



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DETECCIÓN DE SECUENCIAS DEL PAPILOMA VIRUS
HUMANO TIPO 16 Y DEL GEN Y LA PROTEINA C-MYC
EN LESIONES CERVICALES HUMANAS**

**INFORME POR EXPERIENCIA
PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
PEDRO CHAVEZ OLMOS**

ASESOR

M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



MÉXICO D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo forma parte de los requisitos para titulación por experiencia profesional, y se realizó en el laboratorio 24 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la jefatura del Dr. Patricio Gariglio Vidal entre los años 1989-1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a la memoria de mis padres PILAR† y PEDRO†

A mis hermanos: Leticia, Susana, Martín, Patricia, Catalina, Eduardo (Claudia), Alejandra y Graciela.

Pero se lo dedico muy especialmente a mis hijos Valeria y Santiago fuente de la fuerza necesaria para culminar este trabajo, a mi Esposa y compañera Rosaura sin cuyo decidido apoyo y aliento no hubiese sido posible la terminación después de tantos años. Los Amo.

PEDRO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Patricio Gariglio por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo durante tantos años, y por haberme brindado las facilidades para tener un desarrollo profesional pleno en su laboratorio del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV.

Así mismo debo agradecer a todos mis maestros que de una u otra manera hicieron posible que me encuentre en donde ahora estoy en la vida.

Agradezco al M. en C. Luis Sánchez Sánchez así como al M. en C. Jorge Hernández Montes y a los Doctores Edelmiro Santiago Osorio, Mario Altamirano Lozano y Benny Weiss Steider el tiempo dedicado a la revisión del escrito y las observaciones realizadas para el mejoramiento del mismo.

Por último, pero no por ello menos importante, agradezco al Dr. Efraín Garrido y a todos los integrantes del laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV por su amistad y el apoyo que me brindaron, M. en C. Elizabeth (La Niña), Dr. Francisco Velázquez (El Velázquez), Biol. Federico (El Fede), M. en C. Armando Valencia (Mejor conocido como Juanito) M. en C. Rubén Ruiz, Biol. Christian Cuevas, M. en C. Emilio Cordova (Alias La Rata), Araceli, Adolfo, Miguel (El Cuchillo) y los que se fueron.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Indice

Introducción	1
Células y Tejidos	1
Los virus	2
Cáncer Cérvico Uterino	5
Organismo Hospedero	8
Como se extiende el virus en el hospedero	9
Expresión de genes de Papilomavirus	13
Oncogenes Virales	16
Proteína E5	16
Proteína E6	20
Proteína E7	22
Oncogenes celulares	24
Como se activan los proto-oncogenes	25
El oncogen c-myc	26
Objetivos e Hipótesis	28
Material y Métodos	29
Biopsias	29
Extracción de DNA del tejido	29
Metodología	30
Extracción de DNA de bajo peso molecular	31
Aislamiento de plásmidos	32
Reacciones de restricción	32
Sondas	33
Electroforesis en geles de agarosa marcaje e hibridación de DNA genómico	33
Mapa de PVH y myc	35
Inmunohistoquímica	36
Resultados	37
Discusión	52
Conclusiones	60
Bibliografía	61
Apéndice	70

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CELULAS Y TEJIDOS

La célula individual es la unidad mínima que se auto-reproduce, y es el vehículo para la transmisión de la información genética en todas las especies vivas. Todas las células en nuestro planeta tienen la información genética de la misma forma química, como un Ácido Desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena. Las células replican esta información separando las cadenas apareadas de DNA y usando cada una como un molde para la polimerización de una nueva cadena de DNA con secuencia de nucleótidos complementaria. La misma estrategia de polimerización es empleada para transcribir porciones de la información del DNA en moléculas de un polímero estrechamente relacionado, el Ácido Ribonucleico (RNA). Este se vuelve la guía para la síntesis de moléculas de proteína, por medio de la maquinaria un poco más compleja del fenómeno de la traducción, que involucra un gran complejo multimolecular, el ribosoma, el cual está compuesto de RNA y proteína. Las proteínas son los principales catalizadores de las reacciones químicas que se llevan a cabo en las células; otras de sus funciones incluyen la exportación e importación de pequeñas moléculas a través de la membrana plasmática por medio de la cual se une con otras células. La función de cada proteína depende de su secuencia de aminoácidos, la cual es codificada por la secuencia de nucleótidos del correspondiente segmento de DNA – el gen que codifica para esta proteína. En este sentido, el genoma de la célula determina su química, y la química de todas las células vivas es fundamentalmente similar.

Las células eucarióticas por definición tienen su DNA en un compartimiento rodeado por una membrana, el núcleo. Tienen además, un citoesqueleto para movimiento, comunicación con otras células así como para el intercambio de sustancias con el medio, compartimientos intracelulares elaborados para digestión y secreción, la capacidad (en algunas especies) de fagocitar otras células, y un metabolismo que depende de la oxidación de moléculas orgánicas por la mitocondria. Estas propiedades sugieren que los eucariontes se originaron como predadores de otras células. La mitocondria –y en las plantas los cloroplastos- contienen su propio material genético. Las células eucarióticas tienen de 3 a 30 veces más genes que los procariotes y con frecuencia miles de veces más DNA no codificado. El DNA no codificado permite la compleja regulación de la

expresión genética, como requerimiento para la construcción de organismos multicelulares complejos. Algunos eucariontes son, sin embargo, unicelulares tal como la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, el cual sirve como un sistema modelo simple, que revela las bases moleculares de procesos fundamentales conservados tales como el ciclo de división celular eucariótico. Un pequeño número de otros organismos han sido escogidos como modelos primarios para el estudio de organismos multicelulares como plantas y animales, y la secuencia completa de su genoma ha sido descrita, facilitando el entendimiento de la función, regulación y diversidad genética. Como resultado de la duplicación del genoma durante la evolución de los vertebrados, su genoma es redundante. Esta redundancia del genoma permite la diversificación y especialización de genes para nuevos propósitos, pero esto también hace la función genética difícil de descifrar. (Alberts;2000)

Cuando hablamos de un conjunto organizado de células que funcionan en forma colectiva, estamos aludiendo a un tejido. Los tejidos son los que mantienen funcionando al organismo, gracias al esfuerzo cooperativo de sus células individuales. Se sabe además que las células de un solo tejido pueden comunicarse entre sí, por medio de uniones intracelulares especializadas.

El concepto de tejido proporciona una base para reconocer los varios tipos celulares distintos del organismo y comprender como se interrelacionan. A pesar de las variaciones en el aspecto general, organización estructural y propiedades fisiológicas de los diferentes órganos del cuerpo, los conjuntos celulares que los forman se reducen a cuatro tejidos fundamentales, estos son; 1)Tejido epitelial (epitelio) 2)Tejido conectivo o conjuntivo 3)Tejido muscular y 4)Tejido nervioso.

El tejido epitelial, como blanco de la infección con Papilomavirus centra nuestra atención, dado que en el se desarrolla el Cáncer Cérvico Uterino (CaCu).

LOS VIRUS

El avance en el conocimiento de los virus y los mecanismos por medio de los cuales se reproducen en las células del hospedero, ha ido acompañada de las definiciones más precisas de estos agentes únicos. Los virus son los primeros agentes patógenos que se distinguen por su pequeño tamaño y dependencia para su reproducción de la célula del

huésped, enfatizando la importancia de éstos como responsables de enfermedad. Las propiedades de los virus podrían ser las siguientes:

- Un virus es un agente infeccioso muy pequeño intracelular obligado.
- Los genomas de los virus pueden ser de **DNA** o de **RNA**.
- Dentro de una célula huésped apropiada, el genoma viral es replicado y sintetizado directamente por los sistemas celulares.
- La progenie de viriões ensamblados *de novo* son formados por nuevos componentes sintetizados dentro de la célula huésped.
- La progenie de viriões ensamblados durante el ciclo de infección es el vehículo para la transmisión del genoma viral a la siguiente célula huésped u organismo, donde es desensamblado dirigiendo el inicio del siguiente ciclo de infección.

Con estas propiedades en mente, podemos colocar a los virus como agentes biológicos en continua evolución. Ellos son más simples que los más pequeños microorganismos y carecen de los complejos sistemas biosintéticos generadores de energía necesarios para la existencia independiente. En otras palabras, los virus no son simples agentes biológicos activos; desde el más pequeño virus, constituido de un genoma muy limitado y un tipo de proteína muy simple, es significativamente más complejo que otros patógenos moleculares. Algunos de estos patógenos moleculares, los viroides, los cuales son agentes infecciosos de una variedad de plantas con importancia económica, comprende una simple molécula de **RNA**. (Flint;2000)

La clasificación de los virus es un tema de discusión actualmente, pero se han tomado en cuenta una serie de criterios de tipo médico, epidemiológico, funcional o bioquímico de tal forma que actualmente se puede encontrar la clasificación de los virus de acuerdo con:

- El tipo de huésped que infectan.
- La ruta de entrada al organismo y sus órganos blanco.
- Su estrategia de replicación y expresión del **RNA** mensajero (**RNAm**)

Con el conocimiento generado en los últimos años en relación con la biología molecular de los virus y sus propiedades, es posible emitir criterios y reglas más precisas. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) utiliza el arreglo de los virus en taxones, con el:

- **Orden (-virales)**
- **Familia (-viridae)**
- **Subfamilia (-virinae)**
- **Género (-virus)**
- **Especie**

El virus que nos ocupa es Papilomavirus Humano (PVH) es miembro de la familia Papoviridae que comprende dos géneros, el género de los *Papillomavirus* y el de *Polyomavirus*, que son virus de DNA de doble cadena covalentemente cerrado. La familia fue originalmente nombrada así por sus tres principales miembros; Papillomavirus, Polyomavirus y Agente Vacuolante (SV 40 un miembro de la familia de Polyomavirus).(Flint;2000)

Los Papilomavirus (PV) son partículas pequeñas, icosaédricas sin envoltura con un diámetro aproximado entre 52-55 nanómetros (nm). Estos tienen 72 capsómeros, 60 hexaméricos + 12 pentaméricos sobre una superficie de 7 caras. Tiene 2 proteínas de cápside, una mayor codificada por el gen L1 y una menor codificada por el gen L2.

El genoma del virus es replicado como un plásmido nuclear multicopia (episoma) (Los plásmidos son pequeñas moléculas de DNA circular que replican independientemente del genoma bacteriano.) Los plásmidos modificados son usados extensivamente como vectores plasmídicos para clonación de DNA.

Dos mecanismos están involucrados en la replicación del genoma. La replicación del episoma, ocurre en células en la parte baja del epitelio. Inicialmente el DNA del virus es amplificado de 50-400 copias por célula diploide. Después de esto, estos se replican una vez por división celular, el número de copias por célula permanece constante.

La replicación de PV sirve como un sistema modelo para el análisis de la replicación eucariótica y su regulación. Durante el curso de la infección en células basales proliferando o en sistemas de células transformadas, los PVs establecen su genoma como episomas de replicación autónoma en bajo número de copias. (Lambert;1988). El DNA de los PVs replican durante la fase S de ciclo celular, en sincronía con la replicación de los cromosomas de las células hospederas, y el mecanismo de inicio de la replicación es

fundamentalmente el mismo que el de las células eucarióticas. (Russell;1995).

Existen al menos 100 tipos diferentes de virus, los cuales pueden ser divididos en aquellos que infectan epitelios secos como la piel y los que infectan epitelios húmedos, como el cérvix. Los diferentes tipos han sido tradicionalmente divididos por la divergencia de su secuencia nucleotídica, así mismo se han dividido en aquellos que no son capaces de transformar células epiteliales, llamados de bajo riesgo, los mas frecuentes son los tipos 6 y 11, y aquellos que son capaces de transformar las células, llamados de alto riesgo, los mas frecuentes son los tipos 16 y 18.

CANCER CERVICO UTERINO

El Cáncer cérvico-uterino (CaCu) se presenta principalmente entre mujeres con una vida sexual activa, se considera una enfermedad multifactorial de transmisión sexual, cuyo principal agente etiológico es el virus del papiloma humano (HPV del inglés Human Papillomavirus) (Lizano y Carrancá, 1995). La citología exfoliativa fue introducida por Papanicolau en 1941 y aún cuando ya han transcurrido más de 50 años de su postulación, se mantiene como el principal método de diagnóstico. En América Latina se ha estimado que la deficiencia del programa de detección de CaCu ha generado más del 60% de las muertes por este cáncer. El riesgo de sufrir esta neoplasia se incrementa hasta 10 veces en mujeres con vida sexual activa y sin acceso al examen del Papanicolaou (Meneses-González ; 1999).

El cérvix normal (Figura 1) esta dividido en 3 regiones 1) exocérvix, compuesto por epitelio escamoso estratificado; 2) endocérvix, delimitado por epitelio columnar secretorio y 3) zona metaplásica o zona de transición, situada entre estas dos áreas. El tejido columnar normalmente es reemplazado por células pavimentosas metaplásicas en respuesta a diversos estímulos (pH local, hormonas). Las células normalmente presentes en la profundidad del epitelio mucosecretante, comienzan a proliferar. En el inicio la capa de células pavimentosas es delgada e inmadura y se caracteriza por núcleos voluminosos y un citoplasma escaso. Con el transcurso del tiempo, estas células se estratifican y desplazan a las células cilíndricas glandulares. Esto es lo que pasa en un cérvix normal (Rubin;1990)

Papilomavirus Humano (PVH) puede afectar las 3 zonas, sin embargo, clínicamente las infecciones ocurren principalmente en la zona de transición (Woodworth y Simpson, 1993).

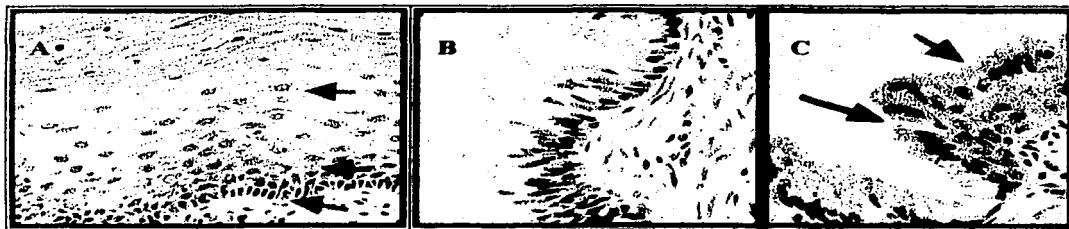


Figura 1. Histología de un cérvix normal. En el Panel A se muestra el exocervix, en donde se señala con la flecha amarilla el epitelio escamoso estratificado, que son queratinocitos diferenciados. Con la flecha verde se muestra las células del estrato espinoso. Las células parabasales se indican con la flecha azul y con la flecha roja a las células basales, blanco principal del PVH. En el panel B se muestra el endocervix, que es un epitelio columnar secretor y en el panel C se muestra la zona de transición señalado con la flecha negra.

En el CaCu se presentan células anormales las cuales no son necesariamente cancerosas, pero pueden generar cáncer y/o lesiones denominadas neoplasia intraepitelial del cérvix (NIC). Algunos médicos sugieren que estas lesiones precancerosas tienen un potencial alto para desarrollarse a cáncer si no son tratadas. Generalmente los NIC son resultado de una infección viral. EL PVH es el virus que mas frecuentemente afecta las células del cérvix y es generalmente transmitido por contacto sexual. La mayoría de las mujeres tienen este virus en algún momento de su vida, pero en muchas mujeres su sistema inmune no logra eliminar la presencia de este virus en el organismo. De hecho, se ha visto que las lesiones NIC desaparecen cuando el sistema inmune logra eliminar al virus. En algunas mujeres el virus puede permanecer por varios años y en pocas de estas mujeres la lesión NIC puede desarrollar un cáncer si ésta no es tratada (Syrjänen K y Syrjänen S, 1999).

En al menos un 95% de los casos reportados de CaCu se ha encontrado la presencia de DNA de PVH y el PVH 16 está presente en mínimo un 50% de este

porcentaje, mientras que la otra proporción está representada por PVH 18, 31 y 45 (Report of a technical meeting, 1999). En México un estudio realizado por Berumen y colaboradores en 1995, encontraron por PCR que un 82-85% de las mujeres con neoplasias de cérvix (CaCu) y en el 31% de las mujeres normales se encuentra DNA de PVH del cual, un 40-50% corresponde a DNA de PVH16 y un 11% de PVH 18, analizando principalmente estos tipos que son los de alto riesgo y los mas frecuentes, lo que no significa que no estén presentes otros tipos virales.

Muchas mujeres están expuestas a factores de riesgo para contraer el cáncer de cérvix . Estos riesgos como la edad temprana en el inicio de la actividad sexual, o bien tener múltiples parejas sexuales, pueden incrementar los cambios de la susceptibilidad a la infección con PVH y pueden llevar a un desarrollo de NIC y si el sistema inmune esta reprimido la lesión de NIC puede desarrollar a CaCu. La respuesta inmune puede afectarse por el tabaquismo, por una dieta pobre, por drogadicción y por otras infecciones. En mujeres se ha propuesto que el uso de píldoras anticonceptivas por periodos largos puede ser otro posible factor de riesgo, sin embargo aun no es muy claro.

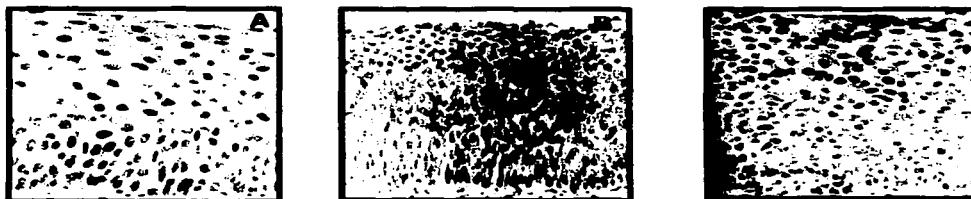


Figura 2. Lesiones intraepiteliales neoplásicas. En el panel A se muestra una lesión NIC I, en el panel B una lesión NIC II y en el panel C una lesión NIC III

Para establecer el grado de lesión en los cánceres de cérvix, se han propuesto varias terminologías. En 1973, Ritschart, quien introdujo el término de NIC, estableció lesiones precancerosas de grado: NIC I, NIC II y NIC III (Fig 2).

En la lesión NIC I también llamada displasia leve, las células muestran núcleos anormales, nucleolos prominentes y pleomórficos , alargados e hiper cromáticos con un

curso granular y un patrón filamentososo de la cromatina. Las células en los tercios medio y superior del epitelio tienden a una diferenciación citoplásmica mientras que, en el tercio inferior no existe. Figuras mitóticas no son comunes, estas pueden presentarse en el tercio inferior del epitelio y son normales.

NIC II o displasia moderada, similar a **NIC I** excepto que las células no estratificadas desdiferenciadas con núcleo pleomórfico y un alto promedio núcleo-citoplasma, se extiende más allá del tercio inferior del epitelio pero no dentro del tercio superior. Las células en el tercio superior van a un grado variable de estratificación y diferenciación citoplásmica. Figuras mitóticas anormales están presentes en el tercio inferior.

NIC III displasia severa aparecen células basales no estratificadas, no diferenciadas con núcleos amontonados. El grado de pleomorfismo nuclear es mayor que en las **NIC I** y **II**. Figuras mitóticas son frecuentemente vistas, presentes en el tercio superior y además anormales.(Rubin;1990)

El descubrimiento de las infecciones con **PVH** y su asociación con **NIC** ha sido complicado, por lo que se ha propuesto reemplazar los 3 **NIC** en términos de bajo riesgo que incluye **NIC I** y de alto riesgo que incluye **NIC II** y **NIC III**, por el término lesión escamosa intraepitelial. Se ha visto que el **PVH** en lesiones de bajo riesgo puede encontrarse en forma episomal y que el **DNA** de **PVH** puede ser integrado en lesiones de alto riesgo conduciendo más tarde a lesiones precancerosas verdaderas. Sin embargo, el concepto de episomal contra **PVH** integrado no correlaciona siempre con la morfología de la lesión y las bases de la categorización (Syrjänen K y Syrjänen S, 1999).

ORGANISMO HOSPEDERO.

Los Papilomavirus Humano (**PVH**) son estrictamente especie-específicos y el hombre como especie es el único hospedero conocido para el **PVH**, a nivel del hospedero una serie de cuestiones claves deben ser descubiertas para conocer y entender la patogénesis del virus 1) ¿cómo hace el virus para entrar en la célula? 2) ¿dónde se lleva a cabo la replicación inicial? 3) ¿cómo se extiende dentro del hospedero? 4) ¿cuáles órganos y tejidos son infectados? 5) ¿cómo es transmitido el virus? Las tres últimas preguntas tienen alguna respuesta aunque esta sea parcial, las dos primeras de los

mecanismos patogénicos son mas complejas.

COMO SE EXTIENDE EL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN EL HOSPEDERO?

El modo de transmisión no esta completamente claro. Se ha visto que la infección de células de la capa basal con microlesiones pueden jugar un rol muy importante. Las uniones de diferentes tipos de epitelio también se ha visto que predisponen al individuo a este tipo de infecciones, posiblemente por la proximidad de las células en proliferación a la superficie del epitelio en estas zonas, llamadas zonas de transformación (ZT) o metaplasia. Tales regiones se incluyen en el cérvix uterino (una ZT fisiológica), en diferentes tipos mucosales, en el tracto respiratorio superior (cavidad nasal y senos paranasales) y en los bronquios (con un epitelio escamoso metaplásico de fácil irritación) En efecto todos estos sitios son sitios de entrada potencial del virus, donde una ZT es detectada entre dos diferentes tipos de epitelio crea un sustrato favorable para que el virus encuentre su blanco. (Garlik, 1991)

Las infecciones anogenitales con PVH son principalmente transmitidas por contacto sexual. Aunque las infecciones en recién nacidos pueden ser el resultado de malas condiciones higiénicas. Las lesiones Condilomatosas en niños, sin embargo, frecuentemente contienen PVH de tipos regularmente encontrados en otros sitios como la piel, tales tipos son el 2, 27 y 57 (de Villiers, 1994).

El inicio de actividad sexual de manera muy temprana, esta relacionada con infecciones de PVH anogenital en el grupo de edad de entre los 15 y los 40 años (de Villiers, 1987). Alrededor de 15-35% de este grupo de edad contiene cantidades de Ácido Desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés) detectables del virus (de Villiers, 1994). Se ha visto también que el estado socioeconómico puede estar relacionado con la prevalencia de infección con Papilomavirus (PV). En este momento se estima que el número total de individuos infectados es imposible de determinar, solamente algunas pruebas seroepidemiológicas han sido recientemente desarrolladas y su utilidad no ha sido totalmente comprobada.

En mujeres postmenopáusicas, el porcentaje de PVH detectable declina y se mantiene bajo por el resto de su vida (de Villiers; 1987). Normalmente nosotros no

podemos determinar que tanto esto refleja un decremento en el cambio del virus o identificar las infecciones latentes. Debido a las dificultades para obtener tejido confiable de hombres, con propósitos de analizar la presencia del virus, la gran mayoría de estudios epidemiológicos han sido conducidos en mujeres; la persistencia o latencia de este tipo de lesiones en hombres ha permanecido por largo tiempo sin explorar.

De acuerdo con el tropismo preferido por el virus, se pueden identificar dos categorías básicas del virus; cutáneos y de mucosas (Stern ;1994, zur Hausen 1994) este tropismo es preferentemente presente en individuos inmuno-competentes, pero puede encontrarse también en pacientes inmuno-suprimidos. Aparte de la piel y el tracto genital, PV también afecta la mucosa oral, la laringe, traquea y la mucosa senonasal. Así mismo la presencia de PV en células escamosas de la conjuntiva esta bien documentada y esta surgiendo evidencia de la presencia del virus en la mucosa bronquial. (Sirjänen y Sirjänen; 1999).

La infección por papilomavirus a células proliferando activamente puede ocasionar un retraso de la diferenciación o más probablemente de una expansión lateral de la clona infectada (Figura 3). Esto es aparentemente mediado por las funciones de los genes tempranos E6 , E7 y probablemente E5. Durante la fase proliferativa, la replicación del DNA viral y la síntesis de proteínas virales estructurales permanecen detenidas. Sin embargo esto es liberado cuando la célula entra en las capas de diferenciación, en las cuales tiene lugar la replicación del DNA, la síntesis de proteínas estructurales, y el ensamble de las partículas virales. Este modo de infección eventualmente garantiza que la célula inicialmente infectada por PVH pueda dirigir la creación de un cuerpo de células productoras de virus en la superficie del desarrollo de la lesión. Que estas lesiones puedan persistir por periodos prolongados de tiempo ofrece una explicación para el éxito de la disseminación de PVH por todo el mundo.

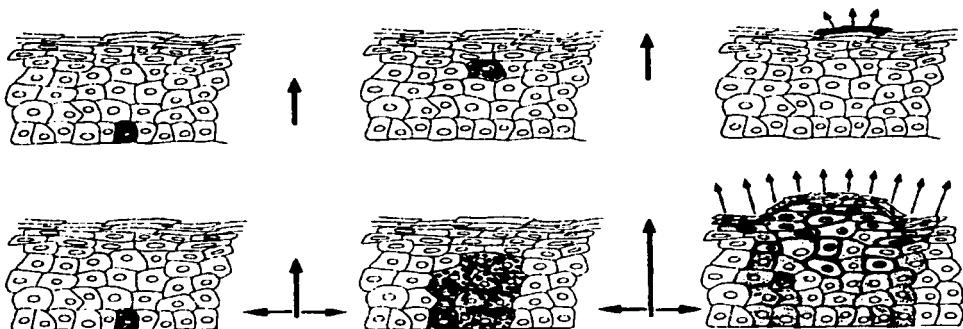


Figura 3. Esquema que puede seguir la infección de PVH en la capa basal de células del epitelio. En el panel Superior se muestra el camino que puede seguir una célula infectada, que inicia la diferenciación sin posteriores divisiones celulares. Panel Inferior Un esquema de eventos representando la consecuencia regular de una infección con PVH: la célula basal infectada (expuesta a la infección vía una microlesión) expande lateralmente, retardando la diferenciación, y eventualmente produciendo numerosas células productoras de virus en la superficie de desarrollo de la lesión (zur Hausen 1994).

Esta última consideración presume un origen clonal de la lesión inducida por PVH. La naturaleza clonal de la proliferación de papilomavirus probablemente depende del número de células proliferando expuestas a la infección y la dosis de virus infectante. Una lesión exponiendo una gran área de células de la capa basal a la infección por PVH, puede resultar en múltiples clones infectados, compitiendo una con otra por la expansión lateral. Esta competencia sugiere un origen policlonal de la lesión eventualmente emergente, mientras que las células de la capa basal expuestas ocasionalmente, deben producir proliferación de tipo monoclonal o bien oligoclonal (zur Hausen;1994).

Obviamente, algunas (probablemente la mayoría) infecciones por PV permanecen clínicamente indetectables.

Se han descrito ocho pasos requeridos para toda infección viral, que se mencionan a continuación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hospedero	Célula
Entrada en el hospedero	Adhesión
Replicación Primaria	Penetración
Extendido a través del hospedero	Desaparición de la cubierta
Tropismo celular y tisular	Transcripción
Respuesta inmune del hospedero	Traducción
Replicación secundaria	Replicación
Lesión celular	Ensamble
Persistencia	Maduración y liberación

Cada uno de los estados o pasos mencionados representa nuevos retos que el virus tiene que sortear para poder pasar al siguiente nivel. Pueden existir dos soluciones mutuamente excluyentes: 1) que el virus complete exitosamente todos y cada uno de los pasos y entonces se manifieste la enfermedad, o bien 2) que el virus falle en estas etapas y entonces esto tendría las siguientes consecuencias, a) Una infección abortiva b) Una infección no productiva y c) una total incapacidad del virus para infectar a la célula. En infecciones con Papiloma Virus estas opciones pueden ser 1) infecciones clínicas (con potencial de transformación maligna) 2) infecciones subclínicas 3) infecciones latentes o 4) no infección. (zur Hausen, 1994, Syrjänen, 1989) Para que el virus sobreviva debe desarrollar mecanismos intrincados para evadir los mecanismos de defensa del hospedero y hacer evidente la enfermedad.

Como se ha enfatizado la manifestación clínica de la infección es una secuela relativamente poco frecuente de la misma, como lo muestra el hecho de que solamente el 1-2% de mujeres sujetas a pruebas de Papanicolaou se ha visto que tienen manifestación clínica de infección por PV (Sirjänen; 1990), comparada con una mayor proporción de gente que tiene DNA viral en su mucosa genital, cuando son examinados por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). En cierta proporción de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pacientes infectados, sin embargo, los mecanismos de control del hospedero fallan para evitar que el virus complete todos los pasos en esta patogénesis, resultando lesiones clínicas y en una pequeña fracción de estos casos, transformación de las células a un genotipo maligno (Stern et al., 1994; zur Hausen, 1994). El mayor reto es investigar el mecanismo primario para este resultado adverso, y entender cual es el mecanismo por el que revierten las infecciones con los virus de bajo riesgo.

EXPRESIÓN DE GENES DE PAPILOMA VIRUS

La infección viral inicial, como ya se mencionó, se lleva a cabo en la capa basal del epitelio escamoso, donde una combinación de factores de transcripción interactúan con la Región Larga de Control (LCR por sus siglas en inglés) del Papilomavirus, iniciando la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7. Los oncogenes E6 y E7 alteran el ciclo celular por su interacción e inactivación de proteínas supresoras de tumor o antioncogenes: E6 se une y degrada la proteína p53 y E7 se asocia con p105 RB. E1 y E2 son las siguientes proteínas en sintetizarse. E2 bloquea la transcripción temprana y permite la unión específica de E1 al origen de replicación (ori) localizado en la LCR, iniciando la replicación del genoma viral. E2 induce una baja expresión de E6 y E7 liberando las proteínas p53 y pRB, para que el proceso de diferenciación pueda continuar. Así mismo un promotor putativo tardío puede activar los genes de la cápside L1 y L2. En este momento, los viriões maduros pueden ser detectados en las capas superiores del epitelio. (Ver figura 4)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

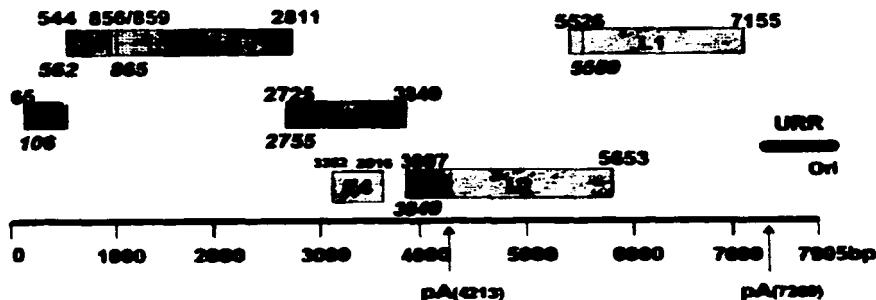


Figura 4. Diagrama esquemático de la organización genómica de PVH tipo 16. Los genes tempranos están representados con la letra E. Los genes tardíos con la letra L. Ori representa el origen de replicación y URR la región larga de control. Las señales de poly A+ para los genes tempranos y tardíos se representan como pA.

La ruptura de E2 es frecuentemente asociada con las neoplasias genitales malignas. En ausencia de E2, E6 y E7 permanecen expresándose constitutivamente, sosteniendo la inmortalidad de las células infectadas y bloqueando el programa de diferenciación celular. Diversos estudios de Hibridación *In Situ* (HIS) han mostrado que el patrón de expresión de los genes varía de acuerdo con el grado de lesión clínica. En lesiones benignas, E4 y E5 son las más altamente expresadas, mientras que la expresión de E6, E7 y E2 es baja (Crum., 1988b; Sherman, 1992). Por el contrario E6 y E7 son altamente expresadas en lesiones de alto grado. La siguiente tabla (Tabla 1) resume el tamaño y la función de los genes de Papiloma virus y su interacción con proteínas celulares.

Tabla I Tamaño y función de productos de Papiloma Virus

**Proteínas
Tempranas**

E1	649	Replicación viral, mantenimiento episomal
E2	365	Replicación y Transcripción viral, Transformación
E4	92	Unión a citoqueratinas
E5	83	Afecta el receptor del factor de crecimiento epidermal y el receptor β del factor de cre- cimiento derivado de las plaquetas p123 (PDGF)
E6	15	Proteína Transformante, se une a p53 Trans-activa
E7	98	Proteína transformante, se une a Rb1, p107, p130, y ciclina AICDK2

**Proteínas
Tardías**

L1	505	Proteína mayor de la cápside
L2	473	Proteína menor de la cápside

ONCOGENES VIRALES Y SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS SUPRESORAS DE TUMOR

Proteína E5

La proteína E5 mejor caracterizada es la del Papilomavirus Bovino tipo 1 (PVB-1) la cual es capaz de transformar eficientemente fibroblastos en ausencia de otros oncogenes virales. (Auvíñen;1997). E5 de PVB es una proteína hidrofóbica de 44 aminoácidos con, 1) una región amino- terminal de 30 aminoácidos hidrofóbica la cual funciona como un dominio transmembranal y, 2) un extremo carboxi-terminal de 14 aminoácidos hidrofílico que contiene dos residuos de cisteína esenciales para la formación de homodimeros (Sparkowski; 1996).

E5 induce transformación celular aparentemente via la ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento de la tirocina cinasa. Su actividad transformante es frecuente pero no invariante, referida cuando el dominio hidrofóbico es reemplazado por una secuencia de tamaño similar de aminoácidos hidrofóbicos no derivados de la secuencia silvestre de E5, sugiriendo que la función primaria de este dominio de E5 es la unión de la molécula a las membranas celulares (Meyer;1994).

E5 de PVB-1 forma complejos triméricos con una proteína de 16 KDa formadora de poros componente de la ATPasa vacuolar y el receptor β del factor del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Conrad; 1993). La actividad oncogénica de E5 es mediada principalmente por receptores de factores de crecimiento (GFRs) en particular al receptor β de PDGF. De este modo la proteína E5 puede interferir con el metabolismo y actividad de receptores de factores de crecimiento epidermal exógeno (EGFRs) en algunos , pero no en todas las líneas celulares establemente transformadas (Petti; 1994).

La información disponible del gen E5 en lesiones inducidas por PVH es considerablemente menor. El marco de lectura abierto (ORF) de E5 es transcrito como un RNA policistrónico del promotor viral temprano en la posición p97. Johnsen (1995) encontró que la síntesis de la proteína E5 de PVH tipo 16 puede únicamente ser iniciada de un auténtico codón ATG en la presencia del ORF de E2 traducido. Esto sugiere que la proteína E5 es sintetizada coordinadamente con la proteína E2. Grassman (1996) fue capaz de encontrar en una Neoplasia Intraepitelial Vulvar con múltiples copias de PVH

16 en forma episomal una nueva especie de RNA mensajero iniciado aproximadamente en el nucleótido 670. Este promotor se ha visto que es específico para células que se encuentran en diferenciación.

Utilizando análisis de secuencias de aminoácidos de la proteína E5 de PV se ha predicho que la proteína es extremadamente hidrofóbica y poco conservada entre los diferentes tipos de proteína E5. Se ha visto que cuando PV se integra, el ORF de E5 se desconecta del promotor a consecuencia de la ruptura del genoma viral circular en el ORF de E1-E2, o puede también ser deletado como en las células HeLa. Sin embargo las diferentes proteínas E5 tienen residuos de aminoácidos específicos tales como prolinas y cisteínas. La expresión continua de E5 puede ser importante para el mantenimiento del fenotipo maligno. Se ha sugerido que para la formación del tumor se debe eliminar el ORF E5, pero todavía no hay suficientes datos experimentales para sostener esta hipótesis (Bubb; 1988). Poco se conoce sobre la expresión de E5 en lesiones inducidas, esto debido a la carencia de anticuerpos anti-E5 confiables. La expresión de E5 se ha visto que es mas intensa en condilomas y en lesiones intraepiteliales escamosas (SIL por sus siglas en inglés), que en carcinomas del cérvix. Recientemente se ha descrito homología entre el ORF de E5 de PV tipo 18 y secuencias genómicas de humano y ratón. Kahn (1992) describió dos transcritos relacionados con E5 de PV-18 en secuencias de ratón, en células HC1 y Q300, Geisen (1995) encontró el equivalente humano de estas secuencias, aislando una clona de 9.6 Kilobases (Kb) con un inserto de 633 pares de bases (pb) de una librería de DNA de carcinoma de laringe que en ensayos de hibridación cruza consistentemente con ambas secuencias E5 de PVH tipo 18 y HC1. Análisis de restricción y de Southern Blot (SB) mostraron que este inserto de 633 pares de bases es una secuencia de copia simple sin rearrreglo o secuencias virales. La región relacionada con E5 es transcrita produciendo un RNA de 1.9 Kb detectando el Poly A+ de diferentes líneas celulares probadas, alineamiento de secuencias presentan estrechas similitudes con secuencias de células Q300 (Khan; 1992) así como con diferentes factores de crecimiento y factores virales. El correspondiente gen humano fue llamado PE5L, y fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 7, a 7p13-14 determinado por HIS. Esta región similar a E5 puede constituir un blanco de integración, los cuales son frecuentemente localizados cerca de los puntos de ruptura, oncogenes, etc.

La actividad transformante de E5 ha sido demostrada en queratinocitos de ratón, en queratinocitos humanos, así como un aumento en la estimulación del crecimiento en cultivos primarios de células epiteliales de riñón de rata, en cooperación con E7 de PVH tipo 16 (Bouvard;1994)

En células 3T3 de ratón, la expresión de los receptores al Factor de Crecimiento Epidermal (EGF por sus siglas en Inglés), es requerida para la transformación con la proteína E5 de PVH tipo 16 y el fenotipo transformado es aumentado por el tratamiento con EGF (Pim;1992). Recientemente se vió que E5 de PVH-16 actúa en cooperación con EGF en queratinocitos humanos, y verdaderamente fue capaz de inhibir la degradación de EGFR en el compartimiento endosomal después de la endocitosis estimulada por el ligando, dando como resultado la retención prolongada de EGFR en vesículas intracelulares. El EGFR muestra un incremento de la fosforilación de la tirocina en respuesta al tratamiento con EGF. Leechanachai (1992) encontró que células transformadas con E5 de PVH tipo 16 con crecimiento independiente del anclaje tienen una habilidad mayor que otros tipos celulares, para expresar el gen c-fos en respuesta a estimulación con EGF.

Los complejos de c-fos/c-jun constituyen el factor de transcripción AP-1, y el promotor de PVH tipo 16 tiene secuencias en las que se une el factor AP-1, el cual es más activo en células expresando E5 (Bouvard ; 1994). Se ha visto que E5 de PVH tipo 11 y tipo 16 esta asociada quizá indirectamente con el Factor Nuclear 1 (NF-1) en la transactivación del promotor de c-fos humano (Chen;1996).

La ruta de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP cinasa, a la cual nos referiremos en lo sucesivo como MAP-C) es una cascada de señalización intracelular la cual media la respuesta celular a factores de crecimiento y diferenciación. El gen E5 induce un aumento en la actividad de MAP-C en ausencia o presencia de EGF. En comparación las oncoproteínas E6 y E7 no alteran la prolongada actividad inducida por EGF. La proteína E5 de PVH-11 y PVH-16 suprime la expresión del gen supresor de tumor p21 (waf1/sdi1/cip1) en células NIH 3T3 y queratinocitos humanos inmortalizados (Tsao;1996). La represión de la actividad del promotor de p21 por una serie de mutantes de E5 fue correlacionado con su respectiva actividad transformante, y este puede ser un mecanismo de oncogenicidad mediada por la promoción del crecimiento, donde la

expresión de c-jun también dirige una reducción de los niveles de RNA y proteína de p21 en queratinocitos.

La proteína E5 de PVH-6 también transforma células de roedor en la presencia de EGFR, pero existen diferencias en la unión con el receptor, comparado con la unión de E5 de PVH-16, esto puede ser debido a la distinta morfogénesis de sus respectivas lesiones neoplásicas (Conrad;1994).

Stoppler (1996) demostró que E5, por acción en cis, incrementa de 4 a diez veces la eficiencia de inmortalización celular por E6/E7. Estos experimentos aumentaron el conocimiento de la transformación celular inducida por PVH, lo cual indica claramente que los niveles relativos de EGF y su receptor pueden afectar significativamente el éxito de la infección con PVH (Piccini;1997). Cohen mostró (1993) que E5 formó complejo con algunas quimeras del receptor del factor de crecimiento dependiente de las plaquetas (PDGFR por sus siglas en ingles) que contienen un dominio transmembranal (o un dominio EGFR citoplásmico). Esto sugiere que aunque diferentes dominios de PDGFR y EGFR son requeridos para la activación de E5, ambos receptores son activados directamente por formación de un complejo conteniendo E5. Los rasgos estructurales mínimos requeridos por la transformación con la oncoproteína E5 es una cadena de aminoácidos del dominio hidrofóbico transmembranal que participa en la formación de puentes de hidrógeno entre las hélices. La actividad biológica de mutantes de E5 carentes de la mayoría de los aminoácidos similares a PDGF sugieren que E5 y PDGF activan el PDGFR por distintos mecanismos (Petti;1997).

Para concluir diremos que la proteína E5 tiene diversos efectos biológicos y bioquímicos sobre células, así como interacción con algunas proteínas celulares. E5 de papilomavirus se ha visto que activa el receptor β del PDGF y afecta el metabolismo de EGFR. Se ha mostrado que E5 puede formar complejos con la proteína celular p125, determinada como un miembro de la familia de las α -adaptinas.(Syrjänen;1999)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROTEINA E6

La proteína E6 es la proteína con mayor capacidad transformante de algunos tipos de PV. E6 por si sola es incapaz de inmortalizar queratinocitos humanos (Sedman;1991), pero es capaz de inmortalizar células epiteliales humanas en cultivo (Band;1990). E6 de PVH es una proteína básica que contiene dos sitios de unión de zinc en el extremo C-terminal. La proteína E6 mejor caracterizada es aquella de PV de alto riesgo, por ejemplo E6 de PV tipo 16 y tipo 18. Ver figura 5.

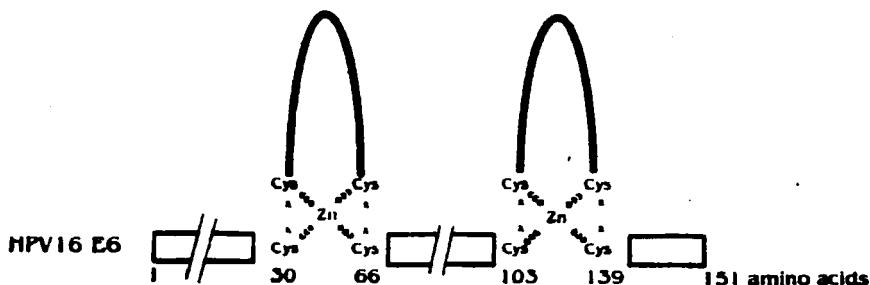


Figura 5. Estructura de la proteína E 6 de PVH tipo 16 Tomado de Syrjänen 1999

E6 puede formar complejos *in vitro* con el producto del gen supresor de tumor p53 (Werness;1990), presentando similitudes a este respecto con la proteína E1A de Adenovirus y con el antígeno T grande de SV 40.

La formación del complejo E6-p53 requiere de una proteína adicional llamada proteína asociada a E6 (E6-AP), este complejo dirige la completa degradación de p53 (Huibregtsse;1991). E6 se une directamente a la proteína E6-AP la cual funciona como una ligasa a la proteína ubiquitina. La degradación de p53 tiene lugar a través de la ruta dependiente de la ubiquitina, la cual involucra la activación de la proteína E2 conjugada a ubiquitina con la enzima E1 activadora de ubiquitina, y transferencia de ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína blanco (Hochtrasser;1995).

Mutantes de E6 son capaces de unirse a p53 pero disminuye su capacidad para

mediar su degradación (Dalal;1996). E6 puede formar un complejo con p53 en ausencia de E6-AP, sin embargo esta interacción es mas débil que con E6-AP (Lechner;1994).

El sitio de unión para E6 dentro de p53 es aún desconocido. Diferentes regiones de p53 parecen estar involucradas, además la conformación de p53 es importante para la formación del complejo (Kubbutat;1996). Pim (1997) reporto que E6* de PVH tipo 18 puede interactuar con la proteína E6 de los PVH tipo 16 y 18 completas así como con E6-AP, y subsecuentemente bloquea la asociación de E6 completa con p53. También mostraron que como resultado del bloqueo E6* puede inhibir la degradación de p53 mediada por E6 *in vitro* e *in vivo*. Las consecuencias biológicas de esto son 1) un incremento en la actividad transcripcional de promotores responsivos a p53 y 2) una inhibición del crecimiento celular en células transfectadas con E6*. Esto puede representar un mecanismo por medio del cual PVH pueda modular la actividad de la proteína E6 completa con respecto a p53 durante la infección del virus.

Además de p53, E6 puede unirse a otros blancos celulares, tal como E6-BP, la cual es idéntica a la proteína que une calcio ERC 55 (Chen;1995). Klingelutz (1996) mostró que E6 de PVH tipo 16 puede activar la telomerasa, la cual esta involucrada con la inmortalización celular. Esta activación se ha visto que esta relacionada con el tipo celular, y se ha visto en queratinocitos de prepucio humano y en células epiteliales de mama, pero no en cultivos primarios de fibroblastos.

E6 puede trans-activar la expresión de promotores heterólogos independientemente de p53 (Desaintes;1995) y puede reprimir la transcripción de otros promotores (Etcheid;1994). Kiyono (1997) demostró que la proteína E6 puede unirse a un segundo dominio PDZ del gen humano homologo al supresor de tumor de los discos grandes de *Drosophila* (hDLG) a través de su dominio C-terminal.

Mutantes de E6 pierden la capacidad de unirse a hDLG y no son capaces de inducir la transformación dependiente de E6 en células de roedor. En otros estudios recientes, se domostró que E6 tiene capacidad transformante adicional e independiente de p53 (Kinochita;1997). E6 fue capaz de trans-activar o reprimir algunos promotores virales específicos. Mostrando que E6 puede trans-activar al promotor de c-myc independientemente de p53.

PROTEINA E7

E7 es una pequeña fosfoproteína nuclear con una secuencia que une zinc localizada en su extremo C-terminal, la mitad de la cual es importante para estabilizarla y para su dimerización. (Figura 6). La región N-terminal contiene 2 regiones conservadas, CR1 y CR2, las cuales tienen secuencias similares a E1A de adenovirus y T grande de SV40. Ambas regiones son importantes para la transformación *in vitro*. Mutaciones en esta región destruyen la capacidad transformante de la proteína.

La secuencia LXCXE, localizada dentro de CR2 (residuos 22-26) incluyen el sitio de unión para el producto del gen supresor de tumor retinoblastoma p105RB y las proteínas relacionadas p107 y p130 (Kubbutat;1996). Los residuos de serina en la posición 31 y 33 pueden ser fosforilados. Estos sitios fosforilados son necesarios para la transformación eficiente pero no para la unión de RB.

La unión de E7 a la forma hipofosforilada de RB, libera el factor de transcripción E2F. La secuencia de unión a E2F ha sido encontrada en algunos genes celulares involucrados en proliferación celular: timidina cinasa, dihidrofolato reductasa y DNA polimerasa α .

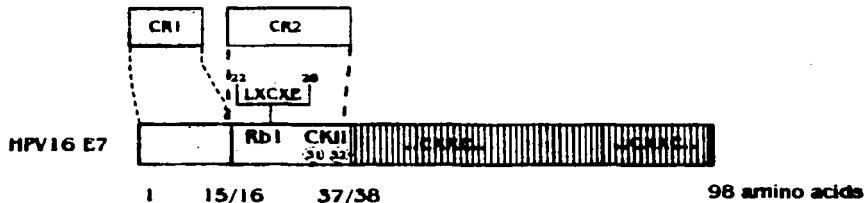


Figura 6. Estructura de la proteína E7 de PVH tipo 16

Para una eficiente inmortalización de queratinocitos se requiere la cooperación de E6 y E7. E7 de PVH (pero no E6) puede inmortalizar queratinocitos humanos, solo cuando se expresa en niveles altos (Sedman, 1991). La proteína E7 de PVH de bajo riesgo puede también unir a RB pero con baja afinidad. E7 de PVH tipo 1 de bajo riesgo puede unirse a

RB con la misma afinidad que E7 de PVH tipo 16, indicando que otro mecanismo de unión a RB tiene importancia para la transformación maligna con E7 (Ciccolini;1994).

E7 puede también asociarse con otras proteínas mitóticas, por ejemplo el complejo cdk/ciclina E/A. Esta unión se ha visto que depende de la unión de E7 a p107, pero E7 puede unirse también directamente a la ciclina A (McIntyre;1996). Recientemente se mostró que E7 puede interactuar con los miembros de la familia del factor de transcripción AP-1 por ejemplo con c-jun, jun B, jun D y c-fos dirigiendo la sobreexpresión de promotores responsivos a AP-1, estas interacciones pueden ser importantes par el mantenimiento de la malignidad (Antinore;1996).

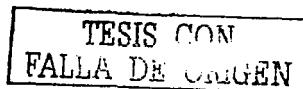
Datos recientes muestran que la proteína E7 de PVH se une a la proteína de unión a la caja TATA (el factor de transcripción TBP), así como E6 de PVH tipo 18 y E2 de PVH tipo 16 se unen subsecuentemente a TBP *in vitro* (Massimi;1997).

Un análisis mutacional de la proteína E7 de PVH tipo 16 identificó un segmento de cuatro aminoácidos responsables de la unión a TBP. Estas mutantes de la proteína E7 poseen niveles de actividad transcripcional semejantes a la proteína silvestre sobre el promotor E2 de adenovirus, pero exhibe actividad transformante reducida en cooperación con EJ ras. El mecanismo de interacción entre las diversas proteínas E7 y TBP puede ser similar, y esta interacción de E7 puede contribuir a su actividad transformante (Massimi;1996).

Tomando en cuenta los reportes de ambas proteínas, E6 y E7, se puede concluir que son proteínas importantes para la transformación celular y la regulación del ciclo celular, permitiendo la proliferación continua de la célula huésped. Los cánceres humanos están caracterizados por las fallas en los puntos de revisión (check point) del ciclo celular, resultando inestabilidad genómica. Claramente las oncoproteínas E6 y E7 de PVH de alto riesgo son capaces de alterar la integridad de estos check points.

ONCOGENES CELULARES

En años recientes el estudio de la oncología molecular está integrando todos los conocimientos generados por Bioquímicos, Biólogos Moleculares, Virólogos etc., para



comprender el origen y desarrollo de los procesos cancerosos, lo cual ha permitido plantear una hipótesis unificada y plausible del origen del cáncer que integra la multiplicidad de sus causas iniciales. La naturaleza de los eventos genéticos, los cuales están asociados con transformaciones malignas hasta la fecha no se comprende completamente.

Se sabe que las células de mamíferos contienen aproximadamente 50,000 genes, entre los que se incluye la familia de los oncogenes y los proto-oncogenes. Los oncogenes son versiones alteradas de sus genes normales, los proto-oncogenes, los cuales codifican para proteínas que desempeñan funciones de gran importancia para la célula. Es muy prometedor el hecho de que el estudio del cáncer pudiera limitarse al estudio de un grupo relativamente pequeño de genes. Ahora se entiende cómo funcionan algunas de las proteínas codificadas por algunos proto-oncogenes, estos estudios han mostrado que las proteínas proto-oncogénicas realizan funciones específicas. Codifican para factores de crecimiento, receptores a dichos factores, transductores de señal y proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción o de replicación, activando genes importantes en el crecimiento normal de la célula. Por ejemplo las proteínas de la familia Ras se localizan en la membrana citoplasmática y participan en la transducción de señales, por otro lado la proteína Myc se localiza en el núcleo y participa tanto en la replicación del genoma celular como en la regulación de la transcripción genética (Sears;2000).

Debido a que los oncogenes representan formas mutadas de genes celulares normales, ellos ofrecen una indicación clara de los blancos genéticos que se alteran por los cancerígenos. Entre las alteraciones más frecuentes que activan a los proto-oncogenes tenemos: mutación, rearrreglo génico y amplificación génica: frecuentemente un proto-oncogén puede presentar más de una de estas alteraciones genéticas. Aunque las translocaciones y mutaciones puntuales son los mecanismos más comunes para la generación de alelos oncogénicos en muchos cánceres humanos, en otros tipos tumorales tales como glioblastomas, neuroblastomas, cáncer cérvico-uterino y mamario, un mecanismo común de activación de proto-oncogenes es la amplificación.

¿CÓMO SE ACTIVAN LOS PROTO-ONCOGENES?

Los proto-oncogenes como ya se mencionó pueden ser alterados por diversos factores genéticos o ambientales con los que estamos en contacto cotidiano. Los principales tipos de alteración que sufren estos proto-oncogenes son:

- **Amplificación génica.** La amplificación génica es un evento muy común en células tumorales. Muchas líneas celulares tumorales tienen visibles regiones de amplificación cromosomal, las cuales son mostradas por las regiones de tinción homogénea a los dobles minutos(Brodeur;1986). En algunos casos las regiones amplificadas contienen a conocidos oncogenes, esto ha sido demostrado por ensayos de hibridación, aunque la amplificación no es necesariamente visible, esto repercute en el aumento en la concentración del producto oncogénico, el cual promueve el crecimiento y la proliferación celular.
- **Rearreglo génico.** Frecuentemente en las células cancerosas aparecen alteraciones cromosomales, por ejemplo, un segmento en el extremo de un cromosoma se intercambia con otro segmento de otro cromosoma (proceso conocido como translocación cromosomal), cuando esto sucede, los genes presentes en cualquier segmento llegan a ser gobernados o influidos por factores que anteriormente les eran extraños. Esto produce la falta de regulación de un grueso paquete génico en el cual puede incluirse un oncogén. Una de las translocaciones más frecuentes en los procesos cancerosos es la que ocurre con segmentos de los cromosomas 8 y 14 que se asocia con el linfoma de Burkitt, cáncer del tejido linfoide. Esta translocación hace que el oncogén myc que se encuentra en el cromosoma 8, sea intercambiado por el que codifica para la cadena pesada de las inmunoglobulinas, que se encuentra en el cromosoma 14.
- **Mutaciones Puntuales.** En algunas ocasiones los oncogenes sufren mutaciones puntuales, esto es, cambio de alguno de sus elementos estructurales (nucleótidos) por otros diferentes, en estos casos la cantidad de proteína oncogénica es normal,

pero con algún aminoácido diferente. Por ejemplo, la proteína Ras que tiene 189 aminoácidos , generalmente experimenta una mutación puntual que afecta a los aminoácidos 12 y 61 (Wierensa;1983). Este hecho modifica la señal de la proteína que ahora induce una señal continua hacia el interior de la célula y la producción de un fenotipo transformado, no dependiente de factores externos.

- **Deleción.** Este tipo de mecanismo no es muy frecuente. En el desarrollo de los tumores de riñón de Wilms, no ha sido involucrado un oncogén, aunque la pérdida de ciertos genes sobre el brazo corto del cromosoma 11 ocurre, además, ciertas evidencias indican que la deleción es una predisposición seguida por los alelos retenidos en las células tumorales, de esta forma genes recesivos pueden ser expresados. Otro ejemplo es el caso de los retinoblastomas, tumor del ojo. Este tumor es poco frecuente, pero sirve de modelo para muchos otros tipos de cáncer con los que no guarda relación alguna. En estos casos existe una deleción en el brazo q del cromosoma 13 no solo en las células tumorales sino en todas las células normales del organismo.

EL ONCOGÉN c-myc

El gen c-myc consta de tres exones, separados por dos largos intrones, localizados en el brazo largo (q) del cromosoma humano 8 (Gazin;1984). El RNAm de los exones 2 y 3 de myc codifican para una proteína de 439 aminoácidos. La expresión del gen c-myc depende de factores de crecimiento y aumenta con la entrada de las células en el ciclo celular, sugiriendo que la expresión de este gen puede ser un componente de la proliferación celular normal. En la región amino terminal de las proteínas Myc (N-Myc, c-Myc, L-Myc), existen importantes dominios: un dominio de activación transcripcional (aminoácidos 1 al 143); una región de la inhibición de la diferenciación y una región que determina la unión a la proteína codificada por el gen retinoblastoma del aminoácido 41 al 178. La región carboxi terminal presenta una región básica seguida de una región con estructura helicoidal y un cierre de leucinas; estas regiones son fundamentales en la unión

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de Myc al DNA (secuencia CACGTG) y en la dimerización de la proteína. Las interacciones entre proteínas oncogénicas (Myc) y antioncogénicas (pRb) pueden tener importancia en el control transcripcional de genes relacionados con proliferación celular. La proteína Myc interactúa además con otras proteínas (tales como Max) para controlar la transcripción de algunos genes: las proteínas Mad y Max juegan un papel crítico en dicho control. Los heterodímeros que se forman con la proteína Max se unen a la secuencia CACGTG, presente en algunas regiones promotoras. Se ha determinado que una sobreexpresión de Myc lleva al cambio de los homodímeros Max-Max a heterodímeros Myc-Max cambiando una represión génica en una activación (Dang;1995). Así mismo para que Myc induzca apoptosis (muerte celular programada) requiere de la interacción con Max. La proteína Mad también interactúa con Max, pero no con Myc; Mad y Myc compiten por la unión a Max, siendo el complejo Mad-Max un represor transcripcional. Mad podría ser una proteína antioncogénica, ya que actúa oponiéndose a la función proliferativa de Myc. Además de participar en la transcripción de genes que controlan el crecimiento celular, recientemente se ha determinado que c-myc induce apoptosis en fibroblastos privados de suero y en otras líneas celulares que están bloqueadas en proliferación por drogas o citocinas antiproliferativas.

En lo que se refiere a el CaCu, hace varios años el grupo del Dr. Gariglio determinó que oncogenes celulares (por ejemplo myc) se encuentra alterado en un porcentaje grande de los tumores de CaCu. (Gariglio;1987, Ocadiz;1987).

TESIS CON
FALLA DE URGEN

OBJETIVOS

TESIS CON
FALLA DE URGEN

En base a todo lo anterior planteamos el siguiente :

Objetivo general

Determinar la presencia de PVH tipo 16 así como la expresión del oncogén c-myc en muestras de tejido cervical.

Objetivos Especificos

- 1) Obtención de muestras de tejido cervical provenientes de pacientes con lesión premaligna y maligna del cervix.
- 2) Evaluar el estado de las secuencias del gen c-myc en lesiones cervicales utilizando la técnica de Southern Blot.
- 3) Determinar la presencia de PVH tipo 16 por medio de la técnica de Southern Blot.
- 4) Evaluar la expresión del oncogene c-myc por medio de un análisis inmunohistoquímico en las muestras de tejido cervical.

Hipótesis

Si las secuencias del gen c-myc se encuentran alteradas de manera gruesa (amplificadas y/o rearmgladas) y hay presencia de secuencias de Papilomavirus Humano tipo 16 en lesiones cervicales, entonces podrán ser determinadas por ensayos tipo Southern Blot, así mismo. por la técnica de inmunohistoquímica podremos evaluar la presencia de la proteína myc en estas lesiones.

TESIS CON
FALLA DE CARGEN

MATERIAL Y METODOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS.

BIOPSIAS

Las muestras estudiadas fueron colectadas en la Clínica de Displasias de la Unidad de Oncología del Hospital General de México, de la Secretaría de Salud (S.S.) y en la Clínica No.4 de Ginecología y Obstetricia del Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S). Las muestras de tejido sano y precanceroso fueron biopsias dirigidas (en espejo, y en promedio 10 mm^3) por Colposcopia del tracto genital femenino, de pacientes canalizadas a la Clínica de Displasias por una citología anormal. Las muestras de tejido canceroso fueron obtenidas de piezas post-operatorias (histerectomía radical, en promedio 20 mm^3). Todas las muestras fueron de pacientes que no habian sido tratadas por Quimioterapia o Radioterapia. Después de la toma de muestra algunas de ellas fueron divididas en tres porciones: una porción fue enviada al departamento de Patología para su diagnóstico y clasificación histopatológica, otra fue fijada en Metacarnoy (60% de metanol, 30% de cloroformo y 10% de ácido acético) por ocho horas a temperatura ambiente. En seguida el tejido se deshidrato y se incluyo en parafina por métodos convencionales para posteriormente realizar cortes histológicos de cinco micras de grosor, y el tercer fragmento se congeló a una temperatura de -70°C para su posterior tratamiento en la extracción de DNA (Figura 7).

EXTRACCIÓN DE DNA DEL TEJIDO.

El DNA total fue extraído de acuerdo con el método de Gross-Bellard (1973) con algunas modificaciones.

Se homogeneizó el tejido congelado en solución amortiguadora PBS 1X a 4°C y fue lavado dos veces con la misma solución, centrifugando a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se resuspendió la pastilla obtenida en solución de lisis hasta tener una concentración final de 20mM de Tris-HCl; 300mM de Acetato de sodio; 1mM de EDTA. Inmediatamente se añadió Proteinasa K a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de solución y 0.2% de SDS, para la hidrólisis de las proteínas, se incubó

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

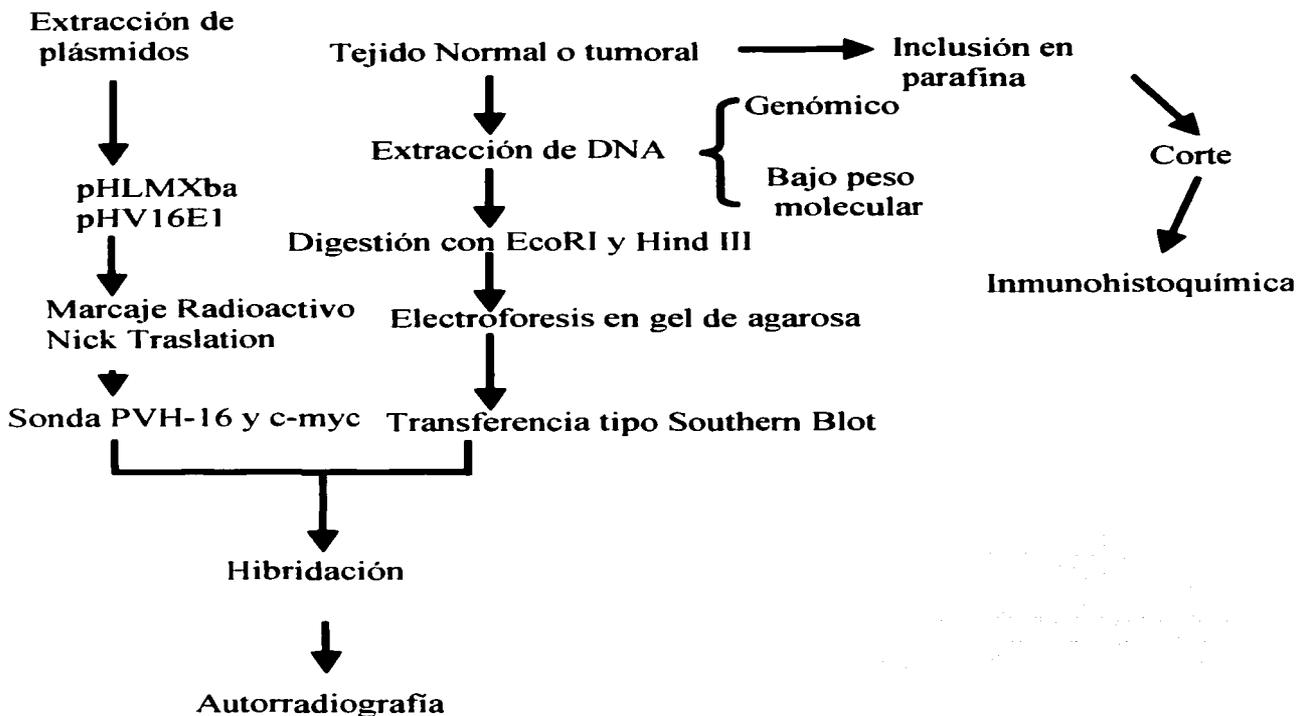


Figura 7. Esquema general para el análisis de las secuencias del oncogene *c-myc* y del PVH tipo 16 en muestras de lesión cervical. pHLMXba usado como sonda para *c-myc*, E1 usado como sonda para PVH tipo 16.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

durante 16 horas a 37°C. Después de la digestión, la muestra fue tratada dos veces con un volumen de fenol saturado con 10mM de Tris-HCl, la fase acuosa obtenida fue tratada dos veces con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción de 24:1 en volumen.

Se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto a una temperatura de -20°C a la fase acuosa dejándose toda la noche a la misma temperatura. Posteriormente se centrifugó a 8000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla obtenida (DNA) se lavó con etanol al 70% y se secó en un desecador al vacío, finalmente se resuspendió en agua y se almacenó a 4°C.

EXTRACCIÓN DE DNA DE BAJO PESO MOLECULAR

Para la extracción de DNA de bajo peso molecular se siguió el método descrito por Hirt (1967). Se homogeneizó el tejido como se describió en la sección anterior. Posteriormente se resuspendió el tejido en solución Hirt (Tris-HCl 10 mM pH 7.9; EDTA 10 mM y SDS 0.6%) se agito perfectamente y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Transcurrido este tiempo se ajustó a una concentración final de 1M de NaCl, y se agitó suavemente. La mezcla se mantuvo a 4°C durante 16 horas, posteriormente la mezcla se centrifugó a 8000 rpm a 4°C durante 1 hora a fin de precipitar el DNA celular.

Se recuperó el sobrenadante, se le adicionó un volumen igual de fenol saturado con amortiguador TE y se dejó reposar por 5 min. Después de mezclar, se repitió este paso durante tres ocasiones para finalmente precipitar el DNA como se mencionó en la sección anterior.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AISLAMIENTO DE LOS PLÁSMIDOS pHLMXba, pRyc7.4, E2/PVH16

Se realizó una preparación (Ver apéndice I) de la cepa pRyc7.4 para extraer el plásmido Ryc 7.4 el cual fue purificado por un gradiente de densidad isopícnico de Cloruro de Cesio (Ver apéndice I) y posteriormente se restringió con la enzima de restricción EcoRI para purificar el inserto de cDNA de myc (con un kit de Boehring para aislar DNA de agarosa Ver apéndice I) y se empleo para realizar el marcaje con isótopo radioactivo. Todos los demás plásmidos empleados se purificaron de la misma manera, se restringieron con las enzimas adecuadas (ver la siguiente tabla) para cada caso y se marcaron radioactivamente con la misma técnica para usarse como sonda en cada caso. (Ver apéndice I)

Reacciones de Restricción

	pRyc7.4	pHLMXba	pE2/PVH16
Plásmido (10µg)	Volumen de acuerdo a la concentración del plásmido		
Buffer 10X	1X	1X	1X
Agua bidestilada	Volumen de acuerdo al volumen del plásmido		
Enzima (10U/µl)	1U/µl		1U/µl

Nota: El volumen final de las reacciones depende siempre de la concentración del plásmido

Estas reacciones se realizaron a 37°C, posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1 % para corroborar la liberación de los insertos. Es oportuno señalar que el volumen utilizado para el gel es la décima parte del volumen total que se pone a restringir. Las condiciones de reacción se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante de cada enzima de restricción.

SONDAS

Se uso el plásmido pHLMXba donado por el Dr. D. Stehelin (Instituto Pasteur, Lille Francia) para detectar el gene c-myc; este plásmido contiene un fragmento de 3.5 Kpb del oncogene c-myc (incluyendo el primer exón). Un plásmido conteniendo el segundo y tercer exón llamado Ryc 7.4 también se empleó. Para los ensayos de PVH tipo 16 usamos el plásmido pHPV 16/E1 donado por el Dr. K. Seedorf que contiene el fragmento EcoRI-EcoRI del genoma del PVH tipo 16 (Ver figura 8). Estos plásmidos se purificaron de acuerdo como se describió anteriormente (Sambrook;1989) y se marcaron con α -dCTP-P³² por la técnica de Corte, Eliminación y Sustitución (Nick Translation), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

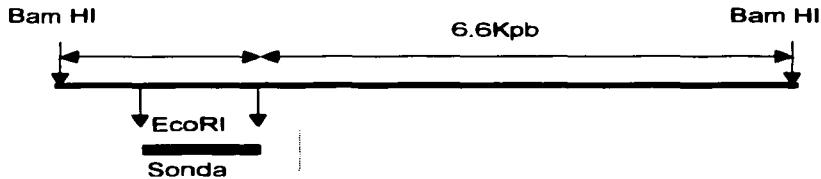
ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA MARCAJE E HIBRIDACIÓN DEL DNA GENÓMICO.

El gen c-myc se encuentra flanqueado por los sitios de restricción EcoRI (fragmento de 13Kpb) y Hind III (fragmento 12Kpb). Ver Figura 8. El DNA de tejido normal y tumoral fue digerido con estas enzimas de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes (Gibco-BRL o New England Biolabs). Después de la digestión a 37°C toda la noche, los DNAs fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 0.9%, y transferido a filtro de Nylon o nitrocelulosa (Amersham) básicamente como lo describe Southern (1975). Los insertos de los plásmidos previamente marcados por la técnica de Corte, Eliminación y Sustitución (Nick Translation) (Ver Apéndice I) y los filtros de Nylon fueron hibridados como lo describió Sambrook (1989). La actividad específica para las sondas fue de $2-4 \times 10^8$ cpm/ μ g de DNA. Los filtros fueron prehibridados en 50 % de formamida durante 24 horas a 42°C, para hibridación en condiciones estrictas (astringentes), entre $1-2 \times 10^8$ cpm/0.5 μ g/filtro (200cm²) fueron agregados a cada filtro e incubados durante 24 horas a 42°C. Al final de la hibridación los filtros fueron

lavados en 2X SSC; 0.1X SSC y 0.1X SSC + 0.1 % de SDS a 55°C, se seca el filtro y se deja exponiendo con una placa de autorradiografía Kodak X-Omat a -70°C por un lapso que varía dependiendo de la actividad específica de la sonda entre 1-10 días. Las autorradiografías fueron analizadas en un espectrofotómetro-densitómetro marca Beckman modelo DU-7. Los mismos filtros usados para detectar alteraciones de c-myc fueron usados para detectar secuencias de Papilomavirus tipo 16 (Ver Figura 13).

PVH tipo 16

A



Oncogene c-myc

B

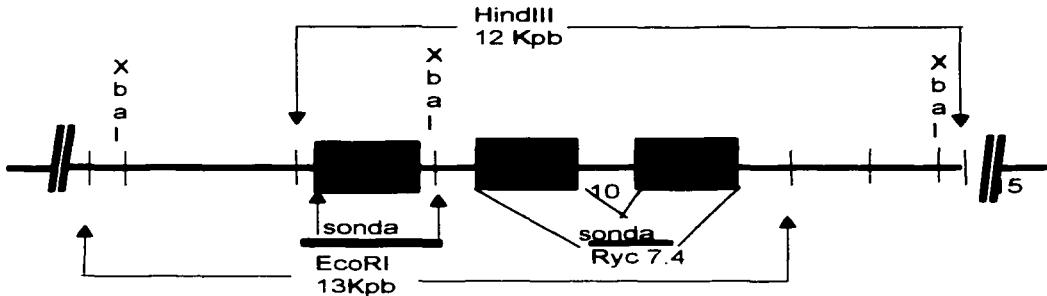


Figura 8. Mapa parcial de restricción de PVH tipo 16 y del gene c-myc humano. Los diagramas presentan algunos sitios de restricción para PVH (A) y el fragmento de restricción de 13 Kpb producto de la digestión con EcoRI y el fragmento de 12 Kpb de la digestión con Hind III del gen c-myc humano (B). Las barras negras muestran las sondas usadas.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes de tejido se dejaron desparafinando en el horno a 60° C toda la noche, y después se dejaron 1 h en xilol. Posteriormente se hidrataron las muestras en etanol 100, 90, 70 %. Las muestras se permeabilizaron con Tritón X-100 a una concentración de 0.25 % en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se inhibió la peroxidasa endógena mediante la incubación con peróxido de hidrógeno al 3 % por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realiza un lavado con PBS tritón X-100 0.25 % por 10 minutos, seguido por la incubación con albúmina sérica bovina al 10 % por 30 minutos a temperatura ambiente. La albúmina se decanta y se le adiciona el anticuerpo primario a la dilución conveniente en PBS pH 7.2-7.4, incubando 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realiza un lavado por 15 minutos con agitación constante y a temperatura ambiente. En seguida se incuban las muestras con el anticuerpo secundario en una dilución 1:500 (esta dilución depende de la concentración del anticuerpo) por 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario esta conjugado con la peroxidasa Se hacen tres lavados de 10 minutos y agitación constante con PBS tween 20 al 0.1%. Posteriormente se le adiciona la solución de diaminobencidina (DAB) (0.006 mg de DAB en 10 ml de PBS), que es el sustrato para la peroxidasa. Esta solución se adiciona por 15 minutos a temperatura ambiente, en seguida se decanta esta y se le adiciona el potenciador para la diaminobencidina por 10 minutos a temperatura ambiente. Después las laminillas se deshidratan y se montan para observarlas al microscopio

RESULTADOS

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

RESULTADOS

Estado del gen c-myc en lesiones cervicales premalignas y malignas

Se estudiaron 81 muestras de tejido fresco, teniendo la siguiente distribución, 6 muestras de linfocitos de sangre periférica de personas normales, 8 cérvix normales, 1 cérvix con miomatosis; consideramos estas 15 muestras como normales debido a que no presentaban ningún tipo de lesión premaligna o maligna. Además, 8 condilomas, 18 NIC, 2 Carcinomas In Situ (CIS) y 38 carcinomas cervicales (CaCu). Se aisló el DNA de cada tejido, se restringió con EcoRI (E) o Hind III (H), enzimas que cortan el DNA flanqueando el gen myc produciendo fragmentos de 13 y 12 Kilo pares de bases (Kpb) respectivamente, se realizó una electroforesis del DNA restringido en geles de agarosa, se transfirió el DNA a filtros de nylon (Sambrook; 1989) utilizando la técnica de Southern Blot y se hibridó con la sonda de c-myc (Ryc 7.4 y HLMXba) previamente marcada radioactivamente por la técnica de corte y sustitución (Nick Translation Ver apéndice 1) para obtener la placa autorradiográfica e interpretar los resultados.

Los resultados obtenidos nos indican que el proto-oncogen c-myc está alterado en aproximadamente un 53% (43/81) de las muestras analizadas. Para una mejor interpretación de los resultados estos se han dividido de acuerdo al estado de la lesión en precancerosas y cancerosas (ver tabla I).

En lesiones precancerosas el gen c-myc resulto alterado en 5/26 muestras distribuyéndose de la siguiente manera, 1/8 condilomas, 4/18 NICs, produciendo entonces una alteración en este tipo de lesión de 19% en total.

En cuanto al tipo de alteración encontramos 1/8 condilomas que mostró amplificación moderada 10X y rearrreglo genético, 4/18 NICs, dos mostraron únicamente amplificación ligera (2-3X) y dos amplificación y rearrreglo, una de ellas con amplificación moderada (5X). La figura 1 muestra un ejemplo del estado que guarda el gen c-myc en lesiones precancerosas y en una muestra de cáncer. La alteración más comúnmente encontrada en estas muestras es la amplificación.

ANÁLISIS DE c-myc EN LESIONES CERVICALES

Digestión con EcoRI

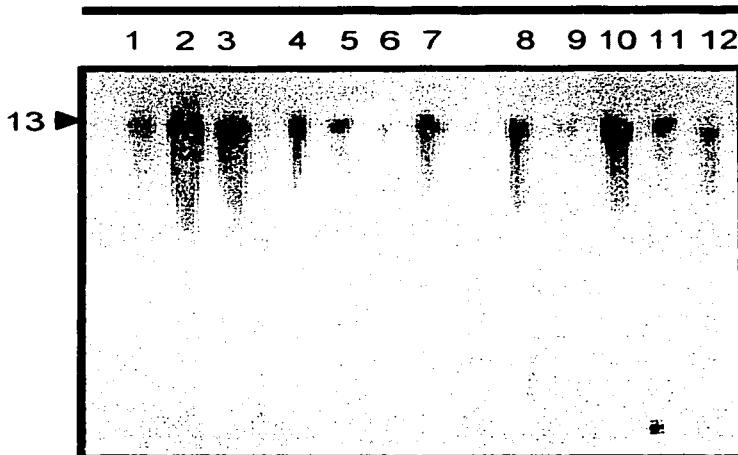


Fig 1. Análisis del gen c-myc en lesiones precancerosas del cérvix y en una muestra de cáncer (carril 12). Muestras de DNA (10µg/carril) de diferentes pacientes fueron digeridas con EcoRI y analizadas por ensayos tipo Southern Blot como se describe en materiales y métodos. Todas las hibridaciones se realizaron con fragmento purificado del plásmido Ryc 7.4. Carril 1 Tejido cervical sano; Carril 2, 6 y 7 NIC I; Carril 3, 8, 9, 10 y 11 NIC II; Carril 4 y 5 condiloma; Carril 12 CaCu. Muestras con ligera amplificación Carril 2, 3 y 10.

Figura 2. Lesiones Cancerosas: En los CIS las dos muestras analizadas presentaron amplificación moderada (7X), entre las muestras pertenecientes al estadio I (10 muestras) 8 mostraron amplificación y rearreglo, una solo amplificación y el grado varió entre 2-30X y la otra no presentó alteración; aquellas del estadio II (22 muestras), 21 mostraron amplificación variando entre 2-20X y 11 rearreglo, en las muestras del estadio III (5 muestras), 3 presentaron amplificación y rearreglo y las otras 2 con ligera amplificación (3X); la muestra del estadio IV presentó amplificación y rearreglo. Ver el resumen de los resultados en la tabla I

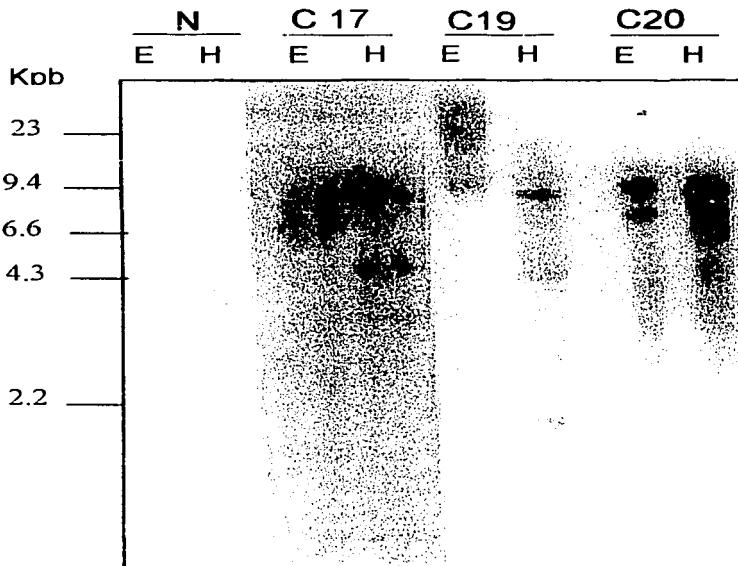


Fig 2. Análisis de las muestras de carcinoma cérvico uterino. El DNA de las biopsias se purificó y cortó con enzimas de restricción EcoRI (E) y Hind III (H) se corrió en un gel de agarosa al 0.9% y se transfirió a filtros de nylon para su posterior hibridación con la sonda de myc marcada radioactivamente. Se puede observar claramente la alteración del gene consistente principalmente en rearreglo génico. N, DNA de cérvix normal, C17, C19 y C20 muestras con cáncer cervical.

Secuencias de Papiloma Virus Humano tipo 16 presentes en lesiones del cérvix.

Las muestras analizadas para la detección del oncogen c-myc, fueron también analizadas para determinar la presencia de secuencias del PVH-16 el cual presenta una alta incidencia en nuestra población. Para el análisis de las secuencias del virus se clasificaron las muestras de acuerdo al estado físico (libre o integrado al DNA celular) de las secuencias virales en las lesiones (Ver Tabla I).

En las lesiones precancerosas el DNA del virus se encontró en 50% (13/26) muestras; en 50% (4/8) condilomas y en 50% (9/18) NICs.

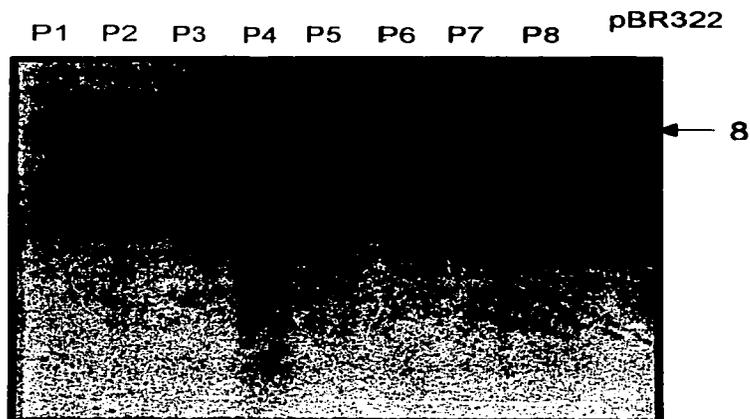
En las lesiones cancerosas se encontraron secuencias de PVH-16 en 35% (14/40) muestras; 1/2 CIS, 4/10 estadio I, 7/22 estadio II, 2/5 estadio III y la muestra del estadio IV fue negativa.

El DNA de PVH puede encontrarse en forma episomal (libre o extracromosomal) y/o en forma integrada. En el presente estudio la técnica usada para extraer el DNA en forma libre fue la descrita por Hirt (1967), para analizar la forma integrada se uso el DNA cromosómico extraído de los tejidos, el cual fue digerido con la enzima de restricción Bam HI que corta el genoma de PVH en un solo sitio, generando un fragmento de 8 Kpb en caso de encontrarse en forma episomal y mas de un fragmento en caso de encontrarse integrado; esto depende de cómo fue la integración y como fue el evento.

En la fig 3 se muestra un ejemplo de detección de las secuencias del virus en forma libre e integrada, los resultados de las muestras precancerosas fueron; 2 condilomas presentaron forma libre e integrada, 2 solo libre y 4 no presentaron secuencias de PVH-16; NICs, 3 presentaron forma libre e integrada, 4 sólo libre, 2 solamente integrado y 9 no presentaron secuencias virales; es decir en 50% de muestras precancerosas hubo secuencias de PVH-16.

En lesiones cancerosas (Fig 4) que al igual que la figura anterior muestra un ejemplo de la detección de secuencias virales; CIS una de las muestras (1/2) presentó forma libre; estadio I (4/10), 1 presentó forma libre e integrada, 2 sólo libre y 1 integrada; estadio II (7/22), 7 presentaron en forma integrada y ninguna libre; estadio III (2/5) 1 presento forma libre y la otra integrada; estadio IV la única muestra fue negativa.

A DNA EPISOMAL HIRT



B DNA celular digerido con BamHI

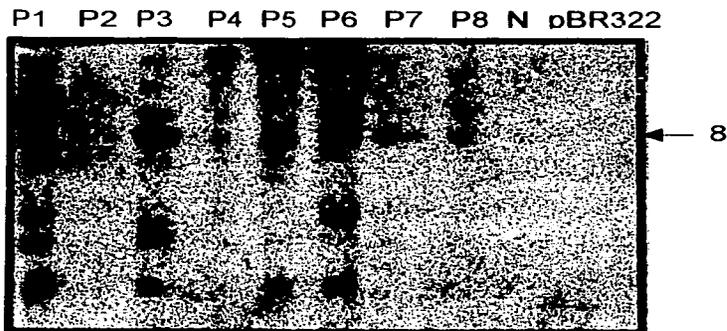


Figura 3 Secuencias de DNA de PVH-16 integrado y episomal en lesiones cancerosas del cérvix. (A) Muestras de DNA celular digerido con BamHI usadas para la detección de secuencias integradas de PVH-16. Camiles C14, C17, C19, C21 y C22 Carcinoma Estadio I, C18 y C 23 Carcinoma Estadio II , C20 y C24 Carcinoma Estadio III; N, Cérvix Normal y Plásmido pBR322. (B) mismas muestras que en A pero DNA obtenido de la extracción tipo Hirt sin tratamiento con enzimas de restricción. Flechas C23, C24 y C17.

DNA celular digerido con BamHI

C23 C24 C22 C21 C14 C17 C18 C19 C20 N pBR322



DNA episomal Hirt

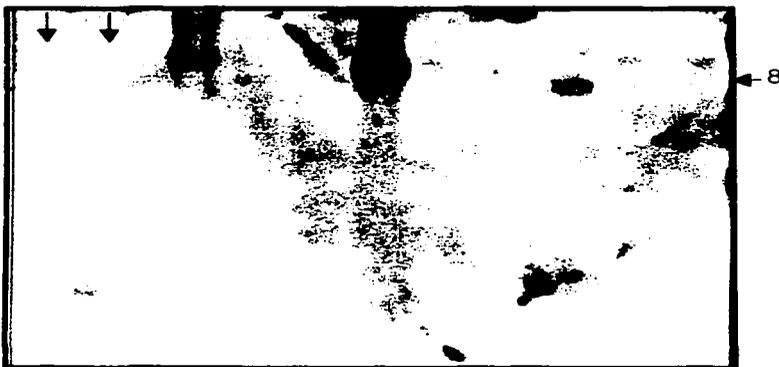


Figura 4. Secuencias de DNA de PVH-16 episomal e integrado en lesiones precancerosas del cérvix. El panel A muestra el DNA obtenido de la extracción tipo Hirt sin tratamiento con enzimas de restricción. En el panel B se muestra el DNA celular digerido con enzima de restricción BamHI para la detección de PVH-16 integrado en el genoma celular. P2 y P8 Condilomas P1, P3-P7 NICs.

En general parece existir una tendencia del gen c-myc para alterarse de manera más drástica en lesiones cancerosas que en las precancerosas, sin embargo es importante resaltar que desde el estado precanceroso el gen se encuentra alterado.

En la figura 5 parte A se muestra como el oncogén c-myc se encuentra rearrreglado, amplificado o sufrió ambas alteraciones en las lesiones cancerosas. En la digestión con EcoRI en el T29 y 30 se aprecian bandas de menor tamaño comparando con los fragmentos del gen c-myc intacto (13 y 12 Kpb luego de digerir con EcoRI o Hind III respectivamente) indicando posiblemente el rearrreglo de uno o ambos alelos. Esto es apoyado por el hecho de que el gen c-myc se encontró intacto en el tejido normal donde sólo aparecen fragmentos de 13 o 12 Kpb esperados después de las restricciones. En la misma figura 5 pero en la parte B se muestra la rehibridación del filtro con la sonda de PVH marcada radioactivamente, revelando algunas bandas comunes y otras adicionales, sugiriendo que la banda de 5 Kpb puede tener secuencias del gen y del virus. En la figura 5 la muestra de DNA del T29 después de la digestión con EcoRI muestra una banda de 0.65 Kpb y una banda de 16 Kpb después de la digestión con Hind III. Este fragmento de 16 Kpb que migra con la mayor parte del DNA sugiere que la secuencias del virus están integradas en el cromosoma. En el tumor 30 detectamos bandas principales en alrededor de 10 y 15 Kpb después de la digestión, sugiriendo esto la pérdida de los sitios de restricción.

En las figuras 3 y 4 se muestra la detección del DNA viral (libre, integrado o ambos) en muestras precancerosas y cancerosas del cérvix respectivamente. El DNA celular fue tratado con la enzima de restricción Bam HI, sujeto a electroforesis y transferido a filtros de nylon e hibridado con la sonda específica del virus. En el recuadro correspondiente se indica la digestión con Bam HI, la aparición de una banda de 8 Kpb indica la presencia del genoma completo del virus, bandas mayores a esto sugieren la integración en tandem y/o diferentes sitios de integración en el genoma viral. En el recuadro marcado como DNA episomal Hirt, se muestra la detección del virus en forma libre o episomal. En este caso ninguna de las muestras fue tratada con enzimas de restricción. En conclusión tanto en lesiones precancerosas, como en lesiones cancerosas, fueron detectados genomas del PVH coexistiendo en forma libre o integrado en el genoma celular.

Diferentes muestras fueron analizadas para la detección de proteína Myc por ensayos de inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la región comprendida entre los aminoácidos 43 y 55 de la proteína. Todos los tejidos fueron fijados en metharcarn.(Metanol,

Expresión de la proteína Myc

Diferentes muestras fueron analizadas para la detección de la proteína Myc por ensayos de inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la región comprendida entre los aminoácidos 43 y 55 de la proteína. Todos los tejidos fueron fijados en Methacarnoy (Metanol, Cloroformo y Acido acético en proporción de 60%, 30% y 10% respectivamente) e incluidos en parafina para su posterior corte en rebanadas de 5 micras de espesor. Las tinciones se llevaron a cabo primero en muestras de cérvix normal con los controles específicos de la reacción (figura 6). En las tinciones de los tejidos controles se aprecia expresión de la proteína myc y la inmunoreactividad se presenta tanto en núcleo como en citoplasma.

Los resultados obtenidos en tejidos con lesión (ver figura 7, 8, 9 y 10) no muestran diferencias considerables al comparar la tinción con la de los tejidos sin lesión. El sitio subcelular de inmunodetección varió dentro de la misma lesión mostrando sitios con señal sólo en citoplasma o sólo en núcleo, así como entre las lesiones mostrando reactividad tanto en núcleo como en citoplasma. Como puede verse, la localización subcelular de la proteína myc varió en las células del cérvix contenidas en el espectro de lesiones del tejido, esto indica la presencia de diferentes poblaciones celulares las cuales expresan la proteína myc. La heterogenidad de los resultados no permite realizar una correlación entre el grado de la lesión y el tipo de alteración del oncogen

Detección de proteína Myc en cortes de Cérvix Normal



Fig 6. Muestra de cérvix normal tratado con anticuerpo anti-Myc para detección de la proteína. En A se muestra un corte control el cual fue tratado omitiendo el segundo anticuerpo para determinar la tinción de fondo. En B se muestra un corte tratado con el sistema completo. Esto es, anticuerpo anti-Myc hecho en ratón, un anticuerpo secundario hecho en conejo y acoplado a peroxidasa y sistema de revelado con Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. (Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina de Harris con métodos estándar).

Detección de la proteína Myc en cortes de Neoplasia Intraepitelial Cervical



Figura 7 Inmunodetección de proteína Myc en cortes de tejido con Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado I. **A** Control usando solo el segundo anticuerpo y sistema de revelado con Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno, para comprobar la especificidad del mismo. **B** Reacción usando el sistema completo esto es primer anticuerpo, IgG hecho en ratón dirigido contra los residuos 43-55 de la proteína Myc; anticuerpo secundario IgG de conejo dirigida contra ratón y acoplado a peroxidasa; sistema de revelado con Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno. Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina de Harris para teñir los núcleos de azul.

Detección de proteína Myc en cortes de Condiloma

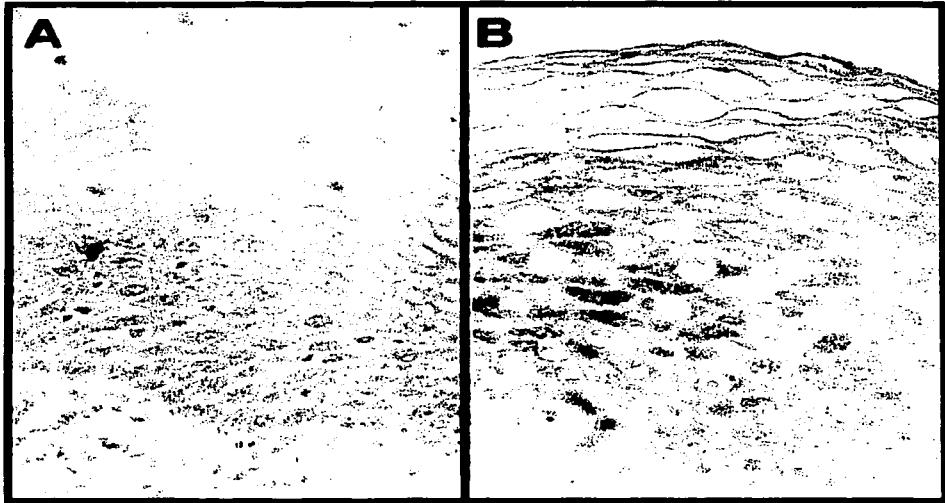


Fig 8. Detección de proteína Myc en cortes de cérvix con Condiloma. **A** Corte solo con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa y sistema de revelado. **B** Corte tratado con el sistema completo es decir anticuerpo primario contra la proteína Myc y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y el sistema de revelado. Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina de Harris para teñir los núcleos azules.

Detección de la Proteína Myc en Neoplasia de alto grado

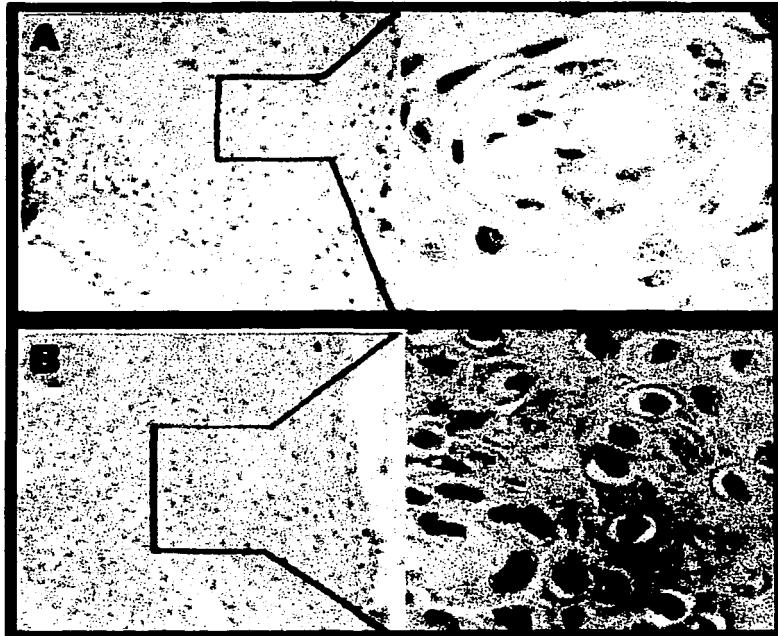


Fig 9. Inmunolocalización de la proteína Myc en un corte de Neoplasia de alto grado. El tejido fue teñido como se mencionó en Material y Métodos. Se puede observar tinción tanto en núcleo como en citoplasma. Panel A control sólo con el anticuerpo secundario para detectar uniones inespecíficas. Panel B corte tratado con el sistema de detección completo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Detección de la proteína Myc en Cáncer Cervical Invasor

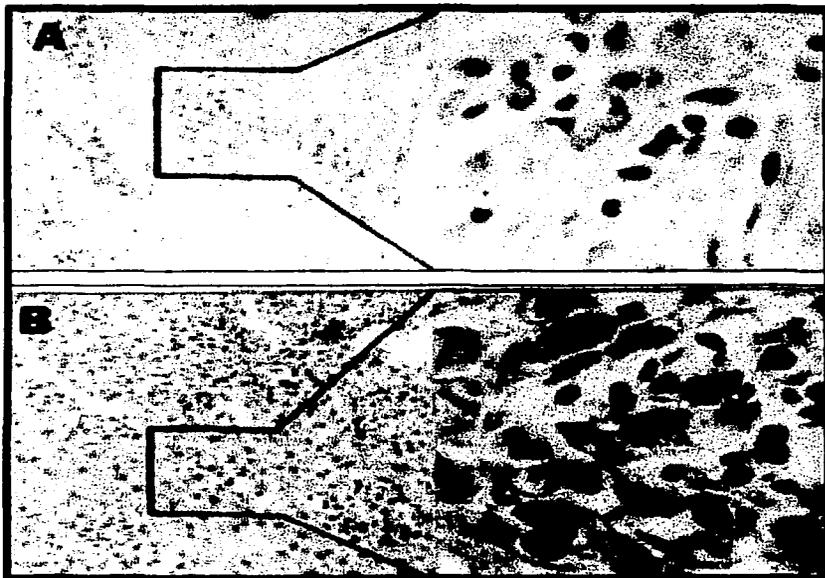


Fig 10. Detección de la proteína Myc en Carcinoma cervical invasor. Note al igual que en las figuras anteriores que la localización del producto del oncogene myc es heterogénea, mostrando tinción tanto en núcleo como en citoplasma. Panel A control de especificidad del segundo anticuerpo. Panel B Muestra tratada con el sistema completo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA I
ALTERACIONES DE GEN c-myc Y PRESENCIA DE PVH 16 EN LESIONES
CERVICALES

Diagnóstico	Oncogen c-myc		Papilomavirus-16	
	Amplificación.	Rearreglo	Integrado	Libre (Episomal)
CONTROLES				
Linfocitos	--	--	--	--
Cérvix Normal	--	--	--	--
PRECANCEROSAS				
Condiloma	1/8	1/8	2/8	4/8
NIC	4/18	2/18	5/18	7/18
CANCEROSAS				
CIS	2/2	--	--	1/2
Ca Estadio I	9/10	8/10	2/10	3/10
Ca Estadio II	21/22	11/22	7/22	--
Ca Estadio III	5/5	3/5	1/5	1/5
Ca Estadio IV	1/1	1/1	--	--

CIS: Carcinoma In Situ NIC: Neoplasia Intraepitelial Ceval; Ca: Carcinoma Cervical

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Los papilomavirus humanos tipo 6 y 11 son detectados principalmente en Condiloma acuminata pero raramente en carcinomas (Gissman;1983) mientras los PVHs tipo 16 y 18 están asociados con procesos neoplásicos (Boshart;1984).

Secuencias de DNA del PVH tipo 16 han sido encontradas en muestras de carcinoma cervical con una frecuencia variable en diferentes países. En los años 80's se discutía aún la frecuencia con la que secuencias virales estaban presentes en muestras de lesiones cervicales, actualmente se sabe que cerca del 100% de este tipo de lesión tiene secuencias del virus.

En cuanto a las alteraciones del oncogén c-myc se muestra evidencia de una correlación casi total entre la alteración (amplificación y rearreglo con o sin amplificación) del oncogén en los tumores primarios sólidos, que hasta el momento de la publicación del artículo no había sido suficientemente documentada en el mismo o en algún otro tipo de tumor (Ocádiz;1987). Actualmente se sabe que la activación de c-myc afecta significativamente la germinación, expansión y evolución de muchos y muy diversos cánceres humanos (Oster;2002). En la primera parte de este trabajo (Ocádiz;1987, Gariglio;1989) prácticamente todo el estudio se hizo analizando carcinomas cervicales de células escamosas estadio II, encontrándose más del 90% de alteración del oncogén c-myc, lógicamente el siguiente paso era preguntarse ¿cuál es estado que guarda el gen c-myc en lesiones tempranas y en los diferentes estadios tardíos, con respecto al estadio II analizado? En la segunda parte del trabajo en la que analizamos muestras de lesión cervical abarcando un espectro mas amplio desde condilomas, lesiones premalignas y

lesiones malignas del cérvix, los resultados muestran que el oncogén c-myc se encuentra alterado, encontrando amplificación, rearreglo o ambos, mostrando un grado de alteración mayor en lesiones malignas con respecto a las premalignas .

Alrededor de la mitad de los carcinomas cérvico uterinos estadio II presentan diferentes grados de alteración de myc (ver tabla II). Se sigue investigando una posible correlación entre el grado de alteración genética, la concentración del producto del gen (proteína) y las manifestaciones clínicas. El tamaño de los fragmentos conteniendo c-myc puede ser alterado por algunos mecanismos, tales como, mutación puntual, pequeñas deleciones, inserciones o rearreglos mayores (por ejemplo traslocaciones), los fragmentos rearreglados que nosotros encontramos, pudieron haber sucedido por alguno de estos mecanismos moleculares. Algunos de estos fragmentos pueden haber sido pseudogenes (Dalla-Favera;1982) o genes relacionados con myc tal como L-myc (Nau;1985) o N.myc (Lee;1984).

El gen c-myc está aparentemente estructurado para ser rápidamente modulado desde su RNA mensajero (RNAm) y su proteína, que tiene una vida media muy corta (Dani;1984). Por esto una baja en la concentración del RNA mensajero, puede ser seguida por una rápida pérdida de la proteína myc. Una sobreproducción del mensajero de myc puede representar una amplificación del gen (Little;1983). Sin embargo es poco probable que la activación se lleve a cabo únicamente a través de este mecanismo, (dada la complejidad y variedad de eventos requeridos para la activación del gen) En células no transformadas, la expresión del protooncogén c-myc es sensiblemente responsiva al medio extracelular y generalmente refleja el estado de crecimiento de la célula (Henriksson;1996). En células dividiendo, la expresión de myc es mantenida en un nivel

relativamente constante a través del ciclo celular. La exposición de la célula a agentes que bloquean la proliferación celular, estimula la rápida e inmediata baja en la regulación en la expresión de myc.

Niveles arriba de los fisiológicos en la expresión de myc no son tolerados y pueden ser letales para las células no transformadas. En células normales la expresión de myc es altamente controlada e inmediatamente responsiva a los estímulos proliferativos del ambiente celular por lo que ha sido llamado "el centinela intracelular del medio extracelular" .(Oster;2002)

En contraste con el gen myc altamente regulado en células no transformadas, la activación del oncogén myc en células tumorales es sinónimo de expresión desregulada de la proteína myc (Nesbit;1999).

En neuroblastoma, donde la amplificación de N-myc es una señal de enfermedad agresiva, las investigaciones sugieren que las mutaciones puntuales de la región codificante no es aparente (Hogarty;1999). Las mutaciones en la región codificadora no sirven como diagnóstico para un alelo myc activado , la presencia de anomalías cromosomales gruesas, tales como amplificación o translocación, del locus de myc ha sido estrictamente definida como activación de este oncogén en células de tumor. (Liao;2000). Nuevas señales sugieren que myc puede activarse tanto de manera directa como indirecta. Se supone que los niveles elevados de myc en células de tumor, contribuye a la evolución carcinogénica de la clona transformada (Herms;2000). Esta hipótesis requiere mayor investigación. La clave es evaluar que tanto la expresión desregulada de myc puede distinguir células tumorales de células normales y servir como un blanco terapéutico para bloquear específicamente el crecimiento del tumor, o dirigir a la muerte las células

tumorales (Herms;2000).

Con el desarrollo de nuevas tecnologías es ahora posible definir la desregulación de myc de una manera más rápida , sensible y específica. En el pasado un alelo de myc activado era diagnosticado tardando mucho tiempo, con un trabajo intenso en los cariotipos o con análisis por Southern Blot (SB) como en el presente trabajo. Los avances tecnológicos para detectar alteraciones genéticas de myc incluyen la aplicación de Hibridación Genómica Comparativa (CGH por sus siglas en inglés), Hibridación In Situ fluorescente, RT-PCR en tiempo real así como los perfiles de expresión usando la tecnología de microarreglos. Usando estas tecnologías, un rápido, cuantificable y muy confiable rastreo de la activación de myc es ahora posible (Taylor;2000).

En cuanto a los resultados de las hibridaciones con la sonda para la identificación de PVH tipo 16, muestran un alto porcentaje de integración viral que puede ser muy significativo, dado que otros virus integran su genoma dentro del DNA celular antes de transformar a las células (Topp;1981) o bien el evento de integración puede ser incidental durante la transformación celular, Se ha reportado que la lesión puede originarse de una sola clona celular en la cual la integración viral ha ocurrido (ver fig 3). Parece ser que las lesiones premalignas avanzadas se originan de una clona, ya que los fragmentos representando las uniones célula-virus del DNA viral integrado aparecen como bandas definidas. En el momento que se realizó el trabajo no había certeza en cuanto a la presencia del virus en forma episomal, en la actualidad esta bien documentado que el virus es detectado mas comúnmente en forma episomal en lesiones premalignas, mientras que usualmente está integrado en el genoma de las células hospederas en tumores malignos (zur Hausen;1996). La integración del DNA de PVH es considerado como un

importante paso en la progresión del tumor (Popescu;1990). Las consecuencias de la integración sobre la estructura y expresión del genoma viral ha sido extensamente estudiada, pero sin embargo, poco se sabe de su efecto sobre los genes involucrados en la proliferación celular. En la actualidad se sabe que el oncogén c-myc está asociado con la proliferación celular, es difícil afirmar que las diferencias en la actividad de este gen en cáncer es el resultado o la causa del estado neoplásico. Una activación en cis de c-myc por las secuencias virales insertadas es un evento frecuente, asociado con proliferación maligna (Crook;1990). Algunos otros datos sugieren que al menos en algunos tumores malignos, la activación de c-myc es una consecuencia de la integración de PVH (Courturier;1991). El mismo autor reporta que en las muestras en la que c-myc se encuentra amplificado o rearrreglado no se encuentran niveles elevados de RNA mensajero del gen.

Por otro lado la integración del genoma viral en el DNA celular puede tener impacto sobre los estados iniciales de transformación celular, sobre el mantenimiento del fenotipo transformado y/o sobre la progresión del tumor. Además la integración del genoma viral puede dirigir la expresión de proteínas con actividad transformante.

La integración del DNA de PVH regularmente ocurre con la ruptura de la región viral E1-E2. Como E2 es un modulador transcripcional, la interrupción en su expresión puede estimular la expresión descontrolada de los genes transformantes E6 y E7. Otro evento resultante de la integración de papiloma es la expresión de transcritos de E6 y E7 vía los transcritos de fusión virus-célula. Así mismo la localización cromosomal del sitio de integración de PVH se ha visto que juega un importante papel en el proceso de transformación, dado que se puede integrar cerca de oncogenes o sitios frágiles.

La localización cromosomal de los sitios de integración de PVH puede contribuir a la identificación de genes involucrados en el desarrollo del tumor. Durante los últimos 10 años y hasta la fecha no se ha podido responder la cuestión de que tanto la integración viral ocurre en sitios específicos del cromosoma. Popescu realizó en 1989 una búsqueda exhaustiva para tratar de encontrar sitios de integración específica en el genoma de mamíferos y no los encontró, los cuales pudieran ser asociados con algún patrón de la enfermedad. Hasta finales de 1997 los sitios de integración han sido localizados solamente en 22 líneas celulares y en siete carcinomas humanos.

En resumen se ha encontrado que en las lesiones de bajo grado un 25% de las muestras tiene DNA de diferentes tipos de virus integrado en el genoma, por el contrario este porcentaje aumenta hasta más o menos un 85% cuando se trata de lesiones cancerosas (Pirami;1997). Estos resultados y los obtenidos por nosotros sugieren que en las lesiones NIC III al menos algunas presentan DNA de PVH integrado en el genoma celular, convirtiendo estas en lesiones de mayor riesgo para producir una lesión maligna. Así mismo hay lesiones cancerosas en las que no se detecta el DNA de PVH integrado, sugiriendo que la integración y la subsecuente inactivación de E2 como regulador transcripcional, no es un paso esencial para el desarrollo de lesiones malignas asociadas con PVH tipo 16.

El papel de la integración de PVH en cáncer cervical, parece estar asociada primariamente con la habilidad del virus para alterar la estructura y función de los proto-oncogenes cerca de los cuales se integra, como myc, causando lesión en genes celulares. En base a los resultados obtenidos con las líneas positivas para PVH el sitio de integración mas frecuentemente encontrado es en el cromosoma 8q24. Sin embargo

todavía existe controversia al respecto.

La integración de PVH está asociada con la delección de genes celulares y la alteración de la estructura y función de los proto-oncogenes celulares cercanos al sitio de integración como ya se mencionó. El más importante mecanismo durante la integración puede ser la transcripción descontrolada de los genes virales que pueden influir en el balance virus-célula durante la integración, esto incrementa la susceptibilidad de la célula a otros factores necesarios para la progresión a fenotipos malignos.

En el presente trabajo se muestra la distribución de proteínas myc en la región 43-55 en lesiones de cérvix por ensayos de inmunohistoquímica, dichas proteínas fueron detectadas en citoplasma y/o en núcleo en diferentes tipos celulares. En los mismos tejidos pudo observarse diferente localización subcelular en la tinción. Todos los tejidos usados en este trabajo fueron tratados bajo las mismas condiciones de fijación e inmunodetección, por lo que, creemos que la tinción citoplásmica no es un artefacto, aunque no se descarta el efecto producido por el fijador usado. Estudios del grupo en el principio de los 90's mostraban que tanto en extractos nucleares como citoplásmicos de diferentes tipos celulares (HeLa, CV1, linfocitos normales) se detecta la proteína usando estos mismos anticuerpos. Además Miranda y cols, (1991) demuestran que estas proteínas están involucradas en proliferación celular, ya que linfocitos normales tratados con algún mitógeno muestran sobreexpresión de estas proteínas. Otros ensayos llevados a cabo por Western blot. de muestras de extractos totales a partir de muestras tumorales del cérvix, también se observa sobreexpresión de estas proteínas. Esto concuerda con los resultados obtenidos en cortes de tejido de lesiones cancerosas, en los que se detecta mayor expresión con respecto a las lesiones precancerosas y normales. Esto implica

que la proliferación celular se incrementa en las lesiones cancerosas, mientras que en las lesiones precancerosas se observa una tasa de proliferación menor, pero mayor que en tejido normal.

Por último podemos decir que los resultados obtenidos no muestran una relación directa entre el grado de la lesión y la expresión de la proteína myc, además no existe un patrón de inmunoreactividad específica para cada tipo de lesión. Pero se sabe actualmente que la proteína no sufre cambio entre una célula normal y una transformada. Sin embargo esta surgiendo evidencia de que el nivel preciso de proteína myc puede tener un impacto directo sobre la función (Bazarov 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- La alteración del oncogén c-myc se presenta desde las lesiones precancerosas del cérvix.

2.- Existe una correlación entre la alteración molecular del gene c-myc y el grado de malignidad de las lesiones.

3.- El gene c-myc se encuentra alterado en tejido cervical principalmente por amplificación.

4.- La inmunolocalización de la proteína myc en tejido cervical con lesión es heterogénea.

5.- El evento de integración del Papilomavirus Humano tipo 16 en el genoma de células cervicales ocurre en etapas anteriores a las lesiones malignas.

6.- La integración del PVH tipo 16 dentro o adyacente al gen c-myc puede ser responsable de la activación de éste en las lesiones del cérvix y puede ser factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical.

7.- Por último, la alta frecuencia de la presencia de PVH tipo 16 en las muestras estudiadas, así como la activación del proto-oncogen myc es un factor de alto riesgo en la población para la génesis del cáncer cervical.

TESIS CON
VALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts Bruce, Johnson A, Lewis J, Raff M, Walter P. *Molecular Biology of the cell*. Fourth Edition Publishing by Garkand Science New York. (2002).
- Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ. The human papillomavirus type 16 E7 gene products interacts with and trans-activates the AP-1 family of transcription factors. *EMBO. J.* 1996;15: 1950-1960.
- Auvinen E, Hietanen S, Gissmann L, Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein. *Int. J. Oncol* 1997;11:1297-1304.
- Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990;87:463-467.
- Bazarov AV, Adachi S, Li SF, Mateyak MK, Wei S, Sedivy JM. A modest reduction in c-myc expression has minimal effects on cell growth and apoptosis but dramatically reduces susceptibility to Ras and Raf transformation. *Cancer Res.*2001;61:1178-1186.
- Berumen J, Miranda E, Zafra G, Casa L, Segura E, Ordoñez RM, Agurre J, Martínez M, Rosas A, Ibarra V, Pedraza L, Saad A, Marroquin A, Gutierrez A, Martínez A, Gariglio P. Molecular Epidemiology of high-incidence cancer in Mexico. *Gac. Méd. Méx.* 1995 ; 133 (supl. 1) : 35-41.
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO. J.* 1984;3:1151-1157.
- Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A, Banks L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* 1994,203:73-80.
- Bubb V, McCance DJ, Schlegel R. DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation its encoded protein. *Virology* 1988;163:243-246.
- Chen SL, Tsao YP, Yang CM, Lin YK, Huang CH, Kuo SW. Differential induction

- and regulation of c-jun jun-B, jun D and c-fos by human papillomavirus type 11 E5a oncoprotein. *J. Gen. Virol* 1995; 76:2653-2659.
- Chen SL, Lin YK, Li LY, Tsao YP, Lo HY, Wang WB, Tsai TC. E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol* 1996; 70:8558-8563.
 - Ciccolini F, Di Pasquale G, Carlotti F, Crawford L, Tommasino M. Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* 1994;9:2633-2638.
 - Cohen BD, Goldstein DJ, Rutledge L, Vass WC, Lowy DR, Schlegel R, Schiller JT. Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J. Virol* 1993;67:5303-5311.
 - Conrad M, Goldstein D, Andresson T, Schlegel R. The E5 protein of HPV-6, but not HPV 16, associates efficiently with cellular growth factor receptors. *Virology* 1994;200:796-800.
 - Crook T, Greenfield I, Howard J, Stanley M. Alteration in growth properties of human papilloma virus type 16 immortalized human cervical keratinocytes cell lines correlate with amplification and overexpression of c-myc oncogene. *Oncogene* 1990;5:619-622.
 - Crum CP, Nuovo G, Friedman D, Silverstein SJ. Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frame in genital precancer. *J. Virol* 1988;62:84-90.
 - Dalal S, Gao Q, Androphy EJ, Band V. Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. *J. Virol.* 1996;70:683-688.
 - Dalla-Favera R, Wong-Staal F, Gallo RC. Oncogene amplification in promyelocytic leukemia cells lines HL-60 and primary leukemia cells of the same patient. *Nature*, 1982;299:61-63.
 - Dani C, Piechaczyk M, Audigier Y, El Sabouty S, Cathala G, Marty L, Fort P, Blanchard JM, Jeanteur P. Extreme instability of myc mRNA in normal and human transformed human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984;81:7046-7050.

- Desaintes C, Hallez S, Detremmerie O, Burny A. Wild type p53 down regulates transcription from oncogenic human papillomavirus promoters through the epithelial specific enhancer. *Oncogene* 1995;10:2155-2161.
- de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Miklaw H, Wahrendorf J, Papendick U, zur Hausen H. Human papillomavirus infection in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* 1987;2:703-706.
- de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus: an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1994;186:1-12.
- Etscheid BG, Foster SA, Galloway DA. The E6 protein of human papillomavirus type 16 functions as a transcriptional repressor in a mechanism independent of the tumor suppressor protein p53. *Virology* 1994;205:583-585.
- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of Virology (2000) Sin Num. Ed. ASM Press Washington D.C.
- Garlick JA., Taichman LB. Human papillomavirus infection of the oral mucosa. *Am. J. Dermatopathol* 1991;13:386-395.
- Geisen C, Delius H, Lichter P, Kahn T. A transcribed human sequences related to the mouse HC1 and the human papillomaviruses type 18 E5 genes is located at chromosome 7p13-14. *Hum. Mol. Genet.* 1995;4:1337-1345.
- Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurch HG, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1983;80:560.
- Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell lines containing high copy number of episomal HPV-16 DNA. *J. Virol* 1996;70:2339-2349.
- Gross-Bellard M, Oudet P, Chambon P. Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem* 1973;36:32.
- Henriksson M, Luscher B. Protein of the Myc network; essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv. Cancer Res.* 1996;68:109-182.

- Herms J, Neidt I, Luscher B, Sommer A, Schurmann P, Schroder T, Bergmann M, Wilken B, Probst-Cousin S, Hernaiz-Driever P, Behnke J, Hanefeld F, Pietsch T, Kretzschmar HA. C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int J Cancer*. 2000;89:395-402.
- Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cells culture. *J. Mol. Biol* 1967;26:365.
- Hochstrasser M. Ubiquitin, proteosomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell. Biol* 1995;7:215-223.
- Hogarty MD, Brodeur GM. Wild-type sequence of MYCN in neuroblastoma cell lines. *Int. J. of Cancer* 1999;80,630-631.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18. *EMBO. J.* 1991;10:4129-4135.
- Johnsen CK, Stanley M, Norrild B. Analisis of human papillomavirus type 16 E5 oncogene expression in vitro and from bisitronic messenger RNAs. *Intervirolgy* 1995;38:339-345.
- Kahn T, Friesl H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Gissmann L, Kramer J, zur Hausen H. Molecular cloning, analysis and chromosomal localization of a mouse genomic sequence related to the human papollomavirus type 18 E5 region. *Mol. Carcinogen*. 1992;6:88-99.
- Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, Simizu B. Transactivation of prothymosin alpha and c-myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology* 1997;232:53-61.
- Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor supressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94:11612-11616.
- Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK.. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380:79-82.

- Kretzschmar HA. C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int. J. Cancer* 2000;89:395-402.
- Kubutat MHG, Vousden KH. Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced anogenital malignancies. *Semin. Virol* 1996;7:295-304.
- Lambert PF, Baker CC, Howley PM. The genetics of bovine papillomavirus type I. *Ann. Rev. Genet.* 1988; 22:235-258.
- Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 protein. *J. Virol* 1994;68: 4262-4273.
- Lee WH, Murphree AL, Benedict WF. Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 1984;309:458-460.
- Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 1992;7: 19-25.
- Lizano M, García Carrancá A. Las variantes moleculares de papiloma virus humano tipo 16 y 45 en tumores de cuello uterino. *Gac. Med. Mex.* 1995;133(supl1):43-48.
- Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr. Relat Cancer* 2000;7:143-164.
- Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer lines. 1983;306:194-196.
- Massimi P, Banks L. Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 protein. *Virology* 1997;227:255-259.
- Massimi P, Pim D, Storey A, Banks L. HPV-16 E7 and adenovirus E1A complex formation with TATA box binding protein is enhanced by Casein Kinase II phosphorylation. *Oncogene* 1996;12:2325-2330.
- McIntyre MC, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus E7 oncoprotein bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 1996;215:73-82.
- Meneses-Gonzalez, F. Lazcano PE, Lino GM, Hernández Avila M, Lezana F, Nájera P, Sepúlveda AJ. Prevalencia del uso de la prueba de Papanicolauo en mujeres de 15 a 49 años en México. *Rev. Inst. Nal. Cancerol.*1999;45:17-23.
- Meyer AN, Xu YF, Webster MK, Smith AE, Donoghue DJ. Cellular transformation

- by a transmembrane peptide: structural requirements for the bovine papillomavirus E5 oncoprotein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1994;94:4634-4638.
- Miranda Peralta EI, Valles Ayoub Y, Hernández Mendoza L, Rangel Ramírez LM, Castrejón Rojas A, Collazo-Jaloma J, Gutiérrez Romero M, González Constance R, Gariglio Vidal P. MYC protein and proteins antigenically related with MYC in acute lymphoblastic leukemia. *Rev. Invest. Clin.* 1991;43:139-145.
 - Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF, Minna JD. L-myc, a new myc related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 1985;318:69-73.
 - Nesbit E, Tersak J, Prochownik E. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999;18:3004-3016.
 - Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M, Graef AM, Gariglio P. High correlation between Molecular Alterations c-myc oncogene and Carcinoma of the Uterine Cervix. *Can. Res* 1987;47:4173-4177.
 - Ocadiz R, Saucedo R, Salcedo M, Ortega V, Rodriguez H, Gordillo C, Chavez P, Gariglio P. Occurrence of Human Papillomavirus type 16 DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine-cervix carcinoma. *Arch. Inv. Med* 1989;20:355-362.
 - Oster SK, Marhin W W, Asker C, Facchini LM, Dion PA, Funa K, Post M, Sedivy JM, Penn LZ. Myc is a essential negative regulator of platelet-derived growth factor beta receptor expression. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:6768-6778.
 - Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ. The myc oncogene: MarvelusY Complex. *Adv. Cancer. Res.* 2002; 81-154.
 - Petti L, Reddy V, Smith SO, DiMaio D. Specific interaction between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and the beta receptor for platelet-derived growth factor in stable and acutely transformed cells. *J. Virol* 1994;68:3582-3592.
 - Petti LM, Reddy V, Smith SO, DiMaio D. Identificación of amino acids in the transmembrane and juxtamembrane domains of the platelet-derived growth factor receptor required for productive interaction with the bovine papillomavirus E5 protein. *J. Virol* 1997;71:7318-7327.
 - Piccini A, Storey A, Romanos M, Banks L. Regulation of human papillomavirus type

- 16 DNA replication by E2, glucocorticoid hormone and epidermal growth factor. *J. Gen. Virol* 1997;78:1963-1970.
- Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992;7:27-32.
 - Pim D, Massimi P, Banks L. Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* 1997;15:257-264.
 - Pirami L, Giache V, Becciolini A. Análisis of HPV 16, 18, 31 and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J. Clin. Pathol* 1997;50:600-604.
 - Popescu NC, DiPaolo JA. Preferential sites for virus integration on mammalian genome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1989;42:157-171.
 - Popescu NC, DiPaolo JA. Integration of human papillomavirus 16 DNA and genomic rearrangements in immortalized human keratinocyte lines. *Cancer Res* 1990;50:1316-1323.
 - Report of a technical meeting, Geneva, 16-18 February 1999. The current status of development of prophylactic vaccines against human papillomavirus infection. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization Geneva.
 - Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. *J. Mol. Biol* 1977;113:237.
 - Ross Michael, Reith E, Romrell L. 1992. *Histología. Segunda edición. Edit. Med. Panamericana. México D.F.*
 - Russell J, Botchan MR. cis-Acting components of human papillomavirus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origins. *J. Virol* 1995;69:651-660.
 - Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Cloning a Laboratory Manual* 1989, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
 - Sparkousky J, Mense M, Anders J, Schlegel R. E5 oncoprotein transmembrane mutants dissociate fibroblast transforming activity from 16 kilodaltons protein binding

and platelet-derived growth factor receptor binding and phosphorylation. *J. Virol* 1996;70:2420-2430.

- Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate myc protein stability. *Genes Dev.*2000;14: 2501-2514.
- Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J. Virol.* 1991;65:4860-4866.
- Sherman L, Allouf N, Golan I, Durst M, Baram A. Expression and splicing patterns of human papillomavirus type 16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int. J. Cancer* 1992;50:356-364.
- Southern E. M. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*1975;98:503.
- Stern PL, Stanley MA. (eds) 1994 Human papillomavirus and cervical cancer. Biology and Immunology, Oxford University Press, Oxford, England.
- Stoppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 1996;223:251-254.
- Syrjänen, K J. Factors associated with the clinical behavior of cervical human papillomavirus infection during a long term prospective follow-up. The experience of the Kuopio Institute. *Cervix* 1989;7:131-143.
- Syrjänen, K J. Natural History of genital HPV infections. *Papillomavirus. Rep* 1990; 1: 1-5.
- Syrjänen K, Syrjänen S. Papillomavirus Infections in Human Pathology. 2000 1ª Edición. John Wiley and Sons. England.
- Taylor CP, Bown NP, McGuckin AG, Lunec J, Malcolm AJ, Pearson AD, Sheer D. Fluorescence in situ hybridization techniques for the rapid detection of genetic prognostic factors in neuroblastoma. *Br. J. Cancer* 2000;83:40-49.

- Topp, W. **Molecular Biology of tumor viruses; DNA Tumor Viruses.** (Tooze J. Ed) Cold Spring Harbor Laboratories New York 1981:205.
- Tsao Y. P. Li LY, Tsai TC, Chen SL. Human papillomavirus type 11 y 16 E5 repress p(21 waf-1/ sdil/ Cipl) gene expression in fibroblast and keratinocytes. *J Virol* 1996; 70:7535-7539.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 protein with p53. *Science* 1990;248:76-79.
- Woodworth CD, Simpson S. Comparative limphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalizad and carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol* 1993;142:1544-1555.
- zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific HPV types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994^a;86:131-156.
- zur Hausen H, and Ethel-Michelle de Villiers. Human papillomavirus. *Ann. Rev. Microbiol.* 1994^b;48:427-447.
- zur Hausen H. Papillomavirus infection a major cause of human cancer. *Biochem. Biophys. Acta* 1996;1288:F55-F78.

APENDICE

APÉNDICE

Extracción de DNA Genómico

- Se homogeniza el tejido congelado en solución amortiguadora de PBS a 4°C y se lava dos veces con la misma solución.
- Se centrifuga durante 5 min a 2000rpm durante 5 min a 4°C.
- Se resuspende la pastilla obtenida en solución de lisis que consta de los siguientes compuestos en las concentraciones finales que se indican:

20mM de Tris-HCl
300 mM de Acetato de sodio
1mM de EDTA
Proteinasa K 100µg/ml
0.2% de SDS

- Después de la digestión la muestra se trata dos veces con fenol saturado (ver adelante extracción fenólica) para quitar la proteínasa K.
- Se trata dos veces con una mezcla de cloroformo-álcohol Isoamílico en una proporción de 24:1.
- Posteriormente se añaden dos volúmenes de etanol a -20°C.
- Dejar precipitando toda la noche a la misma temperatura.
- Centrifugar a 10000 rpm durante 30 min, a 4°C y descartar el sobrenadante
- Secar la pastilla con vacío y resuspender en agua estéril.

Extracción de DNA de bajo peso molecular

- Se homogeniza el tejido como se describió en la sección anterior.
- Se resuspende el tejido en solución Hirt que consta de:

Tris-HCl 10mM pH 7.9

EDTA 10mM

SDS 0.6%

- Se agita perfectamente y se incuba a temperatura ambiente durante 20 min.
- Se ajusta la concentración de sal (NaCl) a 1M
- Agitar suavemente y dejar incubando a 4°C durante 16 horas
- Centrifugar durante una hora a 8000 rpm a 4°C
- Se recupera el sobrenadante y se extrae con fenol (ver adelante extracción fenólica)
- Se precipita el DNA como se menciono anteriormente.

Extracción de Plásmido

- A. Se siembra una caja de medio de cultivo para bacterias Luria (LB) suplementado con ampicilina 50 (50 µg de ampicilina /mL) con la cepa que contenga el plásmido que se desea extraer (Ej: pHLMXba, pRyc 7.4 o pE2/16) Se incuba 16-18 h a 37 °C.
- B. De esta caja, se toman un par de asadas que se inoculan en 200 mL de LB líquido con 50 µg de ampicilina/mL y se incuba a 37 °C toda la noche a 200 rpm.

Con este medio crecido:

1. Dos mL de cultivo fueron centrifugados a 10 000g ($r = 4.5$ cm), por 2 min.
2. Se le adicionaron 200 µL de TS
3. Se agitó fuertemente en vortex y se le adicionaron 200 µL de ELT, después

se agitó suavemente.

4. Se dejó reposar la mezcla 5 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó la mezcla 30 min a 10 000 x g a temperatura ambiente.
5. Se tomó el sobrenadante, se le adicionó 1 volumen de SEPG y se mezclaron por inversión, dejando reposar la mezcla 17 min. Después se centrifugó a 10000 x g por 3 min.
6. Se eliminó el sobrenadante, se secó a vacío la pastilla y se resuspendió en 30µL de agua bidestilada. Si no se resuspende rápidamente calentar a 37 °C por 10 min.
7. Se purificó el plásmido por extracción fenólica (ver adelante).

AMORTIGUADOR	CARACTERÍSTICAS
TS	Tris 50 mM pH 8.0 Sacarosa 10%(guardar a -20 °C)
ELT	EDTA 100 mM, Lisozima 2 mg/mL, Triton X-100 0.1 %. Se guarda a -20 °C.
SPEG	Politetilen glicol PM 6000-8000 al 20 %, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8.0. Se guarda a 4 °C.

Purificación por extracción fenólica

1. Se adiciona 1 volumen de fenol equilibrado con Tris-HCl 0.1 M (pH>8.0) al DNA. Se agita vigorosamente y se centrifuga 3 min a 10 000 x g a temperatura ambiente.
2. Se separa la solución acuosa y se le adiciona 1 volumen de cloroformo. Se agita vigorosamente con el vortex y se centrifuga a 10 000 x g por 3 min a temperatura ambiente.
3. Se separa la fase acuosa y se le adicionan 2 volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C junto con 0.1 volumen de LiCl₄ 4M. Se centrifuga a 10 000 x g a 30 min a 4 °C.

4. Se elimina el sobrenadante y se seca a vacío. Después se resuspende en 30 μ L de agua-DEPC.
5. Se corre un gel al 1.0 % agarosa para observar el plásmido o el producto de la digestión purificado.

Purificación de plásmido por gradiente isopícnico de Cloruro de Cesio

- Se prepara una solución stock de 1gr/ml de Cloruro de Cesio (Ultrapuro y grado Biol. Mol.) en TE (Tris-HCl 10Mm y 1mM de EDTA pH 7.4).
- Por otro lado se prepara una solución de 10 mg/ml de Bromuro de etidio
El plásmido se disuelve en un mililitro de TE al que se le agrega un gramo de Cloruro de cesio
- Se colocan 3ml de solución de cloruro de cesio en un tubo de polialómero para centrifuga de alta velocidad de sellado rápido (Quick Seal)
- En el mismo tubo se coloca (con una jeringa y aguja de gran calibre con mucho cuidado para no romper el DNA) el plásmido que esta disuelto en 1 ml de TE con cloruro de cesio
- Se agrega en el mismo tubo 400 μ l de la solución de Bromuro de Etidio, se mezcla por inversión de manera muy cuidadosa y se eliminan las burbujas que se hubiesen formado
- - La densidad de la mezcla resultante ácido nucléico/TE/CICs/BrEt es de 1.55g/ml y el índice de refracción es de 1.3860. Este paso es fundamental dado que la formación del gradiente depende de la densidad de la mezcla.
- La eliminación de burbujas es fundamental dado que el tubo será centrifugado a muy alta velocidad y la presencia de aire puede ocasionar que el tubo se colapse.
- - El tubo se equilibra con otro de la misma densidad de CICs en una balanza y se sella por la parte superior con las herramientas adecuadas para tal fin.
- - Se introduce el tubo en un rotor de ángulo fijo NVT 90 o vertical VTi 90 y se centrifuga a 80000 x g durante 4 horas.

- - Después de la centrifugación se recupera el tubo del rotor con mucho cuidado y se observa en un soporte universal con luz ultravioleta de onda larga para localizar las bandas de DNA.
- - Se recuperan las bandas por punción del tubo con una aguja de gran calibre, cuidando siempre que el bisel de la aguja este hacia arriba, e introduciendo la punta de esta un poco por debajo de la banda a recuperar.
- - Se deposita la solución en un tubo falcon de fondo redondo de cerrado a presión.(snap cap)
- - Se prepara una solución saturada de Cloruro de sodio que servirá para saturar el mismo volumen de isopropanol
- - Se agrega un volumen (igual al que se recupera después de picar el tubo) de isopropanol saturado a esta misma solución y se mezcla perfectamente por inversión a fin de extraer el bromuro de etidio de la muestra de DNA.
- - Se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio y se repite cuantas veces sea necesario hasta que el color primero rojo y después rosa del bromuro de etidio desaparezca, y se tiene una fase acuosa totalmente transparente.

Marcaje de DNA por la técnica de Nick Translation (Corte , Eliminación y Sustitución.

Preparar el amortiguador de Nick Translation que contiene lo siguiente:

0.5M de Tris-HCl pH 7.5

0.1M de $MgSO_4$

1mM de DTT

500 μ g/ml de Albúmina Sérica Bovina (BSA por sus siglas en inglés)

Mezcle en un tubo ependorf limpio, estéril y libre de DNAsas lo siguiente

10X amortiguador Nick	2.5µl
DNA	0.5µg
DNTPs	20 nM de cada uno
[α- ³² P] dNTP	16pmoles
H ₂ O para 21.5 µl	

Enfriar a 0°C

- Hacer una dilución de 10⁵ de una pequeña cantidad de una solución stock de DNAsa I pancreática (1mg/ml) en amortiguador Nick translation frío con 50% de glicerol. La enzima diluida es estable cuando se guarda a -20°C.
- Agregue 2.5µl de la DNAsa I diluida (10ng/ml) a la reacción y mezcle con vortex
- Agregue 2.5 unidades de de DNA polimerasa de *E. coli.* Mezcle con vortex suave
- Incube la reacción por 90 min a 16°C.
- Detenga la reacción por adición de 5 µl de EDTA 0.5 M pH8.0
- Determine la proporción de [α-³²P] dNTPs incorporado en el DNA (Sambrook;1989)
- Separe el DNA marcado radioactivamente de los dNTPs no incorporados por cromatografía sobre una columna de Sephadex G-50 (Sambrook;1989)

Preparación de geles de agarosa

Para separar fragmentos de diferente tamaño de DNA se pueden emplear geles de agarosa de diferente porcentaje de concentración, dependiendo del tamaño del fragmento del ácido nucleico a analizar. Se recomienda utilizar agarosa al 2 % cuando los fragmentos tienen un tamaño menor a las 150 pb. O bien agarosa al 0.9% cuando lo que se pretende separar son fragmentos de DNA genómico. Para realizar un gel de agarosa se siguen los siguientes pasos:

- Pesar agarosa (la cantidad depende del porcentaje del gel)de preferencia ultrapura o grado Biol. Mol.
 - Disolver en el volumen adecuado de TAE 1.0 X
 - Disolver la agarosa completamente a calor, evitando llegar al punto de ebullición.
 - Adicionar 2 μL de un stock de bromuro de etidio (5 mg/mL).
 - Homogenizar y verter en una canastilla. Ponerle el peine adecuado y dejar solidificar.
- Después se coloca la canastilla dentro de una cámara y se le adiciona el amortiguador de corrimiento, que es el mismo con el que se preparó el gel, en una concentración 1X. Enseguida las muestras se colocan en los carriles empleando para ello el amortiguador de muestra:

Concentración final

Amortiguador de muestra = Azul de bromofenol	0.25 %
Glicerol en agua	30.0 %

De este amortiguador se adicionan 1 μL con 2 a 3 μL de la muestra. Siempre es importante correr las muestras junto con el marcador de DNA. Se corre a 100 V ó 14 mAmp; por un tiempo 30 – 60 min par los minigeles 7cm de longitud por 5 de ancho, en el caso de los geles para separar el DNA genómico se realiza un gel de 20 cm de longitud y 12 de ancho aprox. y se corre 16 horas a 70 volts.

Purificación de DNA de geles de agarosa (Agarosa gel extraction Kit. Boheringer.)

- Cortar el fragmento de agarosa con el DNA que se desea purificar.
- Adicionar 300 μL de amortiguador 2 del kit a 1 μg de DNA.
- Adicionar 10 μL de sílica gel por 1 μg de DNA y 4 μL más por cada μg de DNA extra.
- Incubar por 20 min a una temperatura de 56-60 °C y mezclar en vortex cada 3 minutos.
- Centrifugar 30 seg a 10 000 x g a temperatura ambiente.
- Adicionar 500 μL de amortiguador 3 y homogenizar con vortex.
- Centrifugar 30 seg a 10 000 x g a temperatura ambiente y después descartar sobrenadante.

- Adicionar 500 μL de Amortiguador 4 y homogenizar por vortex.
- Centrifugar 30 seg a velocidad máxima a temperatura ambiente y después descartar el sobrenadante.
- Repetir 1 vez.
- Secar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Resuspender en 25 μL de agua destilada.
- Incubar a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min.
- Centrifugar 30 seg a 10 000 x g a temperatura ambiente y después tomar el sobrenadante que contienen el DNA. Repetir al menos dos veces sin juntar las dos extracciones para recuperar el máximo de DNA.
- Cuantificar el DNA.
- Identificar en un gel de agarosa.

Cuantificación del DNA

a) Espectrofotómetro

Se realiza una dilución 1:100 del ácido nucleico en agua destilada o agua-DEPC, según sea conveniente. Esta dilución se lee a una $\lambda= 260 \text{ nm}$, calibrando con agua destilada o agua-DEPC. El cálculo de la concentración del ácido nucleico se realiza de la siguiente forma:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Abs} * \text{Factor de conversión} * V_{\text{total}}}{V_{\text{muestra}}} = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Donde V representa el Volumen de la muestra o total.

Factores de conversión (Catalogo Promega 2000) :

- | | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| 1. DNA de doble cadena | 1 D.O= 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ |
| 2. DNA de cadena sencilla | 1 D.O= 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ |
| 3. RNA | 1 D O= 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ |

Células competentes y transformación con plásmidos bacterianos

-Se hace un cultivo bacteriano de DH54 α en LB líquido a partir de preinóculo (en una dilución 1:100).

-Se incuba a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.3 a 0.4 a una longitud de onda de 490 nm (densidad óptica donde las bacterias se encuentran en fase logarítmica de crecimiento).

-Se centrifuga el cultivo a 2600 x g por 7 min a 4 °C y se resuspende en un volumen de CaCl₂ 0.1 M frío (volumen \underline{x}) para alcanzar una D.O de 0.5. Este volumen se calcula de la siguiente forma:

$$0.5 / D.O = z \quad y \quad 100 / z = \underline{x} \text{ volumen}$$

-Dejar en hielo por 10 min.

-Centrifugar a 2600 x g por 7 min a 4 °C y resuspender en 1/5 del volumen anterior.

-Estas células se alicuotan en tubos eppendorf de 200 μ L cada una y se congelan en nitrógeno líquido. Se guardan a -70 °C. Estas células competentes solo son eficientes durante 1 mes; sin embargo se recomienda usarlas el mismo día en que realizaron.

-TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO

-Se le adicionan a 200 μ L de células competentes, < 50 ng de DNA. La mezcla se incuba 30 min en hielo.

-Se calienta la mezcla de DNA y células a 42 °C por 90 seg.

-Inmediatamente se coloca en hielo 2 min. Después se le adicionan 800 μ L de LB y se incuba a 37 °C con agitación constante por una hora.

-Se siembra masivamente una caja de LB amp 50 con las células transformadas. Así mismo se siembran las cajas con los controles adecuados.

-Identificar el plásmido en un gel de agarosa al 1.0 %.

PBS

Disolver:

- 8 g de NaCl
- 0.2 g de KCl
- 1.44 g de KH₂PO₄
- 0.29 g de Na₂HPO₄

Esto en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 1 litro con agua destilada. Alicuotar y esterilizar por autoclave (121 °C, 15 libras de presión , 20 minutos).

SSC 20 X

Disolver:

- a) NaCl 175.3 g
- b) Citrato de sodio anhidro 88.2 g

En 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0. Esterilizar por autoclave.

Amortiguador de pre-hibridación

El amortiguador de pre hibridación consta de los siguientes reactivos :

REACTIVO	STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
Formamida	100 %	50 %
SSC	20 X	4 X
EDTA pH 8.0	0.5 M	2 mM
DNA de esperma de Samón (GIBCO)	10 mg/mL	500 µg/mL
Sulfato de dextrán (SIGMA)	50 % en agua-DEPC	10 %
Solución de Denhart	50 X	1 X

Este amortiguador se prepara en un tubo falcon, libre de DNAsas. A una papel de 100 cm² se le adicionan máximo 10 mL de este amortiguador. El amortiguador de Hibridación es el mismo solo que se le adiciona la sonda marcada con el isótopo radioactivo.

Solución Denhardt 50 X

(Yang *et al.*, 1999)

- a) Albúmina sérica bovina al 1% (SIGMA Cat. A2153)
- b) Polivinil pirrolidona al 1 % (SIGMA Cat. PVP-40)
- c) Ficoll al 1 % tipo 400 (SIGMA Cat. F5415)

Estos reactivos se mezclan uno por uno y la solución se esteriliza por filtración (0.22 μ de diámetro). Esta solución a estas concentraciones es al 50 X.

INMUNOHISTOQUIMICA

- Se desparafina el tejido dejando en horno a 60°C durante toda la noche.
- Se sumerge el corte en xilol durante 30 min a temperatura ambiente (tem. amb) dos veces.
- Se hidrata el tejido por pasos sucesivos en etanol desde una concentración inicial de 100% hasta una concentración final de 30% por 2 min. en cada caso.
- Se permeabiliza con PBS- Triton 0.25% durante 30 min a tem amb.
- Se sumerge el corte en una solución de H₂O₂ al 10% para la inhibición de la peroxidasa endógena a temperatura ambiente.
- Se lava el tejido con amortiguador PBS durante 5 min. a temperatura ambiente.
- Se bloquea para evitar señales inespecíficas con una mezcla de Albúmina Sérica Bovina (BSA) 10% y suero bovino 1% durante 30 min. a temperatura ambiente.
- Se lava con amortiguador PBS durante 5 min. a temperatura ambiente.
- Se añade el anticuerpo primario a una dilución de 1:500 y se deja incubando durante 16 horas a 4°C. El anticuerpo primario es una IgG hecha en ratón que reconoce los aminoácidos del 43-55 del producto del oncogene myc.
- Se lava con PBS durante 5 min.
- Se agrega un segundo anticuerpo dirigido contra el primero a una dilución de 1:250 y se deja incubando durante 2 horas a Temp. Amb. Este segundo anticuerpo es una IgG de conejo acoplada a peroxidasa que va dirigida contra la IgG de ratón.

- Se lava durante 5 min.
- Se revela el sistema enzimático utilizando el cromógeno 3'-3' Diaminobenzidina tetrahidroclorado al 0.05% y H₂O₂ al 1% en una solución de Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 durante máximo 15 minutos monitoreando la reacción (aparición de un precipitado insoluble de color café) bajo el microscopio.
- Se lava el corte con agua para detener la reacción.
- Se contratiñe con hematoxilina de Harris durante 20 seg. Y se lava con agua.- Se deshidrata el tejido con pasos gradual en etanol en concentraciones creciente desde 30% y hasta 100% dejando la muestra 2 min en cada solución.
- Se mantiene en Xilol hasta montar con una resina permanente como el Permout o alguna otra,
- Se observa al microscopio.