrollo de estos tumores. Entre estos factores se encuentran otros oncogenes, el hábito de fumar, el uso de anticonceptivos, la actividad sexual, el número de partos, el tipo de alimentación, las infecciones mutagénicas con otros virus, bacterias o protozoarios, las características inmunogenéticas, etc. De tal manera que aunque E6 y E7, junto con E5, pueden inmortalizar células, éstas no son cancerígenas a menos que ocurran otros eventos. Lo anterior hace pensar que los oncogenes virales no inducen directamente la formación de tumores, sino que establecen una serie de condiciones que eventualmente darán origen al cáncer.

Ciertamente, los oncogenes virales pueden estar cooperando con oncogenes celulares durante el proceso de carcinogénesis. Un ejemplo notable es la cooperación específica de E7 con el proto-oncogene ras. Ras, que pertenece a una familia de GTPasas, está unido en su forma inactiva a difosfatónucleótidos de guanina (GDP) y en la activa a trifosfatónucleótidos de guanina (GTP), e interviene en las vías de señalización que van de la membrana celular al núcleo, regulando la proliferación y la diferenciación de las células, así como la inhibición de la apoptosis. Las mutaciones en ras hacen que se mantenga constitutivamente en la forma activa, lo cual reduce su actividad intrínseca de GTPasa y suprime por completo su activación por otras proteínas. Lo anterior, resulta en la activación de la cascada de señalización de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que están involucradas, a su vez, en la activación de factores de transcripción como c-jun, c-myc y c-fos que estimulan genes relacionados con la proliferación. Así mismo, una de estas cinasas es la PI3K que previene la apoptosis. El ras oncogénico también incrementa la expresión del factor de crecimiento angiogénico (VEGF), que está implicado en los procesos asociados con la angiogénesis y la metástasis de los tumores (Adjei, 2001; Crespo y León, 2000).

2.2.1. Sonic hedgehog

Actualmente existe evidencia que indica que uno de los factores involucrados en el desarrollo de los tumores es la alteración de la vía de señalización de Sonic hedgehog (Shh), que regula la proliferación de las ya mencionadas células troncales, es decir, que está

implicado en los eventos celulares que propician el cáncer. Shh regula la auto-renovación y el establecimiento de patrones de los tejidos que se encuentran en constante recambio, como los epitelios, cuya alteración puede derivar en la formación de tumores malignos.

La tumorigénesis se ha asociado con mutaciones que activan de manera constitutiva la respuesta transcripcional de la ruta de señalización de Shh donde, a diferencia de la mayoría de las vías, la transducción de la señal ocurre gracias a una secuencia de interacciones represivas (Taipale y Beachy, 2001). Shh es un factor morfogenético, que una vez secretado, llega a las células blanco y forma un gradiente extracelular que induce, según la concentración de la proteína, la transcripción de ciertos genes que le dan identidad a estas células (Christian, 2000). Cuando Shh está presente, se une al supresor de tumores Patched (Ptc), que a su vez permite la activación de la transcripción mediada por el proto-oncogene Smoothened (Smo). Según Taipale *et al.* (2002), Ptc funciona normalmente como un transportador molecular, que actúa indirectamente para inhibir la actividad de Smo, posiblemente por medio de la distribución o la concentración de alguna molécula pequeña. La activación de Smo activa la transcripción de genes blanco de Shh a través de los factores de transcripción Gli, que presentan dominios de unión a ADN del tipo dedo de zinc (Ruiz i Altaba *et al.*, 2002). Dentro de estos factores se encuentra Gli3 que funciona principalmente como represor, y Gli1 y Gli2 que son activadores de genes blanco de Shh, como los mismos Gli y Ptc (Taipale y Beachy, 2001) (Figura 11).

La mayoría del tiempo la vía de señalización está apagada gracias a Ptc y a otros inhibidores que la reprimen en condiciones donde no hay Shh. La evidencia actual indica que la pérdida de la función de Ptc y la ganancia de la función de Smo causa tumores epiteliales debido a la activación constitutiva de la vía, y por tanto, de los factores Gli, especialmente de Gli1 que estimula la proliferación celular (Toftgard, 2000; Xié *et al.*, 1998; Dahmane *et al.*, 1997). La sobreexpresión de Shh tiene un efecto similar al de la pérdida de función de Ptc y por tanto promueve la formación de tumores (Oro *et al.*, 1997). Un mecanismo por el cual Shh estimula la proliferación de las células es contrarrestando los efectos de p21 en el control del ciclo celular (Fan y Khavari, 1999). Además, Shh por sí solo puede actuar como un oncogene dominante, ya que una mutación en su secuencia puede ser suficiente para que haya tumorigénesis (Oro *et al.*, 1997).

Ruiz i Altaba et al. 2002

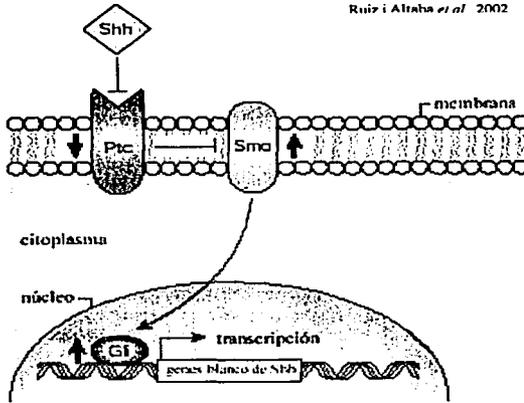


Figura 11. Vía de señalización de *Sonic hedgehog*. En ausencia de Shh, Ptc inhibe la actividad de Smo. Smo es un activador de la transcripción de genes blancos de Shh a través de los factores de transcripción Gli.

Así mismo, hay datos que sugieren que la activación constitutiva de la vía de Shh aumenta la auto-renovación y disminuye la diferenciación de CT en el tejido epitelial. Dado que las longevas CT tienen mayor probabilidad de adquirir mutaciones subsecuentes que inactiven a supresores como Ptc, la expansión de esta población puede ser considerada como el primer paso en el desarrollo del cáncer. Taipale y Beachy (2001) proponen un modelo en el que la iniciación del tumor involucra la adquisición de mutaciones silenciosas en CT normales. Estas mutaciones no necesariamente implican una ventaja que promueva el crecimiento excesivo de las células, ya que se presentan en genes involucrados en mantener la integridad del genoma o en uno sólo de los alelos de Ptc, por ejemplo. A continuación, una nueva mutación da origen a la expansión de CT aberrantes que dan lugar a células de amplificación pasajera, que diferencian hacia células aparentemente normales formando una neoplasia. El incremento de CT hace que se altere la organización espacial donde ocurre la proliferación y las células son encontradas en regiones donde normalmente no hay división. Aún en esta etapa, las células se mantienen dentro de los límites del tejido epitelial. Sin embargo, las mutaciones subsecuentes y la selección de las clonas lleva hacia

una proliferación más rápida, incrementando la auto-renovación de las CT y la disminución de la diferenciación, que ocasiona la invasión del mesénquima y la metástasis.

La alta frecuencia con la que se han encontrado mutaciones en la vía de Shh en ciertos tipos de tumores hace pensar que la activación transcripcional consecuente es un mecanismo eficiente para alterar la proliferación celular. Algunos de estos tumores son el BCC, el meduloblastoma, el fibroma de ovario, el fibroma cardiaco, el rhabdomioma fetal, el meningioma, el ameloblastoma, el tricoepitelioma, el carcinoma de vejiga, el SCC esofágico, los tumores primitivos neuroectodérmicos (PNET) y los encontrados en pacientes con el síndrome del carcinoma nevo basocelular (NBCCS), como el rhabdiosarcoma, el carcinoma de ovario y el BCC de pulmón, entre otros (Toftgard, 2000). Sin embargo, debido a que las alteraciones se presentan sólo en algunos tipos de tumores es probable que se necesite de la cooperación de la vía de Shh con otros factores críticos, característicos de las células diferenciadas, para el desarrollo del cáncer (Taipale y Beachy, 2001).

3. El ratón como modelo de estudio del cáncer

Aunque durante mucho tiempo la levadura fue una herramienta muy poderosa para el estudio de los genes eucariontes, según Jackson-Grusby (2002), el ratón de laboratorio se ha convertido en los últimos veinte años en el organismo clave para estudiar las enfermedades genéticas humanas, y especialmente para el descubrimiento y la validación de los genes implicados en el cáncer. Lo anterior debido, entre otras cosas, a la gran similitud, tanto biológica como genética, que existe entre el desarrollo de los tumores en humano y en ratón. Además, al usar ratones se puede controlar la influencia ambiental en la tumorigénesis, lo que permite enfocarse sólo a los componentes genéticos, algo que es imposible de llevar a cabo en poblaciones humanas (Balmain, 2002). Así, la construcción de ratones transgénicos, que ha sido posible gracias a la habilidad de transferir de manera estable genes heterólogos o genes alterados en la línea germinal del ratón y producir linajes con dicho programa genético, ha sido esencial para estudiar *in vivo* los procesos involucrados en cáncer. Más aún, la posibilidad de tener cepas endocriadas, exocriadas con

historias evolutivas diversas, endocriadas recombinantes, congénitos recombinantes, *knock-outs*, *knock-ins*, etc., hace que el ratón sea una fuente genética sin comparación (Balmain, 2002).

Específicamente relacionados con los oncogenes E6/E7 o el factor Shh se han construido diversos ratones transgénicos, principalmente cepas endocriadas, que han ayudado a estudiar el cáncer. La mayoría de estos ratones se construyeron con los genes de interés bajo promotores de queratinas. Las queratinas son las proteínas estructurales que constituyen el 85 % de los queratinocitos diferenciados de la epidermis de los vertebrados (Fuchs, 1995). Los promotores más usados han sido los de las queratinas 5 y 14 (K5 y K14), que en el ratón adulto se expresan en la capa basal.

Así, el TgK14HPV16, que presenta toda la secuencia de los genes tempranos del VPH dirigida a la capa basal gracias al promotor K14, desarrolla carcinomas en el cérvix y la vagina al ser tratado con estrógenos (Arbeit *et al.*, 1996). El TgK14HPV16E6/E7 desarrolla SCC, y el TgK14HPV16E7 induce hiperplasia en la piel, y SCC y epitelomas sebáceos de manera tardía (Herber *et al.*, 1996). Así mismo, TgK14HPV16E6 induce papilomas y carcinomas epidermoides (Song *et al.*, 1999). El Tg α AHPV16E6/E7, donde alternativamente la expresión de los oncogenes está dirigida a los lentes oculares del ratón gracias al promotor α A cristalino, expresa E6/E7 en otros tejidos incluyendo la piel, presentando una gran incidencia de lesiones pre-neoplásicas y el subsecuente desarrollo de SCC (Lambert *et al.*, 1993). El ratón TgMMTVHPV16E6/E7, cuyo promotor es el del virus de los tumores de mama de ratón, presenta hiperplasia y displasia en el cérvix y la vagina de manera temprana, además de neoplasia en otros órganos (Sasagawa *et al.*, 1994). Por otro lado, el TgK14Shh, que expresa Shh en la capa basal dado su promotor, desarrolla múltiples proliferaciones similares al BCC a lo largo de toda la piel (Oro *et al.*, 1997). El TgK5Smo, donde la expresión de Smo también está restringida a las capas basales, desarrolla lesiones muy parecidas al BCC (Xie *et al.*, 1998). El TgK5Gli1 presenta BCC, tricoepitelioma, cilindroma y tricoblastoma (Nilsson *et al.*, 2000) y el TgK5Gli2 induce únicamente BCC (Sheng *et al.*, 2002). Por otro lado, el ratón Ptc1 \pm recapitula las características que presentan los pacientes con NBCCS, incluyendo el desarrollo de rhabdomyosarcoma y otro tipo de tumores internos, además de presentar meduloblastoma y

PNET, pero únicamente después de estar expuesto a radiación genera BCC y tricoblastoma (Toftgard, 2000; Aszterbaum *et al.*, 1999).

Escalante-Alcalde *et al.*, 2000

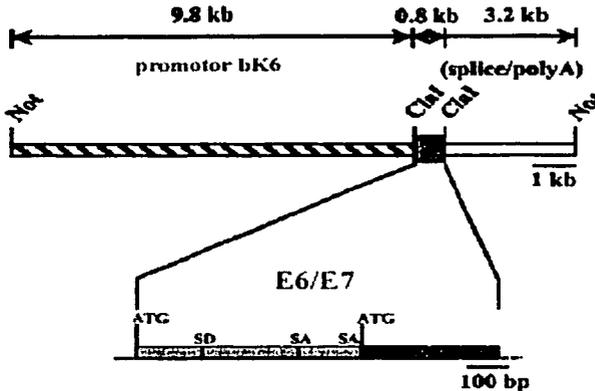


Figura 12. Construcción del ratón TgbK6-E6/E7. El fragmento con los oncogenes E6/E7 fue insertado entre el fragmento del promotor bK6 y el fragmento que contiene la señal de poliadenilación SV40.

Otro de los linajes transgénicos para estudiar específicamente el cáncer cervicouterino es el ratón TgbK6-E6/E7, que expresa los oncogenes E6/E7 bajo un promotor diferente a los usuales K5 ó K14. Escalante-Alcalde *et al.* (2000) produjeron el transgénico por inyección pronuclear de ADN recombinante en la cepa CD-1. Los marcos de lectura abierta E6/E7 fueron insertados bajo el promotor de la queratina 6 de bovino (bK6) para dirigir la expresión oncogénica a las capas epiteliales en proliferación (Figura 12). K6 es un promotor que se expresa en varios epitelios estratificados y tiene la ventaja de responder al mutágeno 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) de la misma forma que el LCR del VPH. Además la activación de K6 coincide con la hiperproliferación de las células, y su expresión aumenta en células de tumores derivados de tejidos epiteliales y al inicio de la regeneración del epitelio del cérvix. En el transgénico, la K6 se expresa principalmente en el folículo piloso y en las capas suprabasales de la epidermis cuando se hace una herida o en respuesta a activadores como el ácido retinóico, los estrógenos o el forbol. El fenotipo

del TgbK6-E6/E7 se caracteriza por una baja densidad de pelo y la habilidad de regenerarlo rápidamente. En general, el ciclo del pelo presenta tres etapas que son anagen (crecimiento), catagen (regresión) y telogen (reposo). En telogen las células se encuentran en la fase G_0 (reposo) del ciclo celular. El fenotipo del ratón transgénico se explica dado que el folículo se regenera normalmente a partir de la población de CT que se encuentra en la protuberancia (*bulge*) del folículo, y cada vez que se activa un nuevo ciclo del pelo, se activa la población de CT y el ciclo no se detiene en telogen. La continua regeneración del pelo puede deberse a que los oncogenes permiten que las células escapen de G_0 y se dividan. Así, la expresión de E6/E7 parece estar inducida al inicio de la regeneración. Por tanto, es posible que los oncogenes se estén expresando en las CT.

Dadas las características anteriores, este modelo puede utilizarse para estudiar los oncogenes y otros factores, además de los eventos celulares, que conducen al desarrollo de cáncer en la piel del ratón, lo cual resulta más sencillo que en el cérvix. Sin embargo, hasta el momento, únicamente se han analizado los efectos de los oncogenes en la mencionada regulación del ciclo de crecimiento del pelo del ratón transgénico. Otros tipos de análisis no han sido posibles dado a que no se ha logrado la inducción de tumores en el TgbK6-E6/E7, probablemente debido que fue exocriado en la cepa CD-1 que se ha caracterizado por ser poco susceptible al desarrollo de cáncer. Sin embargo, el ser una cepa exocriada le confiere ventajas como modelo, ya que representa más fielmente lo que sucede en la población humana. Además, como el ratón no genera tumores espontáneamente es ideal para estudiar el desarrollo del cáncer como consecuencia de la presencia de nuevos factores que se van adicionando para generar los tumores.

Justificación

El CaCu es una de las principales causas de muerte en el mundo y específicamente, en México, es el más común de todos los tumores que presentan las mujeres. Por tanto, el estudio de los factores involucrados en el desarrollo de este tipo de cáncer resulta de singular importancia para poder eventualmente prevenir, controlar y reducir su incidencia.

En general, los tumores evolucionan hacia un fenotipo maligno debido a la cooperación que existe entre diferentes eventos, reflejada en una acumulación de alteraciones que hacen que las células se vuelvan cancerígenas. En el caso del CaCu, la evidencia epidemiológica indica que está fuertemente ligado al Virus del Papiloma Humano tipo 16 que expresa los oncogenes E6/E7. Sin embargo, aún cuando está fuertemente asociado con la infección con VPH, sólo un pequeño porcentaje de las mujeres infectadas desarrolla cáncer. Lo anterior hace pensar que los oncogenes virales no inducen directamente la formación de tumores, sino que establecen una serie de condiciones que eventualmente darán origen al cáncer, de tal forma que hay otros factores que contribuyen a su desarrollo. La alta frecuencia con la que se han encontrado mutaciones en la vía del factor morfogenético Shh en ciertos tipos de tumores, hace pensar que la consecuente activación transcripcional es un mecanismo eficiente para alterar la proliferación celular, especialmente de las células troncales. Sin embargo, debido a que las alteraciones se presentan sólo en algunos tipos de tumores es probable que se necesite de la cooperación de la vía de Shh con otros factores críticos, característicos de las células diferenciadas, para el desarrollo de los fenotipos malignos. Por lo tanto, debido a que ni los oncogenes E6/E7 por sí solos, ni únicamente Shh son suficientes para que se desarrolle el cáncer, puede ser que ambos cooperen en el proceso.

Se cuenta con el ratón TgbK6-E6/E7 que es un modelo para el estudio del cáncer y que, al no generar tumores espontáneamente, es adecuado para evaluar factores adicionales que pueden cooperar en el desarrollo de los tumores. El estudio de estos factores puede facilitarse implementando un método eficiente de modificación genética de células de interés, en contraposición a la lenta y laboriosa construcción de un ratón transgénico. Debido a que los oncogenes se expresan en la epidermis la evaluación puede realizarse en la piel del ratón, lo cual resulta más sencillo que en el cérvix. Además se propone que

E6/E7 se expresan en las células troncales, lo cual hace posible el estudio de eventos celulares en la tumorigénesis. Sin embargo, ya que no ha sido posible inducir tumores en el modelo, el aumento de la proliferación de la epidermis y la consecuente regeneración después de un daño, puede estudiarse a corto plazo como indicativo de alteraciones cancerígenas.

Hipótesis

La activación constitutiva de la vía de señalización del factor morfogénético Shh en las células de la epidermis, específicamente en las células troncales, coopera con los oncogenes E6/E7 del VPH tipo 16 en la regeneración del tejido epitelial del ratón.

Objetivos

- Implementar un sistema eficiente para el estudio de la regeneración de la epidermis en ratón.
- Evaluar el efecto de los oncogenes E6/E7 del VPH tipo 16 en la regeneración de la epidermis.
- Implementar un método *in vivo* eficiente para modificar genéticamente la epidermis.
- Evaluar la cooperación del factor morfogenético Shh y los oncogenes E6/E7 en la regeneración de la epidermis.

Materiales y métodos

1. Animales

Los experimentos se realizaron en ratones (*Mus musculus*) silvestres (wt) y transgénicos (TgbK6-E6/E7), ambos con la misma cepa exocriada (CD-1), obtenidos de cruza Tg/wt x wt/wt. Los ratones TgbK6-E6/E7 pertenecen a la línea M8, que presentan un fenotipo marcado, caracterizado por un gradiente en la densidad del pelo, relacionado con la expresión de los oncogenes E6/E7 en los folículos pilosos. Los ratones se mantuvieron en un cuarto con foto-periodo controlado de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad, recibiendo comida y agua *ad libitum*.

2. Plásmidos

Se utilizaron tres plásmidos reporteros, el pQBI25 que contiene la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP), y el pCH110 y el p β Actina β -gal que contienen la secuencia de LacZ (Figura 13). Los tres a una concentración de 1 μ g/ μ l.

3. Adenovirus

Se utilizaron dos adenovirus, el Adenovirus LacZ (AdLacZ) y el Adenovirus Sonic hedgehog (AdShh). El AdLacZ fue donado por Makiko Fujii y se usaron dos lotes distintos, uno con un título de 10⁹ y otro con un título de 10⁷. El AdShh, que presenta el ADNc del Shh de ratón, fue construido por Sato et al. (1999) y donado por Ronald G. Crystal, y se usó un sólo lote con un título de 10⁹.

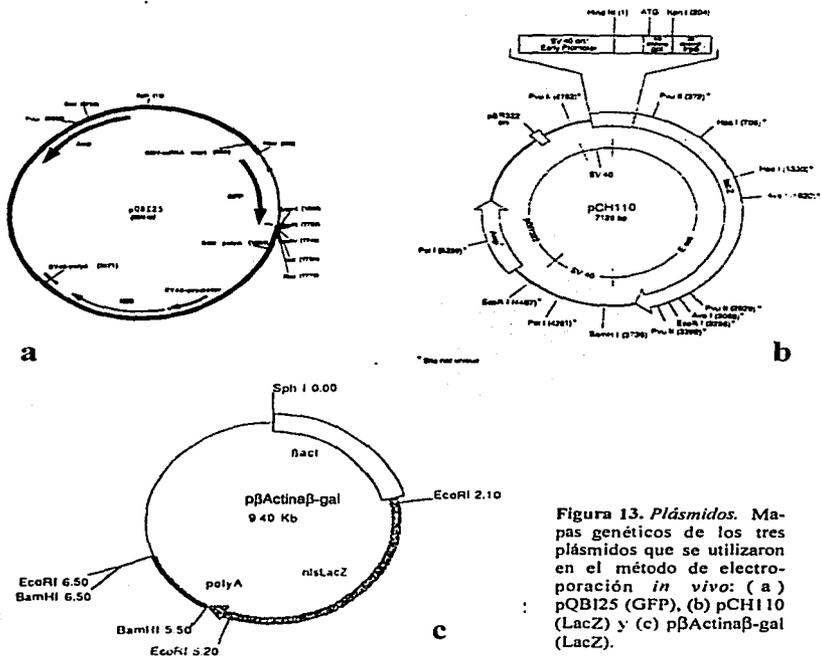


Figura 13. Plásmidos. Mapas genéticos de los tres plásmidos que se utilizaron en el método de electroporación *in vivo*: (a) pQB125 (GFP), (b) pCH110 (LacZ) y (c) pβActinaβ-gal (LacZ).

4. Electroporación de plásmidos pQB125, pCH110 y pβActinaβ-gal

1. Poner en hielo las células de electroporación, una por cada plásmido.
2. Preparar un tubo de ensaye por celda con medio de recuperación:
 - medio SOB 980 μ l
 - Mg 2 M 10 μ l
 - glucosa 2 M 10 μ l
3. Descongelar en hielo una alícuota de células electrocompetentes DH5 α por celda.

4. Añadir 1 μ l de plásmido (1 ng/ μ l) a la alcuota de células y pasar la mezcla a la celda, procurando que no se formen burbujas.
5. Sacar la celda del hielo, secarla y ponerla en el electroporador BIO-RAD.
6. Dar un pulso de 25 μ F, 200 ohms y 1.8 mV.
7. Añadir inmediatamente el medio de recuperación a la celda y pasar la mezcla al tubo de ensaye.
8. Incubar en agitación a 37 °C por 1 hr.
9. Pasar a un tubo de 1.5 ml y centrifugar a 12 000 rpm por 1 min, dejar 100 μ l de sobrenadante y resuspender la pastilla.
10. Platear los 100 μ l (~100 colonias) en cajas de medio LB sólido con carbenicilina (50 μ l/ml).
11. Incubar a 37 °C durante la noche.

5. Purificación de los plásmidos pQBI25, pCH110 y p β Actina β -gal a gran escala

1. Picar una colonia de las cajas de medio LB sólido donde crecieron las células transformadas con los diferentes plásmidos. Ponerla en un tubo de ensaye con 2 ml de medio LB y 2 μ l de carbenicilina (50 μ l/ml), e incubar en agitación a 37 °C por 6-8 hrs.
2. Pasar a un matraz de 1 lt con 500 ml de medio LB y 500 μ l de carbenicilina (50 μ l/ml), e incubar en agitación a 37 °C durante la noche.
3. Pasar a dos botes de plástico de 500 ml, balancearlos y centrifugar en la máquina Beckman J2-MI en el rotor JA10 a 6 000 rpm por 15 min a 4 °C.
4. Tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 50 ml de solución P1.
5. Añadir 200 μ l de RNAsa (10 mg/ml) y pasar los 50 ml a un bote de plástico de 250 ml.
6. Añadir 50 ml de solución P2 recién hecho y mezclar lentamente. Incubar en hielo por 10 min.
7. Añadir 50 ml de solución P3 frío y mezclar lentamente. Incubar en hielo por 15 min, mezclar lentamente e incubar en hielo durante otros 15 min.

8. Balancear con un bote igual y centrifugar en el rotor JA14 a 12 000 rpm por 30 min a 4 ° C.
9. Tomar el sobrenadante, colocarlo en un bote de plástico de 250 ml, balancear con un bote igual y centrifugar en el rotor JA14 a 12 000 rpm por 30 min a 4 ° C.
10. Filtrar el sobrenadante pasándolo por una gasa a una probeta de 250 ml.
11. Adicionar 0.7 del volumen de isopropanol frío y mezclar por inversión.
12. Pasar a dos botes de 250 ml, balancear y centrifugar en el rotor JA14 a 12 000 rpm por 30 min a 4 ° C.
13. Resuspender la pastilla en 10 ml de buffer TE y añadir nuevamente 100 µl de RNAsa (10 mg/ml).
14. Pasar a un tubo de plástico de 50 ml, añadir 10 ml de fenol pH 8.0 y 10 ml de cloroformo, mezclar con vórtex.
15. Balancear y centrifugar en el rotor JA20 a 14 000 rpm por 7 min a 4 ° C.
16. Tomar la fase superior usando una jeringa de 3 ml son aguja.
17. Volver a añadir 10 ml de fenol pH 8.0 y 10 ml de cloroformo, mezclar con vórtex.
18. Balancear y centrifugar en el rotor JA20 a 14 000 rpm por 7 min a 4 ° C.
19. Tomar la fase superior usando una jeringa de 3 ml son aguja.
20. Añadir 15 ml de cloroformo, mezclar con vórtex.
21. Balancear y centrifugar en el rotor JA20 a 14 000 rpm por 7 min a 4 ° C.
22. Tomar la fase superior usando una jeringa de 3 ml son aguja y hacer alícuotas de 1 ml en tubos de 1.5 ml.
23. A cada alícuota adicionar 200 µl de NaCl 5 M y 330 µl de polietilenglicol 30% (PEG).
24. Congelar a -70 ° C al menos por 2 hrs.
25. Descongelar a temperatura ambiente.
26. Centrifugar en máquina Eppendorf 5417R a 14 000 rpm por 20 min a 4 ° C.
27. Tirar el sobrenadante y resuspender todas las pastillas juntas en 500 µl de buffer TE.
28. Añadir 1 volumen de cloroformo, mezclar con vórtex.
29. Centrifugar en máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min.
30. Tomar la fase superior, y precipitar adicionando 1/50 del volumen de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol 100 % frío.

31. Meter a -20°C durante 10 min.
32. Centrifugar en máquina Eppendorf 5417R a 14 000 rpm por 10 min a 4°C .
33. Añadir 1.3 ml de etanol 70 %, mezclar con vórtex.
34. Centrifugar en máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min.
35. Añadir 1.3 ml de etanol 70 %, mezclar con vórtex (no hacer en el caso de pQBI25).
36. Centrifugar en máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min (no hacer en el caso de pQBI25).
37. Secar la pastilla en el Savant SpeedVac SC100 por 3-5 min.
38. Resuspender la pastilla en 500 μl de agua esterilizada y filtrada.

6. Repurificación de los plásmidos pQBI25, pCH110 y p β Actina β -gal

1. Dividir los 500 μl de plásmido obtenido en dos alícuotas de 250 μl y añadir a cada 250 μl de fenol pH 8.0 y 250 μl de cloroformo, mezclar con vórtex.
2. Centrifugar en la máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min.
3. Tomar la fase superior y añadir 1 volumen de fenol pH 8.0 y 1 volumen de cloroformo, mezclar con vórtex.
4. Centrifugar a 13 200 rpm por 3 min.
5. Tomar la fase superior y añadir 1 volumen de cloroformo, mezclar con vórtex.
6. Centrifugar a 13 200 rpm por 3 min.
7. Tomar la fase superior y precipitar adicionando 1/50 del volumen de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol 100 % frío.
8. Incubar a -20°C durante 10 min.
9. Centrifugar en máquina Eppendorf 5417R a 14 000 rpm por 10 min a 4°C .
10. Añadir 1.3 ml de etanol 70 %, mezclar con vórtex.
11. Centrifugar en máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min.
12. Añadir 1.3 ml de etanol 70 %, mezclar con vórtex (no hacer en el caso de pQBI25).
13. Centrifugar en máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min (no hacer en el caso de pQBI25).

14. Secar la pastilla en el Savant SpeedVac SC100 por 3-5 min.
15. Resuspender las dos pastillas juntas en 500 μ l de buffer TE.
16. Adicionar 200 μ l de NaCl 5 M y 330 μ l de polietilenglicol 30% (PEG).
17. Congelar a -70 °C al menos por 2 hrs.
18. Descongelar a temperatura ambiente.
19. Centrifugar en máquina Eppendorf 5417R a 14 000 rpm por 20 min a 4 °C.
20. Tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 500 μ l de agua filtrada.
21. Añadir 1 volumen de cloroformo, mezclar con vórtex.
22. Centrifugar en máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min.
23. Tomar la fase superior, y precipitar adicionando 1/50 del volumen de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol 100 % frío.
24. Meter a -20 °C durante 10 min.
25. Centrifugar en máquina Eppendorf 5417R a 14 000 rpm por 10 min a 4 °C.
26. Añadir 1.3 ml de etanol 70 %, mezclar con vórtex.
27. Centrifugar en máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min.
28. Añadir 1.3 ml de etanol 70 %, mezclar con vórtex (no hacer en el caso de pQBI25).
29. Centrifugar en máquina Eppendorf 5415D a 13 200 rpm por 3 min (no hacer en el caso de pQBI25).
30. Secar la pastilla en el Savant SpeedVac SC100 por 3-5 min.
31. Resuspender la pastilla en 500 μ l de agua esterilizada y filtrada.
32. Leer la densidad óptica a 260 nm en el espectrofotómetro Beckman DU650 y calcular la concentración como sigue: tomar 1 μ l de muestra y 999 μ l de agua en una celda de cuarzo de 1 ml. Leer DO_{260} . $1 DO_{260} = 50 \mu$ g de ADN en 1 μ l. Diluir a una concentración final de 1.0 μ g/ μ l.

7. Extracción de ADN genómico de la cola del ratón

1. Cortar con unas tijeras de disección, desinfectadas con etanol 70 %, 4-5 mm de la cola y colocar el pedazo en un tubo de 1.5 ml. Congelar a -20 °C si no se va a realizar la extracción de inmediato.

2. Añadir 200 μl de buffer de cola 1x (puede guardarse a 4 °C por dos semanas).
3. Incubar a 95-100 °C por 20 min.
4. Dejar enfriar hasta que la temperatura llegue a 55 °C (dejar alrededor de 15 min a temperatura ambiente).
5. Añadir 5 μl de proteinasa K (20 mg/ml) y mezclar por inversión.
6. Incubar a 55 °C durante la noche.
7. Mezclar con vórtex por 5 seg para romper el tejido.
8. Incubar a 95-100 °C por 5 min para inactivar la proteinasa K.
9. Centrifugar a > 5 000 g por 20 min a 4 °C y tomar 150 μl del líquido. La muestra puede ser guardada a -20 °C durante varios meses.
10. Tomar 2.5 μl (~0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para una reacción de PCR de un volumen final de 50 μl .

8. Reacción de polimerización en cadena (PCR) específico para los oncogenes E6/E7

1. Preparar mezcla para PCR:

• agua esterilizada y filtrada	37.5 μl
• buffer Taq ADN polimerasa 10x	5 μl
• 4dNTPs 5 mM	2 μl
• oligonucleótido 5'-E7 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 μl
• oligonucleótido E6/E7-3' 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 μl
• Taq ADN polimerasa 5 U/ μl	1 μl
2. Tomar 2.5 μl de ADN genómico (~0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y ponerlos en un tubo de 0.2 ml. Colocar en la máquina de PCR Perkin Elmer 2400 y programar para dar un "hot start" de 95 °C por 5 min. Poner en hielo.
3. Añadir los 47.5 μl de mezcla para PCR.
4. Colocar en la máquina de PCR y programar un "hot start" de 95 °C por 5 min y 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 57 °C por 1 min y 72 °C por 1 min y 72 °C por 10 min de elongación.

5. Correr 10 μ l con 2 μ l de buffer de carga en un gel de agarosa al 2 % y 10 μ l de marcador de ADN (escalera de 100 pb).

9. Transcripción reversa y reacción de polimerización en cadena (RT-PCR) específico para HPRT, Shh, Ptc1 y Gli1

1. Homogenizar el tejido con un aparato Glas-Col en 1 ml de solución Urea/LiCl y colocarlo en un tubo de 1.5 ml.
2. Incubar a -20°C durante la noche.
3. Descongelar los tubos y mezclar con vórtex por 15 seg.
4. Centrifugar en máquina Eppendorf 5417R a 14 000 g por 10 min a 4°C .
5. Decantar el sobrenadante y colocar el tubo en forma invertida sobre un papel absorbente. Secar el exceso de solución con un isopo de algodón sin pasar de la mitad superior del tubo y colocarlo en hielo.
6. Resuspender en 500 μ l de solución D y mezclar con vórtex en dos ocasiones por 30 seg .
8. Añadir 1/10 de acetato de sodio 2 M pH 4 y mezclar con vórtex por 5 seg.
9. Añadir 500 μ l de fenol ácido saturado con agua y mezclar con vórtex por 2 min.
10. Añadir 2/10 del volumen inicial de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y mezclar con vórtex por 3 min.
11. Incubar en hielo por 15 min.
12. Centrifugar a 16 000 g por 20 min a 4°C .
13. Tomar la fase acuosa y añadir 1 volumen de isopropanol frío, mezclar con vórtex por 10 seg.
14. Precipitar a -70°C durante la noche o en hielo seco por 1 hr.
15. Centrifugar a 16 000 g por 20 min a 4°C y colocar en hielo todo el tiempo a partir de este punto.
16. Decantar el sobrenadante y colocar el tubo en forma invertida sobre un papel absorbente. Secar el exceso de solución con un isopo de algodón sin pasar de la mitad superior del tubo y colocarlo en hielo.

17. Añadir 1.3 ml de etanol 70 %, mezclar con vórtex por 5 seg.
18. Centrifugar a 16 000 g por 5 min a 4 °C.
19. Decantar el sobrenadante y colocar el tubo en forma invertida sobre un papel absorbente. Secar el exceso de solución con un isopo de algodón sin pasar de la mitad superior del tubo y colocarlo en hielo.
20. Secar la pastilla en el Savant SpeedVac SC100 por 5 min y colocar en hielo.
21. Resuspender en 48.87 µl de agua esterilizada y filtrada con 0.25 µl de ADNasa libre de ARNasa, mezclar con vórtex por 30 seg y dar un pulso de 5 seg en la centrifuga Eppendorf 5415D.
22. Incubar a 37 °C por 1 hr.
23. Inactivar añadiendo 450 µl de solución D y 50 µl de acetato de sodio 2 M pH 4, mezclar con vórtex por 5 seg.
24. Añadir 1 volumen de isopropanol frío, mezclar con vórtex por 10 seg.
25. Incubar a -70 °C por 1 hr.
26. Centrifugar a 16 000 g por 5 min a 4 °C.
27. Decantar el sobrenadante y colocar el tubo en forma invertida sobre un papel absorbente. Secar el exceso de solución con un isopo de algodón sin pasar de la mitad superior del tubo y colocarlo en hielo.
28. Secar en el Savant SpeedVac SC100 por 2 min y colocar en hielo.
29. Resuspender el ARN en 20 µl de agua esterilizada y filtrada fría, mezclar con vórtex dos veces por 30 seg.
30. Leer la densidad óptica a 260 nm en el espectrofotómetro Beckman DU650 y calcular la concentración como sigue: tomar 1 µl de muestra y 59 µl de agua en una celda de cuarzo de 50 µl. Leer DO_{260} . $DO_{260}/16.66 \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{concentración } \mu\text{g}/\mu\text{l}$.
31. Preparar mezcla para ADNc:

• agua	6.5 µl
• buffer RT 5x	6 µl
• DTT 0.1 M 10x	3 µl
• 4dNTPs 5 mM	3 µl
• oligonucleótido dT 0.5 mg/ml	1 µl
• transcriptasa reversa 200 U/ml	0.5 µl

32. Calentar la muestra de ARN a 65 °C por 5 min. Dar un pulso y colocar en hielo.
33. Tomar 1 µg de ARN y aforar con agua a 10 µl, y agregar a los 20 µl de mezcla para ADNc. Mezclar con vórtex y dar un pulso de 5 seg en la centrifuga Eppendorf 5415D.
34. Incubar a 37 °C por 1 hr.
35. Puede guardarse la mezcla a -20 °C o proceder inmediatamente con la reacción de PCR.
36. Preparar mezcla para PCR:

• agua esterilizada y filtrada	37.5 µl
• buffer Taq ADN polimerasa 10x	5 µl
• 4dNTPs 5 mM	2 µl
• oligonucleótido 1 0.1 µg/µl	1 µl
• oligonucleótido 2 0.1 µg/µl	1 µl
• Taq ADN polimerasa 5 U/µl	0.5 µl
37. Tomar 3 µl de ADNc y agregar a un tubo de 1.5 ml con los 47 µl de mezcla para PCR.
38. Cubrir con 50 µl de aceite mineral.
39. Colocar en la máquina de PCR Hybaid y programar la temperatura y los ciclos correspondientes.
40. Correr 10 µl con 2 µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 2.5 % y 10 µl de marcador de ADN (escalera de 100 pb).

marcador	temperatura de amplificación	amplificado
HPRT	92 °C x 1 min, 57 °C x 1 min, 72 °C x 1 min, 72 °C x 10 min	353 pb
Shh	92 °C x 1 min, 64 °C x 1 min, 72 °C x 1 min, 72 °C x 10 min	395 pb
Ptc1	92 °C x 1 min, 62 °C x 1 min, 72 °C x 1 min, 72 °C x 10 min	587 pb
Gli1	92 °C x 1 min, 62 °C x 1 min, 72 °C x 1 min, 72 °C x 10 min	520 pb

oligonucleótidos	secuencia
HPRT-1	5'-CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG
HPRT-2	5'-GTCAAGGCCATATCCAACAACAAAC
Shh-1	5'-CGGCAGATATGAAGGGAAGATCA
Shh-2	5'-CGGAGTTCTCTGCTTTACAGAA

Ptc1-1 5'-CCGGACCGGGACTATCTGCACC
Ptc1-2 5'-TTTGCCCTTCCCAGAAGCAGTC
Gli1-1 5'-GCTGGATATGATGGTTGGCAAGTG
Gli1-2 5'-GGTCCGATTCTGGTGCTGGCG

10. Anestesia con éter

1. Colocar al ratón de 5 días en un recipiente de vidrio utilizado para tinciones con un algodón grande impregnado con éter.
2. Mantenerlo en el recipiente hasta que deje de moverse y su respiración se acelere considerablemente.
3. Sacarlo y colocarlo durante 30 min en una caja con aserrín bajo una lámpara que de calor para que se recupere de la anestesia.
4. Regresarlo con el resto de la camada.

11. Anestesia con avertina 2.5 %

1. Inmovilizar al ratón de 6-7 semanas tomándolo por la nuca y tensar lo más posible el abdomen.
2. Inyectarlo intraperitonealmente, con una jeringa de insulina de 1 ml, 35-40 U de avertina 2.5 % (14-18 μ l por g de peso).
3. Regresarlo con el resto de la camada.

12. Inclusión en parafina

1. Recortar con unas tijeras de disección el rectángulo de piel dorsal o de oreja que abarque la zona de interés, con el eje más largo en sentido longitudinal al pelo (para orientación).

2. Colocar el pedazo en un rectángulo de papel Whatman 3M y jalar las orillas con unas pinzas forceps para aplanarlo.
3. Meter el tejido, con el papel, a un tubo de 15 ml y fijar en 2 ml de paraformaldehído 4 % por lo menos durante 2 hrs o toda la noche a 4°C. Si previamente se ha teñido para detectar actividad de β -galactosidasa, fijar por 4 hrs.
4. Lavar con 4 ml de agua haciendo 3 cambios de 45 min.
5. Colocar el tejido fijado en otro tubo de 15 ml y deshidratar con 2 ml de etanol 70 % (no se reutiliza) por 1 hr (se puede dejar durante varios días a 4 °C).
6. Cambiar por 2 ml de etanol 80 % (se puede reutilizar) por 1 hr.
7. Cambiar por 2 ml de etanol 96 % (se puede reutilizar) por 1 hr.
8. Cambiar por 2 ml de etanol 100 % 1 (se reutiliza) por 1 hr.
9. Cambiar por 2 ml de etanol 100 % 2 (se reutiliza) por 1 hr.
10. Colocar suficiente parafina en un horno Hybaid a temperatura de 58-60 °C para que se derrita.
11. Cambiar por 2 ml de xileno/etanol 100 % 1:1 (se reutiliza) por 1 hr.
12. Cambiar por 2 ml de xileno (se reutiliza) por 1 hr.
13. Colocar el tejido en un tubo de 1.5 ml con 1 ml de xileno/parafina 1:1 y meter al horno a 58-60 °C por 1 hr.
14. Cambiar el tejido a un tubo de 1.5 ml con 1 ml de xileno/parafina 1:2 y dejar en el horno a 58-60 °C por 1 ó 2 hrs.
15. Cambiar el tejido a un tubo de 1.5 ml con 1.3 ml de parafina pura y dejar en el horno a 58-60 °C (importante para que no se pierda la morfología del tejido) por lo menos 2 hrs o toda la noche (no más de 15 hrs).
16. Colocar el tejido en placas de metal con parafina nueva a 58-60 °C y sacar del horno.
17. Orientar el tejido, eliminar las burbujas con una aguja caliente, etiquetar y dejar que solidifique completamente la parafina a temperatura ambiente.
18. Desmoldar los bloques colocándolos por 2 min a 4 °C y montar las muestras en placas de plástico con ayuda del mechero.

13. Desparafinación

1. Colocar los portaobjetos con los cortes en una canastilla y meterlos a un recipiente de vidrio para tinciones en un horno Hybaid a 60 °C por 30 min para que escurra la parafina.
2. Limpiar el exceso de parafina.
3. Enfriar a temperatura ambiente.
4. Meter la canastilla con los portaobjetos en un recipiente de vidrio para tinciones con xileno 1 (se puede reutilizar) por 5 min (los portaobjetos deben quedar completamente sumergidos en el líquido).
5. Cambiar por xileno 2 (se puede reutilizar) por 5 min.
6. Cambiar por etanol 100 % 1 (se puede reutilizar) por 5 min.
7. Cambiar por etanol 100 % 2 (se puede reutilizar) por 5 min.
8. Cambiar por etanol 90 % (se puede reutilizar) por 3 min.
9. Cambiar por etanol 70 % (se puede reutilizar) por 3 min.
10. Cambiar por etanol 50 % (se puede reutilizar) por 3 min.
11. Continuar inmediatamente con la tinción.

14. Cortes en el criostato Leica CM1100

1. Colocar las muestras sobre hielo seco.
2. Cubrir con un compuesto para embeber tejidos en frío Bright Cryo-M-Bed.
3. Montar sobre una base de metal redonda y colocar en el criostato.
4. Realizar cortes de 10 μm .
5. Colocar los cortes sobre portaobjetos cubiertos con poli-D-lisina.
6. Colocar los portaobjetos en un recipiente de plástico para tinciones con agua de la llave por 5 min (los portaobjetos deben quedar completamente sumergidos en el líquido).
7. Colocar los portaobjetos sobre un papel absorbente y dejar que sequen a temperatura ambiente.

8. Colocar sobre cada portaobjetos 3 gotas de Entellan (resina) y montar el cubreobjetos, procurando que no queden burbujas.
9. Guardar a temperatura ambiente.

15. Cortes en el microtomo de rotación Leica RM2125RT

1. Colocar las muestras incluidas en parafina montadas en placas de plástico.
2. Realizar cortes sucesivos de 10 μm .
3. Tomar los cortes con un pincel de pestaña y colocarlos en un baño de flotación de agua destilada (con unas gotas de etanol 70 %) a 48-50 °C para que se estiren.
4. Con ayuda del pincel de pestaña, colocar los cortes en portaobjetos cubiertos con poli-D-lisina.
5. Colocar los portaobjetos en una plancha a 40 °C para que los cortes acaben de estirarse.
6. Guardar a temperatura ambiente.

16. Tinción para detectar actividad de β -galactosidasa (LacZ)

1. Recortar con unas tijeras de disección el rectángulo de piel dorsal o de oreja que abarque la zona de interés, con el eje más largo en sentido longitudinal al pelo (para orientación).
2. Colocar el pedazo en un rectángulo de papel Whatman 3M y jalar las orillas con unas pinzas forceps para aplanarlo.
3. Colocar el tejido en un tubo de 1.5 ml y fijar con 1 ml de solución de fijación recién preparada por 45 min a 4 °C (si es oreja, por 1 hr).
4. Lavar con 1.3 ml de PBS en agitación, haciendo 3 cambios de 30 min.
5. Colocar el tejido en un tubo de ensaye forrado de aluminio y teñir con 500 μl de solución de tinción (fotosensible) a 37 °C durante la noche ó hasta todo el fin de semana.

6. Colocar el tejido en tubos de 1.5 ml y lavar con 1.3 ml de PBS, haciendo 3 cambios de 1 hr a 4 °C.

17. Tinción con hematoxilina de Harris

1. Colocar los portaobjetos con los cortes desparafinados en un recipiente de plástico para tinciones con agua de la llave por 5 min (los portaobjetos deben quedar completamente sumergidos en el líquido).
2. Cambiar los portaobjetos a un recipiente de plástico para tinciones con hematoxilina de Harris (tíñe de azul ácidos nucleicos cargados negativamente) por 10 seg.
3. Cambiar los portaobjetos a un recipiente de plástico para tinciones con agua destilada por 10 min, haciendo varios cambios durante este tiempo.
4. Cambiar por agua de la llave por 10 min, haciendo varios cambios durante este tiempo.
5. Colocar los portaobjetos sobre un papel absorbente y dejar que sequen a temperatura ambiente.
6. Colocar sobre cada portaobjetos 3 gotas de Entellan (resina) y montar el cubreobjetos, procurando que no queden burbujas.
7. Guardar a temperatura ambiente.

18. Tinción con safranina

1. Colocar los portaobjetos con los cortes desparafinados en un recipiente de plástico para tinciones con agua destilada por 5 min (los portaobjetos deben quedar completamente sumergidos en el líquido).
2. Cambiar los portaobjetos a un recipiente de plástico para tinciones con hematoxilina de Weigert (tíñe de azul ácidos nucleicos cargados negativamente) por 7 min.
3. Cambiar los portaobjetos a un recipiente de plástico para tinciones con agua de la llave por 10 min, haciendo varios cambios durante este tiempo.

4. Cambiar por agua de la llave por 10 min, haciendo varios cambios durante este tiempo.
5. Cambiar los portaobjetos a un recipiente de plástico para tinciones con verde rápido 0.001 % por 3 min.
6. Cambiar los portaobjetos a un recipiente de plástico para tinciones con ácido acético 1 % por 10-15 seg (es importante no excederse en el tiempo)
7. Cambiar los portaobjetos a un recipiente de plástico para tinciones con safranina 0.1 % por 10 min.
8. Cambiar los portaobjetos a un recipiente de plástico para tinciones con etanol 96 % 1 (se puede reutilizar) por 2 min.
9. Cambiar por etanol 96 % 2 (se puede reutilizar) por 2 min.
10. Cambiar por etanol 100 % 1 (se puede reutilizar) por 2 min.
11. Cambiar por etanol 100 % 2 (se puede reutilizar) por 2 min
12. Cambiar por xileno 1 (se puede reutilizar) por 2 min.
13. Cambiar por xileno 1 (se puede reutilizar) por 2 min.
14. Colocar los portaobjetos sobre un papel absorbente y dejar que sequen a temperatura ambiente.
15. Colocar sobre cada portaobjetos 3 gotas de Entellan (resina) y montar el cubreobjetos, procurando que no queden burbujas.
16. Guardar a temperatura ambiente.

19. Fotos con cámara Photometrics CoolSNAP

1. Colocar los portaobjetos con las muestras teñidas bajo el microscopio Nikon EclipseTE300.
2. Ajustar la cámara Photometrics CoolSNAP al microscopio.
3. Ajustar el aumento del microscopio a 4x ó 10x.
4. Tomar la foto en campo claro.

20. Fotos con cámara Nikon Coolpix900

1. Colocar al ratón anestesiado bajo el microscopio Nikon SMZ-2T.
2. Ajustar la cámara Nikon Coolpix900 al microscopio.
3. Ajustar el zoom de la cámara al máximo.
4. Ajustar el aumento del microscopio a 1.5x.
5. Enfocar la oreja extendida del ratón.
6. Tomar la foto sin flash.

21. Soluciones

agarosa 2 % (30 ml)

agarosa	0.6 g
TAE 1x	30 ml
bromuro de etidio 10 mg/ml	1 μ l

avertina 100 % (10 ml)

2,2,2-tribromoetil alcohol	10 g
tertamil alcohol	10 ml

Diluir a 2.5% en PBS.

buffer de cola 10x (1 ml)

Tris HCl 1 M pH 8.0	100 μ l
KCl 1 M	500 μ l
Tween 20	100 μ l

Agregar 300 μ l de agua. Guardar a 4 °C hasta por varios meses.

D (50 ml)

tiocianato de guanidina	23.62 g
citrato de sodio 1 M	1.25 ml
sarcosil 10 %	2.5 ml

fijación (LacZ) (1 ml)

paraformaldehído 4 %	250 μ l
glutaraldehído 25 %	8 μ l
MgCl ₂ 1 M	2 μ l
Igepal CA-630 10 %	2 μ l
EGTA 0.5 M pH 8.0	10 μ l
PBS 1x	728 μ l

hematoxilina de Weigert (100 ml)

solución A:

hematoxilina	0.5 g
etanol 96 %	50 ml

solución B:

cloruro férrico	14.5 g
agua destilada	40 ml
HCl	0.5 ml

Aforar con agua destilada.

Mezclar 50 ml de la solución A y 50 ml de la solución B. Guardar a temperatura ambiente sólo por dos semanas.

medio LB (1 lt)

triptona	10 g
extracto de levadura	2.5 g
NaCl	5 g
NaOH 10 N	0.3 g

Tris 1M pH 8.0 10 ml

Ajustar el pH a 7.0, aforar con agua, y esterilizar. Para medio sólido agregar 15 g de bacto agar.

medio SOB (1 lt)

triptona 20 g

extracto de levadura 5 g

NaCl 0.5 g

KCl 250 mM 10 ml

MgCl₂ 10 mM 5 ml

Ajustar el pH a 7.0, aforar con agua y esterilizar.

P1 (50 ml)

Tris HCl 1 M pH 8.0 2.5 ml

EDTA 0.5 M pH 8.0 1 ml

Agregar 46.5 ml de agua.

P2 (50 ml)

NaOH 5 N 2 ml

SDS 10% 5 ml

Agregar 43 ml de agua.

P3 (100 ml)

acetato de potasio 3 M 29.44 gr

ácido acético glacial 30 % 11.5 ml

Ajustar el pH a 5.5, aforar con agua, almacenar a 4 °C.

paraformaldehído 4 % (100 ml)

paraformaldehído 4 g

agua a 60 °C 50 ml

NaOH 5 N	1 gota
PBS 10x	10 ml

Ajustar el pH a 7.4, aforar con agua y esterilizar por filtración (no autoclavar).

PBS 1x (1 lt)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Disolver en 4/5 del volumen total de agua, ajustar el pH a 7.4, aforar y esterilizar.

safranina 0.1 %

safranina	0.1 g
agua destilada	100 ml

Funciona mejor si se deja madurar

TAE 50x (1 lt)

Tris	242 g
ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 ml

Aforar con agua.

TE 1x (100 ml)

Tris Cl 1M pH 8.0	1 ml
EDTA 0.5M pH 8.0	200 µl

Aforar con agua.

tinción (LacZ) (1 ml)

ferro/ferricianuro de potasio 5 mM 50 X	20 µl
X-gal 20 mg/ml	50 µl
MgCl ₂ 1 M	2 µl

desoxicolato de sodio 10 %	1 μ l
Igepal CA-630 10 %	2 μ l
PBS 1x	925 μ l

Urea/LiCl (50 ml)

LiCl	6.35 g
agua	25 ml
Urea	18 g

Aforar con agua y filtrar por membrana de 0.22 μ m.

verde rápido 0.001 %

verde rápido	0.1 g
agua destilada	1 lt

Funciona mejor si se deja madurar.

Resultados

(los procedimientos experimentales se detallan en letra pequeña al final de cada subtítulo)

1. Sistemas de regeneración de la epidermis

La regeneración o la reparación de los tejidos epiteliales puede ser estudiada por medio de diferentes sistemas. Uno de estos sistemas es el de las heridas profundas en la piel hechas con un bisturí de manera transversal. Sin embargo, la experiencia previa del Laboratorio indica que este tipo de heridas no son las adecuadas para el análisis de la regeneración de la epidermis del ratón. Una herida profunda daña no sólo el epitelio, sino también la dermis, la hipodermis e incluso el músculo, por lo que todas las capas están sujetas al proceso y la posible influencia de la epidermis queda diluida debido a que sólo constituye una pequeña proporción de toda la estructura de la piel.

Dado el problema anterior, se buscaron sistemas alternativos que fueran más eficientes para el estudio de la regeneración del tejido epitelial. Por un lado, se optimizó la realización de una herida más superficial que afecta principalmente la epidermis y reduce los daños a las capas inferiores. Este tipo de herida (Figura 14a) se hace con unas tijeras, levantando con unas pinzas un pliegue de la piel del dorso del animal y cortando, de forma transversal, 2 mm de tejido. Por otro lado, debido a que en la oreja del ratón la proporción de la epidermis con respecto a la dermis aumenta considerablemente se implementó un sistema de perforaciones con "ponchaorejas". En estos casos, a cada oreja se le hace una sola perforación en el centro de 2 mm de diámetro (Figura 14b).



Figura 14. *Sistemas de regeneración de la epidermis de ratón.* (a) Herida superficial de 2 mm de largo, realizada con unas tijeras de disección, cortando de forma transversal a los 3 días. (b) Perforación de la oreja de 2 mm de diámetro, realizada con "ponchaorejas", después de 12 hrs.

Sistema de herida superficial en la piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y con las tijeras de disección se hizo un corte superficial en la zona pellizcada de forma transversal, sin atravesar todas las capas de la piel y con una longitud de 2 mm. Se tomó una foto de una herida, 3 días después de haber sido hecha, con la cámara Photometrics CoolSNAP, ajustada a un microscopio Leica MZ12, con un aumento de 1x.

Sistema de perforación de oreja. Cada ratón wt de 6-7 semanas se anestesió y con el "ponchaorejas" de 2 mm de diámetro se perforó una sola vez el centro de cada oreja, entre las dos venas principales. En los casos en que la perforación no fue completa, se cortó con las tijeras de disección el punto de unión del pedazo de piel cortado con el resto de la oreja. Se tomó una foto de una oreja 12 hrs después de haber sido hecha la perforación con la cámara Nikon Coolpix900.

2. Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis

Los dos sistemas de regeneración, tanto el de la herida superficial como el de las perforaciones de oreja, fueron implementados para la evaluación de este proceso en ratones TgbK6-E6/E7 y ratones wt, ambos con la misma cepa exocriada (CD-1). Los ratones TgbK6-E6/E7 fueron identificados por PCR específico para los oncogenes E6/E7 (Figura 15).



Figura 15. PCR específico para los oncogenes E6/E7. El PCR se realizó a partir de la extracción de ADN genómico de cola de ratón, utilizando los oligos 5'-E7 y E6/E7-3'. Las 8 bandas corresponden al amplificado esperado de 332 pares de bases (pb), indicando la presencia de ocho TgbK6-E6/E7 en una camada de quince ratones.

Las heridas superficiales se realizaron en el dorso de ratones anestesiados de 5 días de nacidos, los cuales se sacrificaron después de 3, 5 y 7 días, y las muestras obtenidas se procesaron para histología y se tiñeron con hematoxilina (Figura 16). Cabe mencionar que al momento de hacer la herida se aplicó AdLacZ 10^7 en la zona, sin embargo se considera

que esto no afectó el curso del experimento (ver más adelante). En este sistema, el efecto de los oncogenes E6/E7 en el proceso regenerativo de la epidermis se estableció indirectamente en función de las diferencias en la longitud en μm de la herida entre ratones TgbK6-E6/E7 y wt, en los tres distintos tiempos, es decir, en función de la velocidad a la que se regeneran los tejidos. La longitud se midió con base en el número de cortes longitudinales, con respecto al pelo, de $10 \mu\text{m}$ (ejemplificados en la Figura 16) obtenidos de toda la zona de la herida. Los promedios de las longitudes de las heridas y su desviación estándar se muestran en la Figura 17. Los datos indican que no hay una diferencia significativa entre la velocidad a la que se regenera la epidermis de los ratones transgénicos, en comparación a los ratones wt. Lo anterior también está apoyado por el hecho de que el análisis histológico no revela que haya un efecto de los oncogenes en la regeneración, que podría haberse manifestado como un aumento en la celularización de la epidermis (Figura 16).

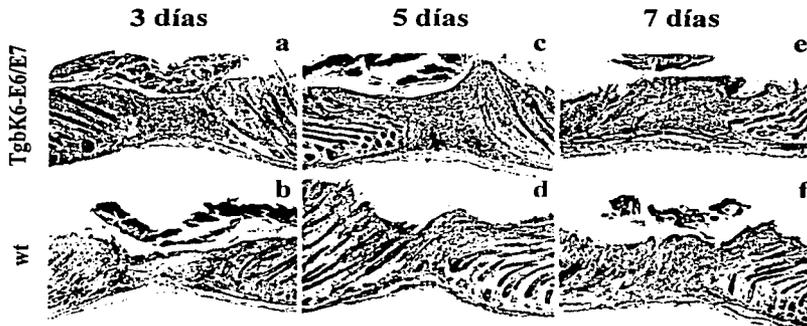


Figura 16. Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de piel dorsal. Corte transversal, teñido con hematoxilina de Harris, de la herida superficial realizada en la piel dorsal de un ratón TgbK6-E6/E7 (a) y un wt (b) a los 3 días; de un ratón TgbK6-E6/E7 (c) y un wt (d) a los 5 días; de un ratón TgbK6-E6/E7 (e) y un wt (f) a los 7 días. No se observa un aumento en la celularización de la epidermis, por lo que desde el punto de vista histológico, no se observa un efecto de los oncogenes en la regeneración.

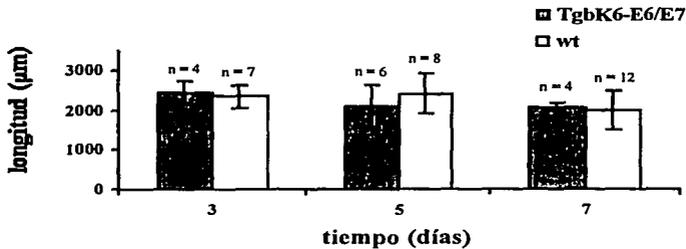


Figura 17. Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de piel dorsal. El efecto es medido en función de las diferencias en la longitud (μm) de las heridas superficiales a través del tiempo (3, 5 y 7 días), entre ratones TgbK6-E6/E7 y wt. Los datos indican que no hay un efecto significativo de los oncogenes sobre la velocidad de regeneración de la epidermis.

Las perforaciones de oreja se hicieron en ratones anestesiados de 6.5 a 7.2 semanas y se tomaron fotografías de las mismas zonas a los 7, 14, 21 y 28 días (Figura 18a y 18b), para observar la evolución del proceso regenerativo. En este sistema, el efecto de los oncogenes E6/E7 se evaluó tomando como referencia el progreso en el cerrado de la perforación en los ratones TgbK6-E6/E7 en comparación con los wt, analizando las frecuencias del diámetro en mm del orificio, a los 28 días. Cabe señalar que el diámetro a los 28 días es prácticamente el mismo que a los dos meses, por tanto no hay un avance en el cerrado posterior a la fecha de evaluación. El diámetro fue medido directamente superponiendo la foto de una reglilla y la foto de cada oreja, siendo que ambas se tomaron con un mismo aumento en el mismo microscopio y con la misma cámara fotográfica. El pico más alto de las frecuencias en ratones TgbK6-E6/E7 corresponde a un diámetro de 0 mm, en cambio el de los ratones wt es de 1.0 mm, observándose un desplazamiento de la curva de los ratones TgbK6-E6/E7 hacia un diámetro menor (Figura 19). Las Figuras 5a y 5b muestran, respectivamente, dos casos que ejemplifican los dos picos de frecuencia anteriores. Los datos indican que hay un efecto de los oncogenes en la regeneración de la epidermis.

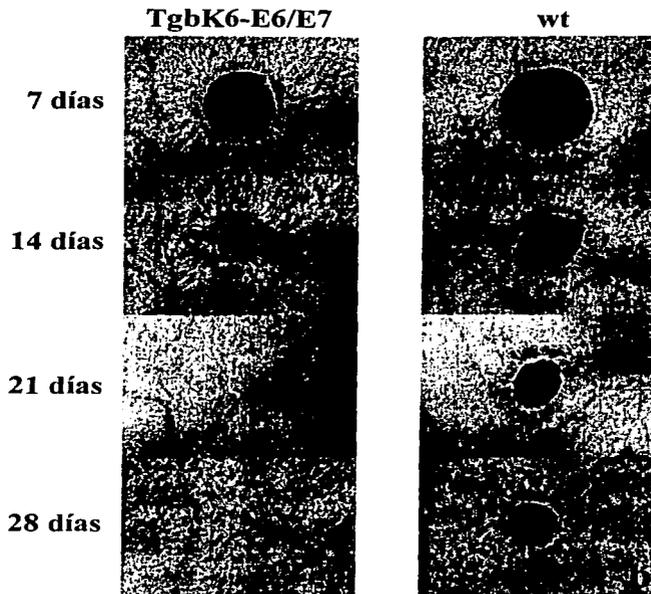


Figura 18. Efecto de los oncogenes *E6/E7* en regeneración de la epidermis de oreja. Imágenes de las zonas perforadas de la oreja de un ratón *TgbK6-E6/E7* (a) y un *wt* (b) a los 7, 14, 21 y 28 días. Se muestran casos que ejemplifican los dos picos de frecuencia mostrados en la Figura 19. Desde los 21 días la perforación de la oreja del ratón *TgbK6-E6/E7* se encuentra regenerada, a diferencia de la oreja del ratón *wt*. Se observa claramente un efecto de los oncogenes en la regeneración de la epidermis.

Sistema de heridas superficiales en la piel dorsal. Catorce ratones *TgbK6-E6/E7* y veintisiete ratones *wt* de 5 días se anestesiaron y a cada uno se le hizo una herida superficial como se describe anteriormente. Se sacrificaron por dislocación cervical cuatro ratones *TgbK6-E6/E7* y siete ratones *wt* a los 3 días, seis y ocho a los 5 días, y cuatro y doce a los 7 días. El tejido se fijó y se incluyó en parafina. Los cortes realizados en el microtomo se tificaron con hematoxilina de Harris. Se tomaron fotos con con la cámara Photometrics CoolSNAP. Las fotos se ordenaron haciendo una reconstrucción de la herida y se hizo un análisis histológico. Además se contabilizó el número de cortes que abarcaron la zona de la herida para saber la longitud en μm de cada una.

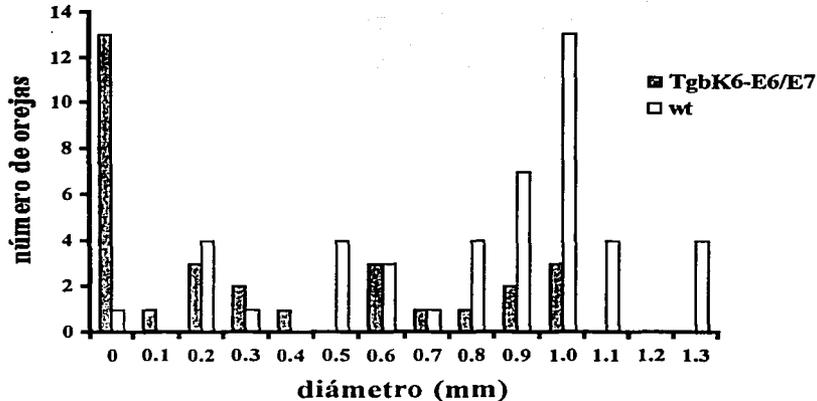


Figura 19. Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de oreja. Frecuencias del diámetro (mm) de la perforación de la oreja de ratones TgbK6-E6/E7 y ratones wt, 28 días después de haber sido realizado el orificio. Se aprecia el desplazamiento de la curva de los ratones TgbK6-E6/E7 hacia un diámetro menor, en comparación a los ratones wt. Los picos de frecuencia son de 0 mm y de 1.0 mm, respectivamente, ejemplificados en la Figura 18. Los datos indican que hay un efecto de los oncogenes en la regeneración de la epidermis.

Sistema de perforación de oreja. Quince ratones TgbK6-E6/E7 y veintitrés ratones wt de 6.5-7.2 semanas de nacidos se anestesiaron y se realizaron las perforaciones como se describe anteriormente. Cada oreja se fotografió con la cámara Nikon Coolpix900, a los 7, 14, 21 y 28 días. Las fotos se ordenaron haciendo un seguimiento de la oreja a lo largo del tiempo. Además se tomó una foto de una regla que se sobrepuso a las fotos de las orejas para medir el diámetro en mm del orificio de cada una.

3. Cooperación de Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis

Una vez analizados los efectos de E6/E7 en regeneración de la epidermis, se evaluó la cooperación entre el factor morfogénético Shh y los oncogenes durante el mismo proceso. Para ello, primero fue necesario implementar un método *in vivo* eficiente para modificar

genéticamente la epidermis, tanto de la región dorsal como de la oreja del ratón, para poder expresar Shh en la zona deseada y de tal forma que la acción del factor ocurriera por tiempo prolongado.

3.1. Métodos *in vivo* para modificar genéticamente la piel

Los métodos *in vivo* para modificar genéticamente la piel fueron esencialmente dos, la electroporación y la transfección con adenovirus. Inicialmente se intentó la electroporación de la piel dorsal, y específicamente de la epidermis, del ratón con tres plásmidos diferentes que se utilizaron como reporteros: el pQBI25 (GFP), el pCH110 (LacZ) y el p β Actina β -gal (LacZ). Durante el proceso se exploraron diferentes variables como la intensidad del voltaje, el número de pulsos aplicados, la duración del intervalo de tiempo entre la primera serie de pulsos y la segunda, así como la concentración del plásmido, el tamaño de los electrodos y la forma de colocarlos, además de la realización de heridas o inyecciones para facilitar el contacto del plásmido con las células de interés.

En una segunda etapa, se implementó la transfección *in vivo* de las células de la piel dorsal del ratón con AdLacZ como reportero. La optimización consistió en probar distintas formas de aplicar el virus para incrementar la transfección de las células, haciéndolo de manera tópica sobre piel depilada o no depilada, inyectándolo intradérmicamente, o colocándolo en zonas donde se hizo previamente una herida profunda o superficial, o donde se disectó un área del epitelio. Además se implementó la transfección de la piel de oreja en el sistema de perforación.

3.1.1. Electroporación

La eficiencia de la electroporación del plásmido pQBI25 en la piel del ratón no pudo ser analizada, independientemente de los parámetros y los electrodos utilizados. Lo anterior debido a que al observar en el microscopio con la lámpara de fluorescencia los cortes de las

zonas presuntamente electroporadas fue imposible distinguir las células positivas, ya que los queratinocitos autofluorescen.

En cambio, los experimentos realizados con el plásmido pCH110 demostraron que la electroporación *in vivo* de la epidermis del ratón es factible. La mayor eficiencia se obtuvo al dar dos pulsos de 30 V, de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entre sí y volviendo a dar cinco pulsos más, con los mismos parámetros, después de transcurrido 1 min. Se lograron resultados equiparables al usar, tanto los electrodos de aguja de 1 mm de diámetro y 5 mm de largo, como los de disco de 7 mm de diámetro. En el caso de los electrodos de aguja se hizo con un bisturí una herida transversal profunda en el dorso medio del ratón depilado con bisturí, se introdujo el electrodo positivo de tal forma que quedara por debajo de la dermis y el electrodo negativo se colocó de manera paralela al positivo pero por encima de la piel, y se bañó toda la zona de la herida con 8 μ g de plásmido antes de dar los pulsos correspondientes (Figura 20a). Por otro lado, en el caso de los electrodos de disco también se hizo una herida transversal profunda en la zona depilada, se aplicaron los 8 μ g de plásmido y se pellizó la zona entre los dos electrodos antes de dar los pulsos, ejerciéndose una leve presión sobre el pliegue de piel (Figura 20b). El análisis de los cortes longitudinales con respecto al pelo de las regiones electroporadas, teñidas 48 hrs después para detectar actividad de β -galactosidasa, indicó varias células positivas primordialmente en la costra de la herida y algunas en la epidermis (Figura 20e y 20f).

Así mismo se realizaron experimentos usando el plásmido p β Actina β -gal, que exporta la β -galactosidasa al núcleo, lo que permite observar y contabilizar con mayor claridad las células electroporadas. Los mejores resultados se obtuvieron repitiendo los ensayos con los electrodos de disco, pero dando ahora diez pulsos seguidos de 30 V, de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entre sí, después de haber aplicado 10 μ g de plásmido en una herida profunda, realizada en la zona dorsal media del animal previamente depilada con diurex (Figura 20b). Sin embargo, en los cortes se encontraron ciertas células electroporadas únicamente en la región de la herida y en la dermis (Figura 20g y 20h). Además, utilizando estos mismos electrodos y los mismos parámetros, a excepción del voltaje que disminuyó a 25 V, se realizaron varias heridas pequeñas poco profundas (entre cinco y siete) en la región dorsal depilada con diurex, que fue bañada con 10 μ g de plásmido y pellizcada entre los discos antes de dar los diez pulsos seguidos (Figura 20c).

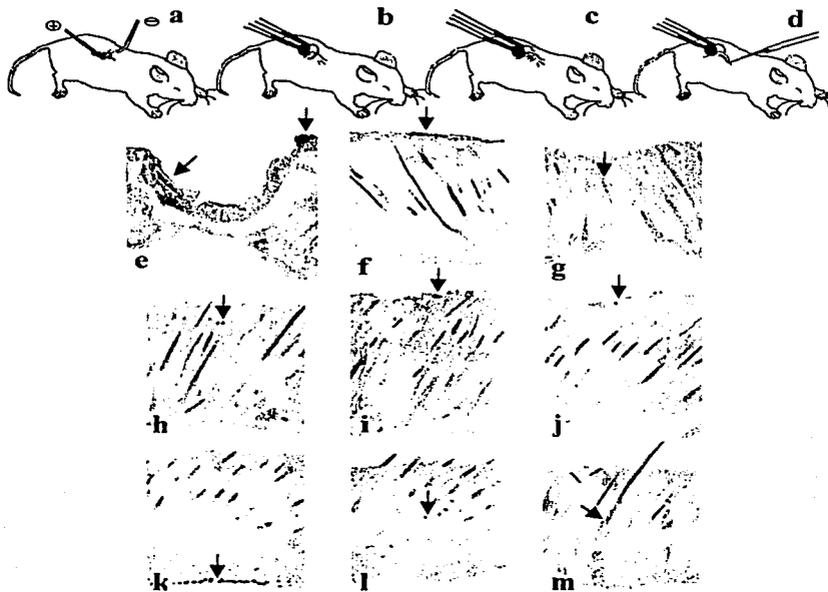


Figura 20. Electroporación in vivo de la piel dorsal. Al utilizar los electrodos de aguja (a) y los electrodos de disco haciendo una herida profunda (b), dando dos pulsos de 30 V, de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entré sí, volviendo a dar cinco pulsos más después de transcurrido 1 min, se logró la electroporación de células en la costra de la herida (e) y en la epidermis (f). Con los electrodos de disco y haciendo una herida profunda (b), dando diez pulsos seguidos, se electroporaron algunas de la región de la herida (g) y de la dermis (h). Con los electrodos de disco y haciendo heridas pequeñas poco profundas (c), dando diez pulsos seguidos de 25 V, se encontraron células positivas en la región de la epidermis (i y j). Con los electrodos de disco y haciendo una inyección, dando diez pulsos seguidos de 25 y 30 V, se detectaron células electroporadas en el músculo (k), la dermis (l) y cerca de los folículos (m). En (a) y (b) se electroporó el plásmido pCH110 y en (c) a (m) el plásmido p β Actina β -gal, ambos a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se observa que la electroporación de piel es factible, pero la eficiencia en epidermis es muy baja.

En este caso, se logró electroporar principalmente un reducido número de células de la epidermis (Figura 20i y 20j). Por último, se realizaron inyecciones intradérmicas de $10\mu\text{g}$ de plásmido, al que se le agregó una gota de colorante para visualizar claramente la parte

inyectada del dorso. La inyección se realizó bajo el microscopio estereoscópico, con la punta adelgazada de una pipeta pasteur introducida en un canal hecho anticipadamente con la aguja de una jeringa de 1 ml. Posteriormente, la zona azul se pellizó entre los electrodos de disco, a los que se untó con un gel conductor para electrocardiogramas, y se obtuvieron resultados positivos dando diez pulsos seguidos tanto de 25 como de 30 V, de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entre sí (Figura 20d). En los cortes realizados se detectaron muchas células electroporadas en el músculo, algunas en la dermis y otras cerca de los folículos, pero no en la epidermis (Figura 20k, 20l y 20m).

Aún cuando se logró electroporar la epidermis, la eficiencia del método no alcanzó los niveles requeridos, principalmente en relación con el número de células modificadas. Además, los resultados fueron poco reproducibles. Por tanto, se descartó la electroporación como un método óptimo para alterar genéticamente la piel.

Electrodos de aguja en piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y con un bisturí se hizo una herida transversal a la altura de las patas delanteras, profunda (atravesando todas las capas de la piel) y con una longitud de 5 mm. La zona se depiló previamente con diurex para levantar el estrato córneo. El electrodo de aguja (de 1 mm de diámetro y 5 mm de largo) positivo se introdujo a través de la herida y se colocó por debajo de la dermis. El electrodo negativo se colocó de manera paralela al positivo, pero por encima de la epidermis. Toda la zona se bañó con 8 μ g de pQBI23 ó pCH110. Los electrodos se conectaron previamente al electroporador BTX ECM 830 que se programó para generar dos pulsos de 30 V, de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entre sí. Después de dar los dos pulsos en el ratón, se esperó 1 min y se dieron cinco pulsos más con los mismos parámetros. Cada ratón se sacrificó por dislocación cervical a las 48 hrs. Las muestras electroporadas con pQBI25 se cortaron en el criostato y se observaron en un microscopio Nikon EclipseTE300 con un aumento 10x bajo la iluminación de una lámpara de fluorescencia Nikon. No se tomaron fotos. Las muestras electroporadas con pCH110 se tñieron para detectar actividad de β -galactosidasa y se cortaron, de manera longitudinal con respecto al pelo, en el criostato. Se tomaron fotos de los cortes en la cámara Photometrics CoolSNAP. Se analizó el número y la localización de células azules en el tejido.

Electrodos de disco y herida profunda en piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y con un bisturí se hizo una herida profunda como se describe anteriormente. La zona se bañó con 8 μ g de pCH110 ó 10 μ g de p β Actina β -gal y se pellizó entre los dos electrodos de disco de 7 mm de diámetro, ejerciéndose una leve presión sobre el pliegue de la piel. Los electrodos se conectaron previamente al electroporador BTX ECM 830 que, en los casos con pCH110, se programó para generar dos pulsos de 30 V, de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entre sí. Después de dar los dos pulsos en el ratón, se esperó 1 min y se dieron cinco pulsos más con los mismos parámetros. En los casos con p β Actina β -gal se generaron únicamente 10

pulsos seguidos con los mismos parámetros. Cada muestra se procesó y analizó como se menciona anteriormente.

Electrodos de disco y heridas pequeñas poco profundas en piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y con un bisturí se hicieron entre cinco y siete heridas pequeñas poco profundas, transversales, a la altura de las patas delanteras y con una longitud de 1-2 mm. La región se depiló previamente con diurex. La zona se bañó con 10 µg de pβActinaβ-gal y se pellizcó entre los dos electrodos de disco de 7 mm de diámetro, ejerciéndose una leve presión sobre el pliegue de la piel. Los electrodos se conectaron previamente al electroporador BTX ECM 830 que se programó para generar 10 pulsos de 25 V, de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entre sí. Cada muestra se procesó y se analizó como se menciona anteriormente.

Electrodos de disco e inyección en piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y se agregó una gota de colorante bromofenol Blue a 10 µg de pβActinaβ-gal. Bajo el microscopio estereoscópico Zeiss Stemi DV4, con unas pinzas forceps se pellizcó, de forma longitudinal la piel de la zona dorsal a la altura de las patas delanteras. Se introdujo lo más superficialmente posible una aguja de jeringa de insulina de 1 ml. Se tomó el plásmido con la punta de una pipeta pasteur adelgazada, que se metió a través del canal hecho con la jeringa. El líquido se depositó soplando por una manguera de hule conectada a la pipeta. La zona azul se pellizcó entre los dos electrodos de disco de 7 mm de diámetro, untados con un gel conductor para electrocardiogramas de Farmacéuticos Altamirano, ejerciéndose una leve presión sobre el pliegue de la piel. Los electrodos se conectaron previamente al electroporador BTX ECM 830 que se programó para generar 10 pulsos de 25 V, de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entre sí. Cada muestra se procesó y se analizó como se menciona anteriormente.

3.1.2. Transfección con adenovirus

La baja eficiencia y reproducibilidad del método de electroporación originaron que alternativamente se comenzara a implementar la transfección *in vivo* de las células de la piel del ratón. Las pruebas se realizaron con el AdLacZ 10⁹. Los primeros ensayos se hicieron aplicando 5 µl de AdLacZ directamente de manera tópica sobre la zona del dorso medio, que fue depilada previamente con diurex. Al realizar la tinción para detectar actividad de β-galactosidasa de las regiones presuntamente transfectadas, a las 24 hrs, 2 y 3 días se localizó una señal positiva prácticamente a todo lo largo del estrato córneo o las escamas que están a punto de desprenderse del epitelio (Figura 21a, 21b y 21c). Sin embargo, a los 5 días ya no hubo señal, a excepción de unas cuantas células en el músculo (Figura 21d). Cuando el adenovirus se aplicó tópicamente sobre el dorso sin haberlo

depilado antes, no se apreció ninguna célula positiva después de la tinción a los 3 días (Figura 21e).

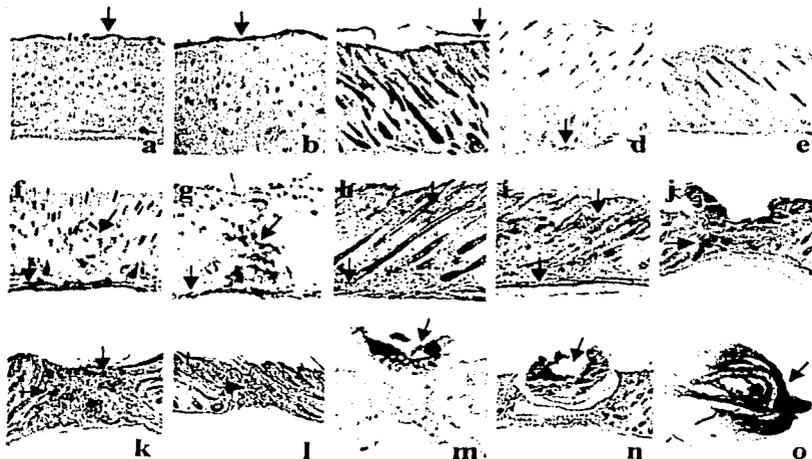


Figura 21. Transfección in vivo con adenovirus de la piel dorsal y la oreja. Al aplicar 5 μ l de AdLacZ de manera tópica sobre una zona previamente depilada del dorso del ratón, se detectaron células transfectadas en el estrato córneo o las escamas a las 24 hrs (a) y a los 2 (b) y 3 días (c). A los 5 días sólo se encontraron ocasionalmente células positivas en el músculo (d). Cuando el virus se aplicó forma tópica sobre una zona no depilada, a los 3 días no se encontró ninguna célula positiva (e). Al inyectar 5-6 μ l de AdLacZ, se encontraron muchas células azules en el músculo y en la dermis a las 24 hrs (f), y a los 2 (g), 3 (h) y 5 días (i). La aplicación de 1.5-2 μ l de virus en heridas superficiales con reaplicación a los 20 min, resultó en la transfección de la epidermis, la dermis, las células migrantes y el músculo a los 3 (j), 5 (k) y 7 días (l). Cuando el virus (4 μ l) se aplicó en la región de donde se disectó un cuadrado de piel (m) o donde se hizo un orificio circular con el "ponchaorejas" (n), las células positivas se detectaron en la costra a los 2 y 3 días respectivamente. Al aplicar 5 μ l del adenovirus en el orificio de la oreja del ratón se observaron células transfectadas en la epidermis a lo largo de toda la orilla de la perforación a las 24 hrs (o). Los datos indican que en el caso de la piel dorsal, la aplicación del virus en la herida superficial es la forma más eficiente y duradera de transfectar las células de la epidermis; y en el caso de la oreja es la aplicación directa en el orificio perforado.

Por otro lado, se hicieron pruebas inyectando 5-6 μ l de AdLacZ de la misma forma como se hizo la inyección del plásmido β Actina β -gal para la electroporación. Los cortes del tejido teñido a las 24 hrs, 2, 3 y 5 días mostraron muchas células azules únicamente en el músculo y en la dermis principalmente a lo largo del canal que se formó con la aguja de la jeringa y que fue rellenado con el adenovirus (Figura 21f, 21g, 21h y 21i).

Además, se exploró la eficiencia de transfección al aplicar el AdLacZ en una herida superficial en el dorso del ratón. La herida se hizo sujetando y levantando con unas pinzas la zona dorsal, y cortando superficialmente con unas tijeras de manera transversal. La zona fue cubierta con 1.5-2 μ l de adenovirus y éste se reaplicó una sola vez a los 20 min. Después de 3, 5 y 7 días se analizaron los cortes del epitelio. Toda la región en reparación presentó señal positiva, incluyendo la costra, la epidermis, la dermis, las células migrantes y el músculo (Figura 21j, 21k y 21l).

Finalmente, también se transfectaron zonas donde se disectó un área de la piel. En unos casos se recortaron con tijeras cuadrados de tejido de 1.5 x 1.5 mm del dorso y se aplicaron 4 μ l de AdLacZ, y en otros se utilizó un "ponchaorejas" para hacer un orificio circular en la piel dorsal de menos de 2 mm de diámetro que se bañó con 1.5 μ l de virus. Al analizar los primeros a los 2 días, y los segundos a los 3, no se encontraron prácticamente células azules más que en la costra (Figura 21m y 21n).

Por otro lado, también se logró transfectar *in vivo* las células de la piel de la oreja del ratón. Lo anterior, perforando cada oreja en el centro con el "ponchaorejas" de 2 mm y colocando de forma tópica 5 μ l de AdLacZ en el orificio, donde se forma una capa de líquido que rellena completamente el área vacía. Los cortes longitudinales respecto al pelo de las zonas transfectadas mostraron bastantes células positivas en la epidermis a lo largo de toda la orilla de la perforación (Figura 21o).

En consecuencia con los resultados anteriores, se eligió el método de la transfección *in vivo* con adenovirus para alterar genéticamente la piel, debido a la eficiencia en relación con el número, la localización y la permanencia de células modificadas. Más específicamente, se optó por la aplicación del virus en la zona de una herida superficial en el caso de la piel dorsal, y por la aplicación directa en el orificio perforado en el caso de las orejas del ratón.

Tópico en piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y la zona del dorso, a la altura de las patas delanteras, se depiló con diurex. Se aplicaron 5 μ l de AdLacZ 10^9 de manera tópica sobre la región depilada. El ratón se vigiló durante 20 min para que no se volteara. Cada ratón se sacrificó por dislocación cervical a las 24 hrs, 2, 3 ó 5 días. El tejido se tiñó para detectar actividad de β -galactosidasa. Las muestras de 24 hrs, 2 y 5 días se cortaron en el criostato. Las muestras de 3 días se incluyeron en parafina. Los cortes, longitudinales con respecto al pelo, realizados en el microtomo se tiñeron con hematoxilina de Harris. Se

tomaron fotos con la cámara Photometrics CoolSNAP. Se analizó el número y la localización de células azules en el tejido. El ratón cuyo dorso no fue depilado previamente a la aplicación del AdLacZ, se sacrificó a los 3 días y la muestra se procesó igual que las muestras cortadas en el criostato.

Inyección en piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y se agregó una gota de colorante bromofenol Blue a 5-6 μ l de AdLacZ 10^9 . . Bajo el microscopio estereoscópico Zeiss Stemi DV4, con unas pinzas forceps se pellizcó, de forma transversal, la piel de la zona dorsal a la altura de las patas delanteras. Se introdujo lo más superficialmente posible una aguja de jeringa de insulina de 1 ml. Se tomó el virus con la punta de una pipeta pasteur adelgazada, que se metió a través del canal hecho con la jeringa. El líquido se depositó soplando por una manguera de hule conectada a la pipeta. Cada ratón se sacrificó por dislocación cervical a las 24 hrs, 2, 3 ó 5 días. Las muestras de 24 hrs y 2 días se procesaron y analizaron igual que aquellas cortadas en el criostato deescritas anteriormente. Las muestras de 3 y 5 días se procesaron y se analizaron igual que las cortadas en el microtomo descritas anteriormente.

Herida superficial en piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y se realizó una herida superficial con unas tijeras como se describe anteriormente. La zona se depiló previamente con diurex. Se aplicaron 1.5-2 μ l de AdLacZ 10^9 directamente sobre la región de la herida. El ratón se vigiló durante 20 min para que no se volteara. Después de este tiempo se volvió a aplicar 1.5-2 μ l de AdLacZ directamente sobre la zona. Cada ratón se sacrificó por dislocación cervical a las 3, 5 ó 7 días. Las muestras se procesaron y se analizaron igual que las cortadas en el microtomo descritas anteriormente.

Diseción de un área de piel dorsal. Cada ratón wt de 5 días se anestesió y la zona del dorso, a la altura de las patas delanteras, se depiló con diurex. Se disectó un área de piel. En algunos casos, con el bisturí se cortó un cuadrado profundo de 1.5 x 1.5 mm, se extrajo el pedazo y el lugar del daño se cubrió con 4 μ l de AdLacZ 10^9 . Cada ratón se sacrificó por dislocación cervical a los 2 días. Las muestras se procesaron y se analizaron igual que las cortadas en el criostato descritas anteriormente. En otros casos, se utilizó un "ponchaorejas" para hacer un orificio circular en la piel dorsal de menos de 2 mm de diámetro que se bañó con 1.5 μ l de AdLacZ. Cada ratón se sacrificó por dislocación cervical a los 3 días. Las muestras se procesaron y analizaron igual que las cortadas en el microtomo descritas anteriormente.

Tópico en piel de oreja. Cada ratón de 6-7 semanas se anestesió y se le realizaron perforaciones como se describe anteriormente. A cada oreja de cada ratón se le aplicó 5 μ l de AdLacZ 10^9 en el orificio, donde se forma una capa de líquido que rellena completamente el área vacía. Cada ratón se sacrificó por dislocación cervical a las 24 hrs. Las muestras se procesaron y analizaron igual que las cortadas en el criostato descritas anteriormente.

3.2. Evaluación de la cooperación

Al optar por el método de transfección *in vivo* con adenovirus para modificar las células de la epidermis, se utilizó el AdShh para introducir Shh en la región dorsal y la oreja de los ratones. La cooperación con los oncogenes E6/E7 se evaluó en ratones TgbK6-E6/E7, en comparación a ratones wt.

En el caso de la piel dorsal, se realizaron las heridas superficiales en ratones anestesiados de 5 días de nacidos, las cuales se cubrieron con 1.5-2 μ l AdShh 10^9 y AdLacZ 10^7 en una proporción 1:1. Lo anterior para poder inferir la posible localización de las células transfectadas con Shh, a partir de las células azules identificadas después de una tinción para detectar actividad de β -galactosidasa. Las heridas se retransfectaron una sola vez 20 min después de la primera aplicación del virus. Los ratones se sacrificaron a los 3, 5 y 7 días, y las muestras obtenidas fueron procesadas para histología y se tiñeron con hematoxilina. Debido a la ambigüedad del análisis histológico, la evaluación de la cooperación de Shh con los oncogenes E6/E7 en el proceso regenerativo de la epidermis se estableció indirectamente en función de las diferencias en la longitud en μ m de la herida entre ratones TgbK6-E6/E7 y wt, en los tres distintos tiempos, es decir, en función de la velocidad a la que se regeneran los tejidos. Los promedios de las longitudes de las heridas y su desviación estándar se muestran en la Figura 22. Los datos indican que no hay una diferencia significativa entre la velocidad a la que se regenera la epidermis modificada con Shh de los ratones transgénicos, en comparación a los ratones wt. La evaluación de la respuesta de las células localizadas en la zona de la herida a Shh se realizó en los ratones wt por medio de RT-PCR. La amplificación de Ptc1 y Gli1 parece indicar que la vía de señalización de Shh se está activando en las células transfectadas con el AdShh (Figura 23).

Las perforaciones de oreja se hicieron en ratones anestesiados de 6.3 a 7.4 semanas. En cada ratón, la oreja izquierda se transfectó con 5 μ l de AdShh 10^9 y la derecha con AdLacZ 10^7 a manera de control. El virus se reaplicó cada tres días, es decir dos días no y uno sí. Se tomaron fotografías de las mismas zonas a los 7, 14, 21 y 28 días para ver la evolución del proceso regenerativo. La cooperación de Shh con los oncogenes E6/E7 en la regeneración de la epidermis se evaluó tomando como referencia la aceleración del cerrado de la perforación de la oreja modificada con Shh en los ratones TgbK6-E6/E7, en

comparación con los wt. En el 56% de las orejas de los ratones TgbK6-E6/E7 se observó una aceleración en el cerrado del orificio tratado con Shh, en comparación a aquel tratado con LacZ (Figura 24a y 24e). Lo anterior ocurrió únicamente en un 11% de los ratones wt (Figura 24c y 24e). En cada caso, los porcentajes restantes corresponden a las orejas donde no se observó aceleración en el cerrado de las perforaciones tratadas con Shh (Figura 24b y 24d). En la Figura 24a, se muestran dos casos donde aún con la diferencia en la velocidad de la repitelización se observa la aceleración en el cerrado del orificio transfectado con AdShh. Dado lo anterior, existe evidencia que indica que existe una cooperación de Shh con E6/E7 en la regeneración de la oreja.

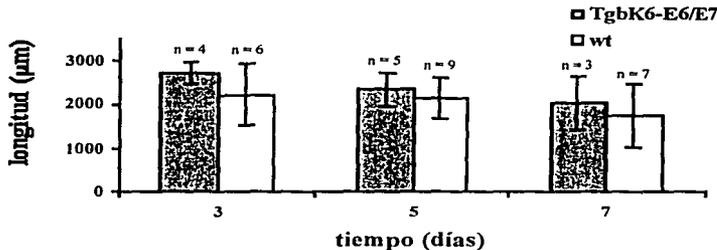


Figura 22. Evaluación de la cooperación de Shh y los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis de piel dorsal. La cooperación es medida indirectamente en función de las diferencias en la longitud (μm) de las heridas superficiales a través del tiempo (3, 5 y 7 días), entre ratones TgbK6-E6/E7 y wt. Los datos indican que no hay una diferencia significativa entre la velocidad a la que se regenera la epidermis modificada con Shh de los ratones TgbK6-E6/E7, en comparación con los wt.

Transfección con AdShh de heridas superficiales en piel dorsal. Doce ratones TgbK6-E6/E7 y veintidós ratones wt de 5 días se anestesiaron y a cada uno se le realizó una herida superficial como se describe anteriormente. A cada herida se le aplicó 1.5-2 μl de AdShh/AdLacZ 1:1, con un título de 10^9 y 10^7 respectivamente, de forma directa sobre la región de la herida. Después de 20 min se volvió a aplicar AdShh/AdLacZ. Posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical cuatro ratones TgbK6-E6/E7 y seis ratones wt a los 3 días, cinco y nueve a los 5 días, y tres y siete a los 7 días. Se tiñó para detectar actividad de β -galactosidasa y se incluyó en parafina. Los cortes, longitudinales con respecto al pelo, realizados en el microtomo, se tiñeron con hematoxilina de Harris. Se tomaron fotos con la cámara Photometrics CoolsNAP.

Las fotos se ordenaron haciendo una reconstrucción de la herida y se hizo un análisis histológico. Además se contabilizó el número de cortes que abarcaron la zona de la herida para saber la longitud en μm de cada una.

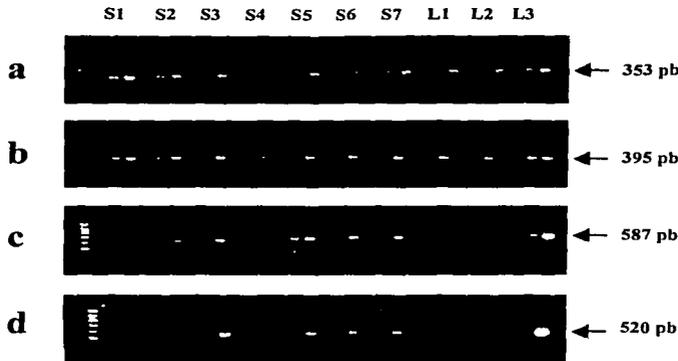


Figura 23. Evaluación de la respuesta celular a *Shh* por medio de RT-PCR en piel dorsal. Expresión de HPRT (a), *Shh* (b), *Ptc1* (c) y *Gli1* (d) en células de la zona de la herida superficial de ratones wt, infectados 3 días antes con AdShh (S1-S7) y con AdLacZ (L1-L3) a manera de control. En (a), después de una amplificación durante 25, 30 y 35 ciclos, se aprecian las bandas esperadas de 353 pares de bases (pb) que indican que las muestras son relativamente homogéneas, a excepción de S4. En (b) se distingue la expresión de *Shh* tanto en células transfectadas con *Shh* como en el control (bandas de 395 pb). En cambio, la expresión de *Ptc1* (c) y *Gli1* (d) está presente prácticamente sólo en el tejido infectado con AdShh (bandas de 587 y 520 pb respectivamente), indicando la activación de la vía de señalización de *Shh* en estas células. (b), (c) y (d) fueron amplificadas durante 30, 35 y 40 ciclos. S1, S2 y S3 se realizaron en un mismo ratón, S4 pertenece a un ratón distinto, S5, S6 y S7 son de un tercer ratón, lo cual ejemplifica la variabilidad existente entre heridas de un mismo ratón y entre ratones en cuanto a la expresión de los transcritos. En (b), (c) y (d) los dos últimos pozos presentan los controles + y -.

Transfección con AdShh de heridas superficiales en piel dorsal para realizar RT-PCR específico para HPRT, *Shh*, *Ptc1* y *Gli1*. Cuatro ratones wt de 5 días se anestesiaron con éter y a cada uno se le hicieron tres heridas superficiales como se describe anteriormente. A tres ratones se les aplicó en cada herida 1.5-2 μl de AdShh/AdLacZ 1:1, con un título de 10^9 y 10^7 respectivamente. A un ratón se le aplicó en cada herida 1.5-2 μl de AdLacZ 10^7 como control. Después de 20 min se volvió a aplicar el adenovirus. Posteriormente cada ratón se sacrificó por dislocación cervical a los 3 días. Se recortó con unas tijeras de disección la herida, abarcándola con mucha precisión y procurando tomar la menor cantidad posible de tejido adyacente. El tejido se homogenizó y se extrajo ARN, del cual se obtuvo cADN y se realizó un RT-PCR específico para HPRT. Una vez estandarizadas las muestras se realizó RT-PCR específico para *Shh*, *Ptc1* y *Gli1*.

Transfección con AdShh de orejas perforadas. Nueve ratones TgbK6-E6/E7 y nueve ratones wt de 6.3-7.4 semanas se anestesiaron y se realizaron las perforaciones como se describe anteriormente. En cada ratón, la oreja izquierda se transfectó aplicando 5 μl de AdShh 10^9 en el orificio, donde se forma una capa de

4. Cooperación de Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 en regeneración del cartílago

La rápida regeneración de la epidermis de las orejas de los ratones transgénicos hizo que se considerara la evaluación de la regeneración del cartílago en dichas muestras. De tal forma, que los ratones de las orejas perforadas y regeneradas se sacrificaron después de 5.5 semanas de haberse hecho el orificio, se prepararon para histología y se tñeron con safranina, que es un marcador de cartílago. La evaluación de la cooperación de Shh y E6/E7 se estableció en función de la presencia y el avance de la regeneración del cartílago en los ratones TgbK6-E/E7, en comparación con los ratones wt. Los datos mostraron que en aquellas orejas que aún presentaban un orificio, independientemente de si pertenecían a los reducidos casos de orejas transgénicas no cerradas o a los ratones wt, los condrocitos se mantuvieron proliferando en las regiones cercanas al límite del daño original (Figura 25a). En dichas orejas, los extremos de la epidermis en proliferación se encontraban claramente engrosados (Figura 25b). Sin embargo, las orejas totalmente regeneradas de los ratones TgbK6-E6/E7 y las regiones medianamente regeneradas de los ratones wt, donde se observó un epitelio continuo, presentaron islas de condrocitos entre el mesénquima recién formado (Figura 25c). Estos datos indican que más que haya una cooperación directa entre los oncogenes y Shh en la regeneración del cartílago, la completa regeneración de la epidermis y su aceleración cuando se expresan los oncogenes y Shh parece estar promoviendo la condrogénesis .

Detección de cartílago en orejas perforadas. Diez orejas de ratones TgbK6-E6/E7 y cuatro de ratones wt, cuyas perforaciones fueron infectadas con AdShh y con AdLacZ cuando los ratones tenían 6-7 semanas como se describe anteriormente, se cortaron con unas tijeras de disección 33-35 días después, sacrificando previamente a los ratones por dislocación cervical. Cada pedazo de oreja se incluyó en parafina y se cortó en el microtomo. Los cortes se tñeron con safranina. Se tomaron fotos con la cámara Photometrics CoolSNAP. Se analizó la presencia de cartílago que tñe de rojo.

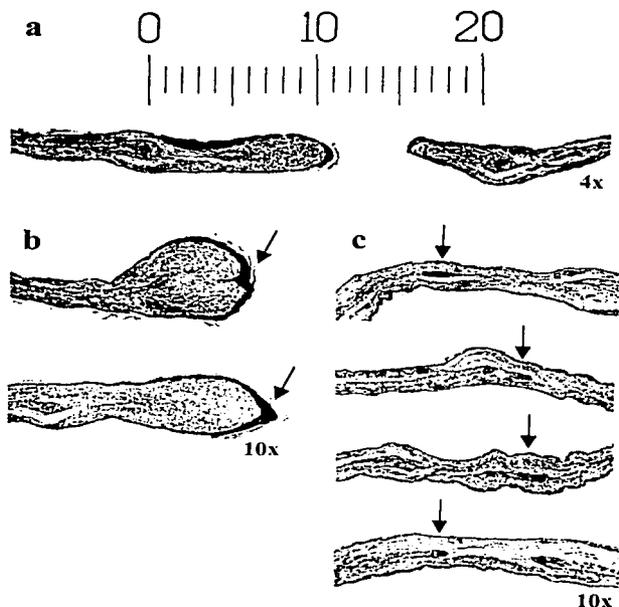


Figura 25. Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración del cartilago. Cortes histológicos teñidos con safranina de piel de oreja, de la zona donde 5.5 semanas antes se hizo la perforación de 2 mm. En (a) se muestra la regeneración de la epidermis, que ha avanzado alrededor de 1.5 mm, mientras que los condrocitos se mantienen proliferando únicamente en las regiones cercanas al límite del daño original. En (b) se aprecia un acercamiento de dos ejemplos del engrosamiento de los extremos del epitelio en proliferación. En (c) se muestran cuatro ejemplos de islas de cartilago que se originan entre el mesénquima recién formado, en orejas ya regeneradas que presentan un epitelio continuo. Tanto el ratón TgbK6-E6-E7 como el wt presentan estas características.

Discusión

1. Sistemas de regeneración de la epidermis

La elección de un sistema de regeneración del tejido epitelial fue un punto crítico para poder estudiar de manera eficiente el proceso en la piel del ratón. En contraposición a las heridas profundas, que resultaban inadecuadas según la experiencia previa del Laboratorio, la realización de heridas superficiales en la piel dorsal del ratón daña en menor proporción las estructuras que se encuentran por debajo de la epidermis y por tanto es más precisa para evaluar lo que ocurre específicamente en la capa más superficial. Sin embargo la desventaja principal de este sistema fue que, debido a que las heridas se realizaron a pulso con unas tijeras, hubo variabilidad en cuanto a la profundidad y la longitud del corte, aún cuando se procuró que fueran los más parecidos posible entre sí. Así mismo, las heridas presentaron variabilidad en cuanto a forma, ya que algunas fueron más anchas que otras, lo cual pudo haber influido en la forma en se regeneraron, sin que la longitud fuera necesariamente un indicio del avance del proceso. Además, como los ratones con los que se experimentó fueron de 4-5 días, la presencia de la herida hizo que frecuentemente uno o dos animales de cada camada fueran canibalizados por la madre, lo que disminuyó el número de muestras disponibles para el análisis. Por otro lado, el sistema de la perforación de la oreja ofrece ventajas para estudiar la regeneración de la epidermis. En primera, se puede estudiar aún con mayor precisión la epidermis dado el aumento de la proporción de ésta con respecto a la dermis, en comparación con la piel dorsal. En segunda, la realización del orificio es más sencilla y rápida que las heridas en la piel dorsal. Pero lo más importante es que es mucho más homogénea, debido a que el "ponchaorejas" tiene un diámetro de 2 mm, y por tanto, la perforación siempre resulta igual en tamaño. Aún así, hubo perforaciones que presentaron pequeñas irregularidades que pudieron deberse a que el "ponchaorejas" no perforó totalmente la circunferencia y que el tejido fue rasgado cuando se retiró el pedazo de oreja que ocupaba el espacio del orificio. En general la supervivencia de los ratones, que fueron anestesiados para poder hacer la perforación con toda precisión en el centro de la oreja, fue muy buena ya que, fuera de casos excepcionales, la mayoría de los ratones se mantuvieron con vida a lo largo del experimento.

En consecuencia, aún cuando se eligieron dos sistemas para el estudio de la regeneración de la epidermis, las perforaciones de oreja tienen algunas ventajas sobre las heridas superficiales de piel dorsal. Principalmente, la variabilidad entre los orificios realizados es mucho menor que entre las heridas y el número de muestras es constante a lo largo del tiempo de experimentación.

2. Efecto de los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis

La evaluación del efecto de los oncogenes E6/E7 en el proceso regenerativo de la epidermis fue diferente en cada uno de los dos sistemas implementados. En el caso de las heridas superficiales, primeramente se realizó un análisis histológico, donde en una reconstrucción de la herida a través de cortes seriados se esperaba observar una mayor celularización de la epidermis en los ratones TgbK6-E6/E7 a diferencia de los ratones wt, como un indicativo de un incremento en la proliferación. Sin embargo, ni a los 3, ni a los 5, ni a los 7 días de haber sido realizada la herida, se observó claramente en los cortes una diferencia en la velocidad de repitelización o el grosor de la epidermis en la zona del daño entre los dos grupos de ratones. De tal forma que, el paso siguiente fue hacer un análisis más cuantitativo, midiendo la longitud de la herida en μm . La longitud fue utilizada como una referencia del grado de regeneración de la epidermis, ya que a una regeneración más avanzada en el tiempo corresponde a un tamaño de herida más pequeño. De esta manera no fue posible detectar un efecto de los oncogenes en la regeneración, siendo que no hubo diferencias significativas entre las longitudes de la herida entre los ratones transgénicos y los silvestres en ninguno de los tres tiempos medidos. En consecuencia, el análisis histológico no permitió evaluar la regeneración, a diferencia del análisis cuantitativo donde estadísticamente se demostró que no hay un efecto de los oncogenes en el proceso. Sin embargo dada la variabilidad del sistema, no es conclusivo decir si hay o no un efecto. Es posible que haya habido un aumento en la población de CT después de la inducción de la expresión de los oncogenes por la herida, pero esto no se vio reflejado en la aceleración de la regeneración. Además es posible que el ciclo de estrógenos de las hembras sea otro factor que confiera variabilidad entre los sexos, haciendo aún más difícil la evaluación.

Dado que la regeneración de la epidermis también se analizó de una manera cuantitativa en las orejas, la evaluación del efecto de los oncogenes fue objetiva y precisa. Además el análisis fue aún más sencillo que en el caso de las longitudes de las heridas superficiales, debido a que el diámetro en mm de las perforaciones pudo medirse de manera más directa, sin la necesidad de hacer histología. Inclusive, antes de hacer las mediciones se pudo observar claramente la evolución del proceso a simple vista, o con más detalle poniendo directamente al ratón anestesiado al microscopio estereoscópico. Por lo tanto, la evaluación fue más fácil, ya que el efecto fue evidente en una escala de mm, a diferencia de las heridas que fueron analizadas en μm . Las mediciones del diámetro demostraron una tendencia clara y extraordinaria de los ratones TgbK6-E6/E7 a presentar orificios más pequeños en comparación con los ratones wt, después de un mes de haber sido realizadas las perforaciones de 2 mm. La distribución de la frecuencia del tamaño del orificio estableció dos picos claros, uno de 0 mm de diámetro para el caso de los transgénicos y uno de 1.0 mm para los silvestres, observándose un desplazamiento de la curva de los datos de ratones TgbK6-E6/E7 hacia los diámetros chicos. El dato de un wt cuyo orificio de la oreja se cerró completamente y el de tres transgénicos cuya perforación al mes tuvo un diámetro de 1.0 mm puede deberse a la variabilidad genética que existe entre los ratones. Es importante notar que las orejas de los ratones TgbK6-E6/E7 se regeneraron más rápido que las de los casos wt que llegaron a cerrarse más. Así, la gran mayoría de las orejas cerradas de los ratones transgénicos estaba repitelizada completamente desde los 21 días e incluso desde los 14, mientras que los orificios de las orejas de los wt llegaban a su diámetro más chico hasta los 28. Por tanto, no sólo hay un efecto positivo de los oncogenes E6/E7 en la regeneración, sino que además aceleran el proceso en la epidermis de la oreja. Lo anterior puede deberse a que los oncogenes ciertamente aceleran la proliferación haciendo que los ciclos celulares sean más cortos, o a que permiten que las células escapen de G_0 y se dividan como sucede en la regeneración del pelo.

La diferencia de los resultados obtenidos según el sistema utilizado, indica que aún cuando ambos fueron elegidos como los adecuados para la evaluación de la regeneración de la epidermis, la realización de heridas superficiales no es propicia para evaluar el proceso. Lo anterior, principalmente dado que no hay homogeneidad entre las heridas. Por tanto, el sistema debe ser mejorado si se quiere seguir usando para este tipo de estudios. En

contraposición, el sistema de la perforación en la oreja resulta mucho más adecuado y sencillo para evaluar la regeneración extraordinaria de la oreja en los ratones TgbK6-E6/E7.

3. Cooperación de Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 en regeneración de la epidermis

3.1. Métodos *in vivo* para modificar genéticamente la piel

La evaluación de la cooperación del factor morfogenético Shh y E6/E7 tuvo que ser precedida por la implementación de un método *in vivo* eficiente y reproducible de modificación genética de la epidermis, que permitiera una acción prolongada del factor. Lo anterior debido a que la acción de Shh es pasajera cuando se aplica tópicamente, además de que el estrato córneo puede ser una barrera impenetrable para la proteína. En sí, la meta principal fue modificar las CT para lograr alterar la vía de señalización de Shh en éstas células y en otras células blanco, de tal forma que se buscaron las condiciones óptimas de cada método para lograr una eficiencia tal, que aumentara las probabilidades de modificar las minoritarias CT. Debido a que Shh es un factor difusible, sería suficiente la modificación de las células aledañas a las CT, que al liberar el factor afectarían la vía en las CT.

En general, establecer un método en la piel dorsal del ratón fue mucho más complicado, menos eficiente y se obtuvieron resultados más variables, que en el sistema de la oreja. Además es importante mencionar, que el objetivo fue modificar las células del dorso del ratón, aún cuando inicialmente no se utilizara el sistema de heridas superficiales escogido como el adecuado para evaluar la regeneración. De tal forma que, una vez implementado uno de estos métodos, después de haber electroporado las células, se hicieran las heridas superficiales en las zonas ya modificadas.

3.1.1. Electroporación

Aún cuando se demostró que la electroporación *in vivo* puede ser una opción para incorporar genes a las células de la epidermis de la piel dorsal del ratón, no se logró que fuera un método suficientemente eficiente y reproducible, y no se hicieron intentos por aplicarlo a la oreja.

Las primeras pruebas mostraron, además, que la proteína GFP no es un buen reportero para localizar células positivas en la piel, debido a que los queratinocitos autofluorescen. Por ello, todos los siguientes numerosos ensayos se realizaron con LacZ como reportero, utilizándose dos plásmidos diferentes, el pCHI10 y el p β Actina β -gal. La ventaja que tiene usar p β Actina β -gal es que la señal es de localización nuclear, lo que facilita el conteo de células individuales electroporadas, a diferencia de cuando la señal está dispersa en el citoplasma.

La exploración de las diferentes variables estableció, en primera, que los pulsos de 50 mseg de duración, separados por 1 seg entre sí, de 25-30 V son los adecuados para lograr la modificación de células de la piel sin que haya lesiones severas. Se comprobó que voltajes menores, 10-20 V, no son suficientes para lograr la expresión del reportero en las células, presumiblemente porque no se alcanza la permeabilidad transitoria suficiente que permite la introducción del plásmido, y por el contrario, los voltajes mayores, 40 V, producen quemaduras. Por otro lado, se obtuvieron buenos resultados, cuando se dieron primero dos pulsos, que pudieron haber permitido que el plásmido se desplazara a través de los nuevos caminos creados por el paso de la corriente y, después de un intervalo corto (1 min), se dieron cinco pulsos más, que pudieron haber terminado de inducir la formación de poros por los que entra el plásmido. También se logró electroporar células cuando se dieron diez pulsos seguidos, lo cual indica que no es necesario hacer intervalos entre los pulsos para que el reportero atravesase con éxito los poros de la célula. Lo que sí resultó muy importante fue la concentración del plásmido que debe ser cercana a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ya que una concentración de 1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ no dio buenos resultados (datos no mostrados).

Los parámetros anteriores fueron los indicados para electroporar diferentes zonas de la piel, utilizando diferentes electrodos y diferentes formas de aplicar el plásmido. Sin

embargo los mejores resultados de células modificadas en epidermis se obtuvieron utilizando únicamente los electrodos de aguja y los de disco bañando con el reportero la zona de una herida profunda, o utilizando los de disco pero haciendo heridas pequeñas poco profundas. No obstante, en ambos casos el número de células epidérmicas electroporadas fue muy reducido. Lo anterior posiblemente se debió a que los electrodos no son los adecuados para este tipo de experimentos. El uso de un electrodo en forma de placa y el otro en forma de tenedor podría traer mejores resultados, como los obtenidos por Maruyama *et al.* (2001). En consecuencia, y aunado a una baja reproducibilidad, la electroporación *in vivo* se consideró como un método ineficiente para modificar el tejido epitelial.

3.1.2. Transfección con adenovirus

La implementación de la transfección *in vivo* con adenovirus para lograr la modificación genética de la epidermis de la piel dorsal del ratón resultó ser una buena alternativa al método de electroporación. Desde las primeras pruebas se notó una eficiencia mucho mayor, por lo que en cada caso se analizaron los resultados a distintos tiempos para evaluar la permanencia y la zona de expresión del virus reportero AdLacZ. Esta evaluación fue esencial para asegurar que, posteriormente, la acción de Shh ocurriera a lo largo del tiempo de repitelización en las células de interés. El objetivo fue que el virus se expresara al menos por una semana, durante la cual se lleva a cabo la mayor parte del proceso de regeneración. Además cabe señalar que la expresión media del vector se limita a dos semanas, por lo que 7 días era una meta factible.

Así, aunque se transfectó un número considerable de células de la epidermis al aplicar el virus de manera tópica después de haber depilado el dorso del ratón, las células positivas se encontraron principalmente en el estrato córneo, cuya escamación, hizo que a los 5 días ya no hubiera expresión del reportero. Lo mismo ocurrió con la aplicación del virus en zonas donde se extrajo completamente un área de piel, debido a que las células transfectadas murieron rápidamente y formaron la costra que acabó por desprenderse del resto del tejido. Por otro lado se notó que la transfección tópica sin depilar no es posible,

probablemente debido a que el estrato córneo forma una barrera que no puede ser penetrada por el virus. De tal forma, que ninguna de las variantes anteriores resultó adecuada para modificar la epidermis durante el tiempo establecido como mínimo.

En cambio, la inyección fue una forma de transfección óptima en cuanto a la presencia del virus a lo largo del tiempo y al número de células modificadas de la piel. Sin embargo, las zonas transfectadas fueron exclusivamente el músculo y la dermis, debido a que no fue posible inyectar el adenovirus en la delgada capa epidérmica, aún usando pipetas pasteur adelgazadas. No obstante, ésta podría ser una manera muy exitosa de transfectar, pero se necesita mejorar la técnica de inyección para depositar el líquido con precisión predominantemente en la epidermis.

La aplicación directa del AdLacZ sobre una herida superficial, coincidiendo con el sistema de regeneración de epidermis elegido para la piel dorsal, fue la que finalmente arrojó los mejores resultados tanto en número como en localización de células transfectadas. Dado que la señal positiva se observó a los 3, a los 5 y a los 7 días en toda la región en reparación, incluyendo la epidermis, se decidió utilizar ésta forma específica de transfección *in vivo* para los experimentos posteriores con Shh, ya que podía ser la más eficiente en cuanto a la probabilidad de modificar las CT de la zona de proliferación de la región dañada por la herida. Lo anterior, más que por las células transfectadas de la epidermis, que aún seguían presentando una proporción menor, por las numerosas células transfectadas aledañas que pudieron influir en la activación de la vía de Shh en las CT de la capa basal. Además, es importante señalar que una transfección óptima con adenovirus depende fundamentalmente de su título. De tal forma que un lote de AdLacZ 10^6 , como el utilizado, resulta en un mayor número de células transfectadas que un lote con un título menor.

Debido a los resultados logrados en la piel dorsal del ratón, se probó también la transfección en la piel de la oreja, donde se logró rápida y reproduciblemente una modificación genética eficiente. Cuando el AdLacZ fue aplicado de manera directa en la orilla de la perforación de la oreja, se transfectaron prácticamente todas las células a lo largo de la circunferencia, incluyendo las epidérmicas, y la señal se mantuvo por más de 3 días. Cabe señalar que este tiempo de análisis de expresión fue suficiente en el caso de este sistema de regeneración, debido a que en la oreja no se forma una costra impenetrable por

el virus, como sucede en la piel dorsal, y pueden hacerse varias reeplicaciones a lo largo del tiempo para mantener la acción del factor. Así, dada la eficiencia, la reproducibilidad y la posibilidad de permanente transfección de las células, se adoptó este método para modificar genéticamente la piel de la oreja.

3.2 Evaluación de la cooperación

La evaluación de la cooperación de Shh y los oncogenes E6/E7 en la regeneración de la epidermis de la piel dorsal, nuevamente, resultó poco clara al analizar la histología de los cortes transversales de la zona de la herida transfectada con AdShh. Lo anterior, debido a que no se observó un efecto contundente en la estructura de la epidermis, que indicara una mayor o más acelerada proliferación. En consecuencia se optó por el análisis cuantitativo, midiendo las longitudes en μm de las heridas a los 3, 5 y 7 días. Al hacer la comparación entre ratones TgbK6-E6/E7 y ratones wt, tampoco se encontraron diferencias significativas que indicaran que la repitelización fue más rápida cuando hubo cooperación de los oncogenes y Shh o que Shh por sí sólo estimuló la proliferación. Por tanto, aún cuando ya se había probado que el método de transfección realizando heridas superficiales era el más eficiente para modificar las células de la epidermis, se probó si la vía de señalización de Shh se estaba activando al aplicar el virus. Los resultados del RT-PCR indicaron que, a diferencia de lo que ocurría en las células transfectadas con AdLacZ, las células cercanas a la herida superficial transfectadas con AdShh expresaban Gli1 y Ptc1. Curiosamente, los niveles de Shh fueron muy parecidos en las heridas donde se aplicó Shh y los controles, indicando que el factor aplicado no llegó a rebasar los niveles del Shh endógeno de las células. Normalmente, Shh se expresa en el folículo piloso y actúa, al parecer, en el desarrollo del pelo en el ratón adulto, induciendo la fase anagen (crecimiento). No obstante, los datos mostraron que el Shh endógeno no estuvo actuando, en el momento de sacrificar los ratones y procesar la muestra, sobre la población de células del folículo. A diferencia del Shh aplicado que activó la vía de señalización, pero aún así aparentemente no hubo un efecto de cooperación con los oncogenes E6/E7 en la regeneración. El Shh endógeno no estuvo activo posiblemente a que, en la piel normal, existe evidencia que

indica que actúa de forma específica en el inicio de la parte temprana de la fase anagen, que ya estaba rebasada al momento de sacrificar los ratones. Cabe señalar que, el RT-PCR también dió prueba de que el sistema es muy variable, además de la variabilidad genética que existe entre los ratones. De tal forma que, aunque las heridas fueron realizadas de la manera más homogénea posible, hubo diferencias en cuanto a la expresión de los transductores entre las diferentes heridas de un mismo ratón, (ver por ejemplo S2 y S3 en la Figura 23c), y entre los ratones (ver por ejemplo S3 y S5 en la Figura 23d).

En cambio, en el sistema de la piel de oreja la evaluación de la cooperación indicó exactamente lo contrario a lo que se observó en el sistema de la piel dorsal. A simple vista, fue claro que las perforaciones a las que se les aplicó el adenovirus con el factor morfogenético se regeneraron más frecuentemente y más rápido en los ratones Tgk6-E6/E7 que en los wt.

Las contradicciones de los resultados obtenidos en cada uno de los sistemas pueden tener varias explicaciones. Principalmente es posible que la transfección en el sistema de la piel dorsal no sea lo suficientemente eficiente, más que el hecho de que no haya un efecto del factor sobre la epidermis. Lo anterior, posiblemente debido a que el AdShh no transfecta a un número significativo de CT o células que puedan tener influencia en las CT. Por ello, cabe mencionar que, hubo un caso excepcional en que la transfección con AdShh tuvo un efecto, no en cooperación con los oncogenes, pero sí en un ratón wt, donde la herida a los 7 días presentó una longitud mucho más corta en comparación con el promedio. De tal forma que, tal vez en este caso la activación de la vía de Shh indujo aparentemente proliferación en las CT y la repitelización se aceleró considerablemente. Por el contrario, pareciera que la transfección de la oreja es más homogénea entre las muestras y por tanto el sistema es más adecuado para evaluar la cooperación. Aún así, hubo ratones Tgk6-E6/E7 que no respondieron favorablemente a la aplicación del factor morfogenético, lo que también hace suponer que el método de transfección finalmente no es tan invariable como se desearía. Igualmente puede ser que la no controlable variabilidad genética de la cepa haya influido en los resultados. Por último, también es importante mencionar que la activación de la vía de Shh puede deberse no sólo a la transfección de células con AdShh, sino al Shh presente en el sobrenadante del virus que actúa directamente sobre la población.

En consecuencia, el sistema de la oreja más la transfección *in vivo* con adenovirus puede ser una buena opción para estudiar la cooperación de Shh, así como de otros factores, y los oncogenes presentes en el ratón transgénico, a diferencia de la transfección de las heridas superficiales. Sin embargo es necesario que se desarrollen métodos que faciliten aún más el estudio de la cooperación entre genes, tratando de disminuir al máximo la variabilidad en el método de modificación genética.

4. Cooperación de Sonic hedgehog y los oncogenes E6/E7 en regeneración del cartilago

El antecedente de que el factor Indian hedgehog (Ihh) participa en la proliferación y maduración de los condrocitos, fue motivante para la evaluación de la cooperación de Shh y los oncogenes E6/E7 en la regeneración del cartilago en el sistema de la oreja. Ihh, que tiene propiedades biológicas muy similares a las de Shh, es esencial para la proliferación de los condrocitos, donde se ha visto que hay expresión de Ptc1 y Gli1 (St-Jacques *et al.*, 1999; Karp *et al.*, 2000). Además, Ihh se expresa en los condrocitos pre-hipertrofos del cartilago y regula su diferenciación (Vortkamp *et al.*, 1996).

El análisis de los cortes de las orejas perforadas e infectadas con el factor Shh indicaron, que previo a la formación de cartilago fue necesario que la epidermis se regenerara completamente. Lo anterior indica que, al parecer, la regeneración de la epidermis es una limitante en el proceso, aunque es preciso que se realicen más estudios al respecto. De tal forma que, la extraordinaria y rápida regeneración completa de las orejas de los ratones TgbK6-E6/E7, en cooperación además con Shh, promueve la condrogénesis, que se dificulta en los casos de una regeneración deficiente en los ratones silvestres. Pero, tanto los ratones transgénicos como los wt presentan islas de condrocitos formándose entre el mesénquima y la acción de Shh parece estar involucrada de forma directa únicamente en la proliferación de la epidermis. La regeneración podría clasificarse como un ejemplo de epimorfosis blastemal, ya que aparentemente implica la formación de una estructura de células epiteliales y mesenquimales que eventualmente se diferencian para formar el cartilago nuevo. Cabe señalar que la presencia de cartilago se detectó gracias a una tinción

de safranina, que es una forma sencilla y rápida de visualizar este tejido. Sin embargo es necesario hacer más estudios con marcadores específicos de la condrogénesis, como Sox 9.

En consecuencia este es un nuevo caso de regeneración total en mamíferos. El único modelo anterior, además del clásico modelo de regeneración en conejo, es el del ratón de la cepa MRL/lpr que presenta una cicatrización rápida y completa de las perforaciones que se le realizan en la oreja, incluyendo la formación de cartílago, lo cual se ha considerado como un caso de regeneración, mapeándose como una característica multigénica controlada por lo menos por siete genes diferentes (Clark *et al.*, 1998; Heber-Katz, 1999). Dado que en el ratón TgbK6-E6/E7, igualmente, después de un daño se reemplazaron y se restauraron por completo las masas de tejido que se habían perdido con la perforación, puede ser propuesto como un nuevo modelo de estudio de la regeneración para este grupo de vertebrados.

Conclusiones

Los oncogenes E6/E7 del VPH tipo 16 promueven y aceleran el proceso de regeneración de la epidermis de la piel de la oreja del ratón. Además, los oncogenes promueven la regeneración del cartilago de la oreja a consecuencia de la rápida regeneración de la epidermis, que es una limitante del proceso. Por tanto el ratón TgbK6-E6/E7 se propone como un nuevo modelo para el estudio de la regeneración en mamíferos, ya que se caracteriza por presentar un reemplazo y una restauración de todas las estructuras perdidas después de un daño. Además la activación constitutiva de la vía de señalización del factor morfogenético Sonic hedgehog coopera con los oncogenes en la regeneración de la epidermis de la oreja. Sin embargo, aún se requiere mejorar los métodos *in vivo* de modificación genética de la piel, para seguir evaluando la cooperación de éste y otros posibles factores en el proceso. Finalmente, el sistema de la oreja es más eficiente y más fácil de estudiar que el de la herida superficial en la piel dorsal del ratón para analizar el proceso de regeneración de la epidermis del ratón.

Perspectivas

La propuesta de estudiar la regeneración de mamíferos en el ratón Tgbk6-E6/E7 como modelo, implica que debe analizarse con más detalle el efecto de los oncogenes E6/E7 en la regeneración de la epidermis, pero especialmente del cartilago.

Específicamente, para seguir estudiando la regeneración de la epidermis de los ratones transgénicos es necesario que se mejoren los sistemas implementados. En especial, el sistema de heridas superficiales en piel dorsal del ratón que resultó ser poco eficiente, pero que podría ser más efectivo si se controla la variabilidad que presentan las heridas en cuanto a longitud y profundidad. Así mismo, los experimentos podrían realizarse únicamente en hembras, ya que el efecto de los estrógenos también puede ser un factor de variabilidad. Para estudiar la cooperación de otros factores, además de Shh, con los oncogenes es preciso que se desarrolle un método que facilite este tipo de estudios. Por tanto, podría retomarse la electroporación y probarse la eficiencia del método en la oreja o volver a electroporar células del dorso, pero con unos electrodos más adecuados. Por otro lado, si se continúa transfectando la epidermis con adenovirus, también es necesario mejorar el método. Lo anterior podría lograrse homogenizando la transfección tanto en el dorso como en la oreja y utilizando un virus con un título elevado para que se altere un número considerable de células de la epidermis, incluyendo las minoritarias células troncales. Igualmente es importante considerar hacer los experimentos en una etapa particular del ciclo del pelo, el inicio del segundo anagen por ejemplo, para en el caso de Shh, potenciar el efecto del factor endógeno. La importancia de la mejoría de estos métodos radica en que representan una opción mucho más sencilla y rápida de modificar genéticamente células de interés, en comparación a la construcción de ratones transgénicos. Sin embargo, queda la posibilidad de hacer una cruce entre el TgbK6-E6/E7 y el TgK14Shh para evaluar la cooperación entre los genes en un nuevo modelo, o transferir el TgbK6-E6/E7 a la cepa FVB/N que es susceptible a desarrollar tumores. Además podría explorarse la posibilidad de transfectar las células CT *in vitro* e injertarlas en la epidermis del ratón.

Finalmente, en relación con los resultados de cooperación entre Shh y los oncogenes E6/E7 es necesario que se precise si hay una cooperación directa entre las vías

que actúan sinérgicamente en el proceso de regeneración o si cada una está actuando independientemente.

Bibliografía

- Adjei, A. A. (2001). Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 93 (14), 1062-1074.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4ª ed. Garland Science, E.U.A.
- Arbeit, J. M., Howley, P. M. y Hanahan, D. (1996). Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 93, 2930-2935.
- Azsterbaum, M., Epstein, J., Oro, A., Douglas, V., LeBoit, P. E., Scott, M. P. y Epstein, E. H. (1999). Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nature Medicine* 5 (11), 1285-1291.
- Balmain, A. (2002). Cancer as a Complex Genetic Trait: Tumor Susceptibility in Humans and Mouse Models. *Cell* 108 (2), 145-152.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. y Shah, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 87 (11), 796-802.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E. y Band, V. (1996). E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 4620-4624.
- Cairns, J. (1981). *Cáncer: Ciencia y sociedad*. Editorial Reverté, S. A., España.
- Clark, L. D., Clark, R. A. y Heber-Katz, E. (1998). A New Murine Model for Mammalian Wound Repair and Regeneration. *Clinical Immunology and Immunopathology* 88 (1), 35-45.
- Conrad-Stoppler, M., Straight, S. W., Tsao, G., Schlegel, R. y Mccance, D. J. (1996). The E5 Gene of HPV-16 Enhances Keratinocyte Immortalization by Full-Length DNA. *Virology* 223, 251-254.
- Crespo, P. y León, J. (2000). Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *CMLS Cell Mol Life Sci* 57, 1613-1636.
- Cheah, P. L. y Looi, M. (1998). Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol* 20 (1), 1-10.
- Chellappan, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Münger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C. y Nevins, J. R. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci* 89, 4549-4553.
- Chen, C. M., Shyu, M. P., Au, L. C., Chu, H. W., Cheng, W. T. y Choo, K. B. (1994). Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *Journal of Medical Virology* 44 (2), 206-211.
- Choo, K. B., Lee, H. H., Pan, C. C., Wu, S. M., Liew, L. N., Cheung, W. F. y Han, S. H. (1988). Sequence duplication and internal deletion in the integrated human papillomavirus type 16 genome cloned from a cervical carcinoma. *Journal of Virology* 62 (5), 1659-1666.

- Choo, K. B., Pan, D. C. y Han, S. H. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and in variable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* 161 (1), 259-261.
- Christian, J. L. (2000). BMP, Wnt and Hedgehog signals: how far can they go? *Current Opinion in Cell Biology* 12, 244-249.
- Dahmane, N., Lee, J., Robins, P., Heller, P. y Ruiz i Altaba, A. (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumors. *Nature* 389, 876-881.
- Duensing, S., Duensing, A., Crum, C. P. y Münger, K. (2001). Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein-induced Abnormal Centrosome Synthesis Is an Early Event in the Evolving Malignant Phenotype. *Cancer Research* 61, 2356-2360.
- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. y Harlow, E. (1989). The Human Papilloma Virus-16 Oncoprotein Is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science* 243, 934-937.
- Escalante-Alcalde, D., Recillas-Targa, F., Valencia, C., Santa-Olalla, J., Chávez, P., Marroquín, A., Gutiérrez-X, L., Gariglio, P. y Covarrubias, L. (2000). Expression of E6 and E7 Papillomavirus Oncogenes in the Outer Root Sheath of Hair Follicles Extends the Growth Phase and Bypasses Resting at Telogen. *Cell Growth & Differentiation* 11, 527-539.
- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427-5440.
- Evan, G. I. y Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Fan, H. y Khavari, P. A. (1999). Sonic Hedgehog Opposes Epithelial Cell Cycle Arrest. *The Journal of Cell Biology* 147 (1), 71-76.
- Fuchs, E. (1995). Keratins and the Skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 123-153.
- Fuchs, E. y Segre, J. A. (2000). Stem Cells: A New Lease on Life. *Cell* 100, 143-155.
- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., Vande Woude, G. F. (1996). Abnormal Centrosome Amplification in the Absence of p53. *Science* 271, 1744-1747.
- Giuliano, A. R. (1998). Can Cervical Dysplasia and Cancer Be Prevented with Nutrients? *Nutrition Reviews* 56 (1), 9-16.
- Goldsmith, L. A. (ed.) (1991). "Cutaneous Wound Repair" por Clark, R. A. F. En *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin*. Oxford University Press, E.U.A. Págs. 576-601.
- Goodwin, E. C. y Dimaio, D. (2000). Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci* 97 (23), 12513-12518.
- Groopman, J. D. y Skipper, P. L. eds. (1991). *Molecular Dosimetry and Human Cancer: Analytical, Epidemiological, and Social Considerations*. CRC Press Inc., E.U.A.
- Grose, R., Hutter, C., Bloch, W., Thorey, I., Watt, F. M., Fassler, R., Brakebusch, C. y Werner, S. (2002). A crucial role of b1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. *Development* 129, 2303-2315.
- Halbert, C. L., Demers, G. W. Y Galloway, D. A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is

- sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Journal of Virology* 65 (1), 473-478.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Herber, R., Liem, A., Pitot, H. y Lambert, P. F. (1996). Squamous Epithelial Hyperplasia and Carcinoma in Mice Transgenic for the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene. *Journal of Virology* 70 (3), 1873-1881.
- Hesketh, R. (1997). *The oncogene and tumour suppressor gene. FactsBook*. 2ª ed. Academic Press, R. U.
- Hwang, E. S., Nottoli, T. y DiMaio, D. (1995). The HPV16 E5 Protein: Expression, Detection, and Stable Complex Formation with Transmembrane Proteins in COS Cells. *Virology* 211, 227-233.
- Iglesias, M., Yen, K., Gaiotti, D., Hildesheim, A., Stole, M. H. y Woodworth, C. D. (1998). Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1 α . *Oncogene* 17, 1195-1205.
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L. y Storey, A. (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes & Development* (14), 3065-3073.
- Jackson-Grusby, L. (2002). Modeling cancer in mice. *Oncogene* 21, 5504-5514.
- Jones, D. L., Rhoda, M. A. y K. Münger. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21^{Cip1}-mediated inhibition of cdk2. *Genes & Development* 11, 2101-2111.
- Jones, P. A. y Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews* 3, 415-428.
- Karp, S. J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H. y McMahon, A. P. (2000). Indian Hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via Parathyroid Hormone related-Protein-dependent and -independent pathways. *Development* 127, 543-548.
- Khleif, S. N., DeGregori, J., Yee, C. L., Otterson, G. A., Kaye, F. J., Nevins, J. R. y Howley, P. M. (1996). Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci* 93, 4350-4354.
- Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A. y Klingelhut, A. J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.
- Klausner, R. D. (2002). The fabric of cancer cell biology – Weaving together the strands. *Cancer Cell* 1, 3-10.
- Lambert, P. F., Pan, H., Pitot, H. C., Liem, A., Jackson, M. y Griep, A. E. (1993). *Proc Natl Acad Sci* 90, 5583-5587.
- Lazcano-Ponce, E., Herrero, R., Muñoz, N., Cruz, A., Shah, K. V., Alonso, P., Hernández, P., Salmerón, J. y Hernández, M. (2001) Epidemiology of HPV Infection Among Mexican Women with Normal Cervical Cytology. *Int J Cancer* 91, 412-420.
- Lazo, P. A., Gallego, M. I., Ballester, S. y Feduchi, E. (1992). Genetic alterations by human papillomaviruses in oncogenesis. *FEBS Letters* 300 (2), 109-113.
- Lee, D. K., Kim, B. C., Kim, I. Y., Cho, E. A., Satterwhite, D. J. y Kim, S. J. (2002). The Human Papilloma

- Virus E7 Oncoprotein Inhibits Transforming Growth Factor-beta Signaling by Blocking Binding of the Smad Complex to Its Target Sequence. *Journal of Biological Chemistry* 277 (41), 38557-38564.
- Lewin, B. (2000). *Genes VII*. Oxford University Press Inc., E.U.A.
- Ma, P., Magut, M., Chen, X. y Chen, C. (2002). p53 Is Necessary for the Apoptotic Response Mediated by a Transient Increase of Ras Activity. *Molecular and Cellular Biology* 22 (9), 2928-2938.
- Marshall, C. J. (1991). Tumor Suppressor Genes. *Cell* 64, 313-326.
- Martin, P. (1997). Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Maruyama, H., Ataka, K., Higuchi, N., Sakamoto, F., Gejyo, F. y Miyazaki, J. (2001). Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation. *Gene Therapy* 8, 1808-1812.
- Miyashita, T. y Reed, J. C. (1995). Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human Bax Gene. *Cell* 80, 293-299.
- Muller, T. L., Ngo-Muller, V., Reginelli, A., Taylor, G., Anderson, R. y Muneoka, K. (1999). Regeneration in higher vertebrates: Limb buds and digit tips. *Cell & Developmental Biology* 10, 405-413.
- Nilsson, M., Uden, A. B., Krause, D., Malmqwist, U., Raza, K., Zaphiropoulos, P. G. y Toftgard, R. (2000). Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc Natl Acad Sci* 97 (7), 3438-3443.
- Oda, H., Kumar, S. y Howley, P. M. (1999). Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci* (96), 9557-9562.
- Oelze, I., Kartenbeck, J., Crusius, K., y A. Alonso. (1995). Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Affects Cell-Cell Communication in an Epithelial Cell Line. *Journal of Virology* 69 (7), 4489-4494.
- Oro, A. E., Higgins, K. M., Hu, Z., Bonifas, J. M., Epstein, E. H. y Scott, M. P. (1997). Basal Cell Carcinomas in Mice Overexpressing Sonic Hedgehog. *Science* 276, 817-821.
- Parkin, D. M., Pisani, P. y Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80, 827-841.
- Peto, J. (2001). Cancer epidemiology in the first century and the next decade. *Nature* 411, 390-395.
- Ponder, B. A. J. (2001). Cancer genetics. *Nature* 411, 336-341.
- Prausnitz, M. R., Bose, V. G., Langer, R. y Weaver, J. C. (1993). Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci* 90, 10504-10508.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., y Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Ruiz i Altaba, A., Sánchez, P. y Dahmane, N. (2002). Gli and Hedgehog in Cancer: Tumors, Embryos and Stem Cells. *Nature Reviews Cancer* 2, 361-372.
- Sánchez-Alvarado, A. (2000). Regeneration in the metazoans: why does it happen? *BioEssays* 22, 578-590.
- Sasagawa, T., Kondoh, G., Inoue, M., Yutsudo, M. y Hakura, A. (1994). Cervical/vaginal dysplasias of transgenic mice harbouring human papillomavirus type 16 E6/E7 genes. *Journal of General Virology* 75, 3057-3065.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. y Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.

- Sheng, H., Goich, S., Wang, A., Grachtchouk, M., Lowe, L., Mo, R., Lin, K., de Sauvage, F. J., Sasaki, H., y Hui, C. y Dlugosz, A. A. (2002). Dissecting the Oncogenic Potential of Gli2. Deletion of an NH₂-Terminal Fragment Alters Skin Tumor Phenotype. *Cancer Research* 62, 5308-5316.
- Shirasawa, H., Tomita, Y., Fuse, A., Yamamoto, T., Tanzawa, H., Sekiya, S., Takamizawa, H. y Simizu, B. (1989). Structure and expression of an integrated human papillomavirus type 16 genome amplified in a cervical carcinoma cell line. *Journal of General Virology* 70 (7), 1913-1919.
- Slack, J. M. W. (2000). Stem Cells in Epithelial Tissues. *Science* 287, 1431,1433.
- Song, S., Liem, A., Miller, J. A. y Lambert, P. F. (2000). Human Papillomavirus Types 16 E6 and E7 Contribute Differently to Carcinogenesis. *Virology* 267, 141-150.
- Song, S., Pitot, H. C. y Lambert, P. F. (1999). The Human Papillomavirus Type 16 E6 Gene Alone Is Sufficient To Induce Carcinomas in Transgenic Animals. *Journal of Virology* 73 (7), 5887-5893.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. y McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development* 13, 2072-2086.
- Taipale, J. y Beachy, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411, 349-354.
- Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T. y Beachy, P. A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418, 892-897.
- Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. y Lavker, R. M. (2000). Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell* 102, 451-461.
- Toftgard, R. (2000). Hedgehog signalling in cancer. *CMLS Cell Mol Life Sci* 57, 1720-1731.
- Tomakidi, P., Cheng, H., Kohi, A., Komposch, G. y Alonso, A. (2000). Connexin 43 expression is downregulated in raft cultures of human keratinocytes expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Cell Tissue Res* 301, 323-327.
- Tsao, Y., Li, L., Tsai, T. y Chen, S. (1996). Human Papillomavirus Type 11 and 16 E5 Represses p21^{Waf1/Cip1} Gene Expression in Fibroblasts and Keratinocytes. *Journal of Virology* 70 (11), 7535-7539.
- Veldman, T., Horikawa, I., Barrett, J. C. y Schlegel, R. (2001). Transcriptional Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. *Journal of Virology*, 75(9), 4467-4472.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. y Tabin, C. J. (1996). Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science* 273, 613-622.
- Weber, B. L. (2002). Cancer genomics. *Cancer Cell* 1, 37-47.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J. M., Lam, C., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Epstein, E. H. y Sauvage, F. J. (1998). Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 393, 90-92.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. y Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.

- Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovsky, D., Friedman, V., Henglein, B. y Jansen-Dürr, P. (1995). Sequential Activation of Cyclin E and Cyclin A Gene Expression by Human Papillomavirus Type 16 E7 through Sequences Necessary for Transformation. *Journal of Virology*, 69 (10), 6389-6399.
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W. y Jansen-Dür, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13 (11), 2323-2330.
- Zhang, B., Spandau, D. F. y Roman, A. (2002). E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Protects Human Foreskin Keratinocytes from UV B-Irradiation-Induced Apoptosis. *Journal of Virology* 76, 220-231.
- zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92 (9), 690-698.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* (2), 342-350.