



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE GENES RELACIONADOS
CON APOPTOSIS Y PROLIFERACION CELULAR EN CORTES
HISTOLOGICOS DE TEJIDO CERVICAL DE RATONES
TRANSGENICOS K14HPV16 TRATADOS
CON $17\text{-}\beta$ -ESTRADIOL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A N :

CRUZ COLIN JOSE LUIS

PACHECO ESPINOSA CESAR



Unidad en la Diversidad:
Zaragoza Fierece al Siglo XXI

2004



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.

**ESTUDIO DE LA EXPRESION DE GENES RELACIONADOS CON
APOPTOSIS Y PROLIFERACION CELULAR EN CORTES
HISTOLOGICOS DE TEJIDO CERVICAL DE RATONES TRANSGENICOS
K14HPV16 TRATADOS CON 17- β -ESTRADIOL**

CRUZ COLIN JOSE LUIS
PACHECO ESPINOSA CESAR

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 24 del departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en colaboración con el laboratorio del Dr. Paul Lambert de McArdle Laboratory, University of Wisconsin Medical School, Madison; bajo la dirección del Dr. Patricio Gariglio Vidal. Fungiendo como asesor interno el Doctor Alberto Monroy García de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

DEDICATORIAS

DEDICATORIA

Con todo el amor y el cariño del mundo a mis padres que han estado conmigo a lo largo de todos estos años, por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios. Dios los bendiga siempre.

A mi mamá por todo lo que significa para mí, por todo el gran cariño y amor que siempre me ha dado, por sus consejos y regaños, por su gran fortaleza y carácter en los momentos difíciles.

A mi papá a quien tanto admiro y respeto, por que no tendría nunca con que pagarle todo el apoyo que siempre me ha brindado, su amor y cariño, sus enseñanzas y sus consejos.

A mi esposa por todo el cariño y amor que me ha brindado en todo este tiempo, por todos los momentos bellos que juntos hemos compartido, por su comprensión en los momentos más difíciles de mi vida, por sus consejos, pero sobre todo, por haberme dado la dicha de ser padre.

A mi hija Aline, por que significa mi razón de ser y de seguir adelante. - Por ser tan linda conmigo y como un testimonio y aliento para los momentos difíciles de tu vida -.

A mis hermanos por que todos y cada uno de ellos ocupan un lugar muy especial en mi vida, gracias por todos estos años en los que hemos compartido momentos difíciles y momentos buenos, por sus consejos, apoyo y cariño que me han brindado siempre.

A la memoria de mi hermano Noé, que aunque físicamente no está con nosotros, está en nuestros corazones y su cariño, alegría y consejos siguen con nosotros. Por que no te olvidamos.

A todos mis sobrinos a quienes quiero mucho y deseo lo mejor. Por que en un futuro vean sus sueños cristalizados y por que siempre conserven la unión familiar como hasta ahora.

A mis cuñados que han estado presentes en las buenas y en las malas, a quienes estimo demasiado y considero parte importante de mi familia. Gracias.

DEDICATORIA

A mis padres Luis y Rafaela, que gracias a su amor, apoyo y comprensión lograron guiarme en los caminos correctos de la vida, no tengo las palabras para agradecerles, simplemente los AMO.

A mis hermanos Paty, Paz, Martin, Mary, Yolanda y Salomon por sus consejos y apoyo además de compartir conmigo gran parte de su vida...gracias.....

A mis cuñados Poly, Ernesto, Janis y Paz por sus consejos y regaños que me fueron de gran utilidad durante todo este tiempo.

A mis Sobrinos Elizabeth, Adrian, Marisol, Leonardo, Cesar, Mariana, Viviana, los Danieles, Christian, Oscarito y Erick, gracias por sus travesuras y por darme alegría en los momentos de tristeza.

Pero sobretodo se la dedico a mi sobrino Oscar que en este momento esta con Dios observando mis travesuras, cuanto me hace falta tu presencia... todo es diferente desde que te fuiste.....nunca te olvidare te llevo en mi corazón.

A mi gran Amor Elizabeth por todo su apoyo incondicional durante estos dos años y por aguantarme en mis momentos de locura, por compartir conmigo aventuras inolvidables, te agradezco de todo corazón y sabes te AMO.....

AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Alberto Monroy García por su amistad y su apoyo incondicional durante todo este tiempo. Por habernos permitido formar parte de su grupo de investigación. Mil Gracias.

Al Maestro en Ciencias Jorge Hernández Montes por su amistad y por que siempre tuvo la disponibilidad y voluntad cuando lo necesitamos.

A todos los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que contribuyeron en nuestra formación académica.

A Wilox por su amistad, por que siempre nos brindo todo su apoyo incondicional, además de sus enseñanzas durante nuestra estancia en el laboratorio.

A el Dr. Horacio Astudillo del Hospital Centro Médico Siglo XXI por su apoyo con el equipo para análisis de imágenes.

A la Doctora Ruth Hernández Mote del Departamento de Patología del Hospital Infantil de México por su valiosa colaboración en el análisis histopatológico.

A todos nuestros amigos que siempre estuvieron con nosotros en los buenos y malos momentos, a Elizabeth, Priciliana, Julia, Joel, toño, José, José piccito y los que falten.

Al Dr. Patricio Gariglio Vidal por habernos permitido tener el privilegio de formar parte de su grupo de investigación. Muchas gracias.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1.- RESUMEN..... | 1 |
| 2.-INTRODUCCION..... | 2 |
| 2.1 El virus del papiloma humano..... | 2 |
| 2.2 p21..... | 4 |
| 2.3 C-MYC..... | 5 |
| 2.4 H-RAS..... | 6 |
| 2.5 Bcl-2..... | 6 |
| 2.6 PCNA | 7 |
| 2.7 Apoptosis..... | 7 |
| 3.- JUSTIFICACION DEL ESTUDIO..... | 9 |
| 4.- HIPOTESIS..... | 9 |
| 5.- OBJETIVOS..... | 10 |
| 6.- Objetivo General..... | 10 |
| 7.-Objetivos Particulares..... | 10 |
| 8.-MATERIAL Y METODOS | 11 |
| 8.1 Líneas celulares..... | 11 |
| 8.2 Extracción de RNA total..... | 11 |
| 8.3 Síntesis del cDNA..... | 12 |
| 8.4 Reacción en cadena de la polimerasa..... | 12 |
| 8.5 Ratones transgénicos..... | 13 |
| 8.6 PCR <i>in situ</i> | 13 |
| 8.7 Secuencias de primers utilizados..... | 15 |
| 8.7 RT-PCR <i>in situ</i> | 16 |
| 8.8 Inmunohistoquímica..... | 17 |
| 8.9 Tunel..... | 18 |
| 9.- RESULTADOS..... | 19 |
| 9.1 FIGURA 1..... | 21 |
| 9.2 FIGURA 2 | 22 |
| 9.3 FIGURA 3..... | 23 |
| 9.4 FIGURA 4..... | 24 |
| 9.5 FIGURA 5..... | 25 |
| 9.6 FIGURA 6..... | 26 |
| 9.7 FIGURA 7..... | 27 |
| 9.8 FIGURA 8..... | 28 |
| 9.9 FIGURA 9..... | 29 |
| 9.10 FIGURA 10..... | 30 |
| 9.11 FIGURA 11..... | 31 |

| | |
|------------------------------|----|
| 9.12 FIGURA 12 | 32 |
| 10.-DISCUSION..... | 33 |
| 10.1 Expresión de p21..... | 34 |
| 10.2 Expresión de C-MYC..... | 35 |
| 10.3 Expresión de H-ras..... | 35 |
| 10.4 Expresión de Bcl-2..... | 35 |
| 10.5 Detección de PCNA..... | 36 |
| 10.6 Tunel..... | 36 |
| 11.- CONCLUSIONES..... | 37 |
| 12.- PERSPECTIVAS..... | 38 |
| 13.- BIBLIOGRAFIA..... | 39 |
| 14.- APENDICE..... | 49 |

RESUMEN

El desarrollo del cáncer Cérvico Uterino (CaCu), está estrechamente relacionado con las infecciones persistentes que producen algunos tipos de virus del papiloma humano (HPV), en particular los tipos 16 y 18, los cuales codifican a las oncoproteínas E6 y E7. Esta enfermedad constituye la principal causa de mortandad entre las mujeres mexicanas. Sin embargo la mayoría de las lesiones que contienen HPV de alto riesgo no progresan a carcinoma *in situ* o invasor debido a que la infección con HPV es necesaria pero no suficiente, lo cual implica la participación de cofactores ambientales o genéticos, por ejemplo el humo de cigarro, la predisposición genética y el uso prolongado de anticonceptivos, que en su mayoría contienen estrógeno; de tal manera que se ha demostrado, que el uso prolongado de anticonceptivos, junto con la infección por HPV incrementan el riesgo para desarrollar neoplasias.

Debido a que el HPV es un problema de salud pública, se han generado modelos de investigación para su estudio, los cuales consisten en la creación de cepas de ratones transgénicos; los ratones utilizados en este trabajo, (raton K14E7HPV16) expresan el oncogen E7 del HPV, el cual está regulado por el promotor de citoqueratina 14 (K14) para dirigir la expresión del oncogen E7 en la capa basal del epitelio; estos ratones desarrollan cáncer cervical cuando se les administra 17β -estradiol.

Con base a lo anterior, es de gran interés conocer lo que sucede a nivel molecular en estos modelos de estudio cuando se les administra 17β -estradiol para inducir cáncer, y poder conocer los niveles de expresión de algunos genes que participan en apoptosis y proliferación, tales como p21, c-myc, H-ras y bcl-2 para lo cual se emplearon tecnologías de punta, como son PCR *in situ*, RT-PCR *in situ*, inmunohistoquímica y TUNEL. Se observó que el oncogen E7 del HPV causó displasia e hiperplasia en el cérvix de los ratones utilizados en este estudio; además, el tratamiento con 17β -estradiol indujo la expresión de p-21, de c-myc y de Bcl-2 en el tejido cervical del los ratones Wt+E y E7+E, sin embargo el 17β -estradiol no tuvo efectos sobre la expresión de H-ras en este modelo de estudio. Respecto a la proliferación celular, se observó que ésta se restringe únicamente a la capa basal de los ratones Wt-E y Wt+E y que en los ratones E7-E y E7+E se incrementa a través de todo el epitelio. En cuanto a los niveles de apoptosis, se observó que es mayor en los ratones Wt-E, Wt+E y E7-E. Por lo anterior podemos concluir que el estrógeno contribuye a la persistencia del Virus del Papiloma Humano y a una subsecuente progresión neoplásica, por un incremento en la expresión genética viral, de tal manera que se encuentra alterada la expresión de genes importantes en proliferación celular y apoptosis.

INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) constituye la principal causa de mortalidad entre las mujeres mexicanas. En 1999, en México se diagnosticaron más de 11,000 casos nuevos de cáncer cérvico uterino invasor y más de 9,000 casos de cáncer *in situ*. Solamente en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, se presentan cada año más de 850 casos nuevos de los cuales la mayoría de los pacientes ingresan con enfermedad avanzada, con un mal pronóstico y representan una enorme pérdida de recursos humanos y económicos para el país (Mohar *et al.*, 1999).

El desarrollo de CaCu esta estrechamente relacionado con las infecciones que producen algunos tipos de virus del papiloma humano (HPV), conocidos como HPV de alto riesgo. A la fecha se han identificado 100 tipos distintos de HPV; clasificados hasta ahora como de bajo y alto riesgo; cerca de la tercera parte infectan las regiones genitales (Zur Hausen *et al.*, 1996). Los HPV de alto riesgo se asocian de manera directa con el desarrollo de neoplasias genitales, en particular los tipos 16 y 18, pues se encuentran en más del 90% de todos los tumores cervicales (Berumen *et al.*, 1994; 1997; Bosh *et al.*, 1996; Gariglio *et al.*, 1998) y junto con los tipos 31, 33, 35, 45 y 58 alcanzan más del 95% de ellos. Además, existen variantes moleculares de HPV que parecen ser más agresivos y tener diferentes comportamientos biológicos (Berumen *et al.*, 1994; Berumen *et al.*, 2001; Hildesheim *et al.*, 2001). Así pues, la historia natural de las infecciones por HPV de alto riesgo influye de manera directa en el curso y el pronóstico del CaCu y las infecciones por estos se asocian claramente con un mayor riesgo para desarrollarlo, aunque no debemos olvidar que existen otros factores de riesgo importantes para el desarrollo de esta enfermedad (Walboomers *et al.*, 1999).

EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Los papilomavirus humanos (HPVs) son pequeños virus de DNA (genomas de aproximadamente 8 Kb). El genoma del HPV está dividido en regiones llamadas marcos de lectura abiertos (ORFs) los cuales corresponden a diferentes transcritos. Los ORFs relacionados a las proteínas de la cápside que son expresados en forma tardía (Late, L) en la infección son llamados L1 y L2; y los ORFs que se expresan tempranamente (Early, E). Por ejemplo, E2 que dirige la síntesis de proteínas reguladoras, algunas de las cuales a su vez dirigen la expresión de E6 y E7 (Gerard, 2000). Los HPV inducen tumores benignos y malignos en humanos y en una amplia variedad de especies animales, algunos virus causan verrugas mientras que otros causan carcinomas, infectando diferentes tejidos epiteliales, predominando en mucosas las hiperplasias, papilomas y condilomas (Arbeit *et al.*, 1994). Los HPV de tipo 16, 18, 31 y 33 están fuertemente asociados con carcinomas cervicales, de los cuales los tipo 16 y 18 se encuentran en un 80 y 90% en cáncer invasor del cérvix respectivamente (Arbeit *et al.*, 1993). Los HPV de alto riesgo codifican a 2 oncoproteínas, E6 y E7 (llamados también oncogenes) que inactivan la función de las proteínas supresoras de tumor, p53 y retinoblastoma (Rb), respectivamente (Sheffner *et al.*,

1994; Munger y Howley, 2002; Helt *et al.*, 2002; Camus *et al.*, 2003). E7 principalmente se asocia con proteínas que regulan el ciclo celular y controlan la progresión en condiciones fisiológicas normales como son Rb, p107, p130, p21, p27, asociándose directamente con las ciclinas A y E incrementando su expresión (Dyson *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1997) y desregulando la transición de G1 a S. Por otro lado, se ha demostrado que E6 tiene la capacidad de inmortalizar células en cultivo, ya que principalmente se asocia con proteínas que son importantes con la estabilidad del genoma, o proteínas asociadas con las señales de transducción, que involucran interacciones célula-célula, además degrada a p53 vía ubiquitinación. Sin embargo, en epitelio escamoso cervical humano, la mayoría de las lesiones que contienen HPV de alto riesgo, no progresan a carcinoma *in situ* o invasor, debido a que la infección con HPV es necesaria, pero no suficiente (Lowy *et al.*, 1994; Zur Hausen, 1991), lo cual implica la participación de cofactores ambientales o genéticos, por ejemplo el humo de cigarro y la predisposición genética (Apple *et al.*, 1994; Shiffman *et al.*, 1987). Otro cofactor que está asociado con el desarrollo de neoplasias que son provocadas por HPV, es la exposición prolongada a estrógenos, ya que se ha observado que el estrógeno, tiene la capacidad de transactivar el genoma viral en líneas celulares que contienen HPV (Mitrani *et al.*, 1989), además el promotor de 1 kb del HPV 16 y 18 ha mostrado tener elementos de respuesta a progesterona y glucocorticoides (Pater *et al.*, 1994), de tal manera que se ha demostrado, que el uso prolongado de anticonceptivos, de los cuales la mayoría contienen estrógeno, incrementan el riesgo para desarrollar neoplasias junto con la infección por HPV (Brisson *et al.*, 1994). Incluso el embarazo parece ser un medio permisivo para la persistencia de la infección causada por el HPV (Schneider *et al.*, 1987).

El mecanismo por el cual el estrógeno puede contribuir al desarrollo de una neoplasia, que es inducida por el HPV probablemente se debe, a que la infección con HPV incrementa la 16 α -hidroxilación del estradiol (Auborn *et al.*, 1991), incrementando de esta manera, la cantidad de 16 α -hidroxiestrone, un metabolito que es carcinogénico (Yager y Liehr, 1996), provocando el crecimiento de células que están inmortalizadas con HPV (Newfiel *et al.*, 1998). Incluso el estrógeno incrementa la expresión del HPV en células SiHa y CaSki (Yuan *et al.*, 1999) inhibiendo la apoptosis (Spyridopoulos *et al.*, 1997).

Las actividades oncogénicas de E6 y E7 se han estudiado *in vivo* a través de la generación y caracterización de ratones transgénicos, los cuales son expresados en varios tejidos por diferentes promotores transcripcionales de tal manera que E6 y E7 juntos, pueden inducir varios tipos de tumores, dependiendo del tejido en el que se estén expresando (Arbeit *et al.*, 1994).

E6 y E7 juegan diferentes papeles en la carcinogénesis, la cual esta dividida en tres etapas: Iniciación, promoción y progresión (Boutwell, 1989; Drinkwater, 1989); la Iniciación, generalmente es considerada como un cambio genético permanente, que es asociado con la activación del oncogene cHa-ras, la

promoción es un proceso epigenético reversible, resultando en la expansión clonal de células que producen papilomas benignos y la progresión de papilomas a carcinoma celular escamoso (SCCs), aparece espontáneamente, en general en un intervalo bajo, pero el intervalo a progresión maligna se puede incrementar por la exposición a agentes genotóxicos (Arbeit *et al.*, 1993), debido a que E6 y E7 sinergizan con carcinógenos químicos, causando la formación del tumor, de tal manera que en la carcinogénesis E6 actúa débilmente en la etapa de promoción, pero fuertemente en la etapa de progresión, lo cual involucra la progresión maligna del tumor, a diferencia de E7 que principalmente actúa la etapa de promoción (Shiyu *et al.*, 2000).

Debido a que el HPV es un problema de salud pública, se han generado modelos de investigación para su estudio, que consisten en la creación de cepas de ratones transgénicos como: FVB/N, SENCAR, CD-1, BALB/c; de las cuales la más usada es la cepa FVB/N debido a las grandes ventajas que posee como son: (i) un gran pronúcleo que facilita la microinyección del DNA, (ii) una gran camada comparada con otras variedades y (iii) la caracterización detallada (Hennings *et al.*, 1993). La importancia de generar ratones transgénicos, radica en el desarrollo de modelos útiles para estudiar diversas enfermedades y en este caso en particular el cáncer cérvico-uterino. Los ratones utilizados en este trabajo expresan el oncogen E7 del HPV, que está regulado por el promotor de citoqueratina 14 (K14) para dirigir la expresión de los HPVs en la capa basal del epitelio; este promotor fue elegido debido a que las células basales expresan específicamente K14 (Guo *et al.*, 1993; Hildesheim *et al.*, 2001). Estas células son mitóticamente activas y así pueden desarrollar mutaciones en respuesta a estímulos, además la expresión de K14 se ha mantenido en carcinomas bien diferenciados (Arbeit *et al.*, 1996). Los ratones que expresan los oncogenes E6 y E7 de papilomavirus humano tipo 16 bajo el promotor K14 (ratones K14-HPV16), desarrollan cáncer cervical cuando se les administra 17β -estradiol únicamente en la vagina y el cérvix (Arbeit *et al.*, 1996). Con base a lo anterior, es de gran interés conocer lo que sucede a nivel molecular en estos modelos de ratones cuando se les administra 17β -estradiol para inducir cáncer, y poder conocer los niveles de expresión de algunos genes que participan en apoptosis y proliferación, tales como p21, c-myc, H-ras, bcl-2, utilizando los niveles constitutivos del gen HPRT como control.

Existen alrededor de 100 protooncogenes y sería difícil mencionar las características de cada uno de ellos. Sin embargo, por su importancia en apoptosis y proliferación, se mencionarán algunas propiedades de los genes que se analizaron en este trabajo como son: p21, c-myc, H-ras y bcl-2.

p21

La progresión del ciclo celular está regulado por las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (cdks) (Pronk y Bos, 1992). Diferentes complejos de ciclinas-cdks son activados en etapas específicas del ciclo celular. Las actividades de estos complejos son regulados por sus inhibidores, los cuales incluyen a las

familias INK4 y Cip1/Kip (Peststell *et al.*, 1999). p21Waf1/Cip1 el primer inhibidor identificado, pertenece a la familia Cip1/kip formada por p21Cip1, p27Kip1 y p57kip2 (Sherr and Roberts, 1995).

El gen p21 es regulado por diferentes mecanismos, por ejemplo cuando se induce daño al DNA, la proteína p53 se estabiliza e induce la activación transcripcional y expresión de p21 para detener el ciclo celular, para que el daño se repare, de lo contrario se induce apoptosis (Lai *et al.*, 2002; El-Deiry *et al.*, 1993).

La capacidad de las oncoproteínas virales para inducir a la célula a traspasar los puntos importantes del ciclo celular, constituyen un mecanismo que provoca inestabilidad genómica, afectando a los inhibidores de las ciclinas en las fases de G1 y G2, en cada caso por mecanismos diferentes. E7 se une directamente a p21, y libera a PCNA y a otros genes que promueven la fase de síntesis (Cho *et al.*, 2002).

C-MYC

La expresión del gen c-myc depende de factores de crecimiento y aumenta con la entrada de las células al ciclo celular, sugiriendo que la expresión de este gen puede ser un componente de la proliferación celular normal. La proteína c-myc interacciona con varias proteínas tales como Max para controlar la transcripción de algunos genes. Se ha determinado que una sobre-expresión de c-myc lleva al cambio de los homodímeros Max-Max a heterodímeros Myc-Max, cambiando una represión génica en una activación (Lee *et al.*, 1995). La proteína c-myc puede también inhibir la expresión de varios genes y se ha sugerido que esta actividad es importante para su función (Prendergast, 1999; Claassent y Hann, 1999); además de participar en la transcripción de genes controla el crecimiento celular. Recientemente se ha determinado que c-myc induce apoptosis en fibroblastos cuando se les retira el suero, también en células que permanecen bloqueadas por agentes químicos o por citocinas antiproliferativas. Para que c-myc induzca apoptosis requiere de la interacción con Max. Es posible que c-myc tenga efectos proapoptóticos directos, independientes de su función como factor transcripcional. Un estudio reciente demostró que c-myc favorece la disociación del citocromo C de la mitocondria (Juin *et al.*, 1999). C-myc es un potente inductor de proliferación celular y apoptosis *in vivo*, la expresión desregulada de c-myc, inhibe la diferenciación y el arresto del crecimiento de algunos tipos celulares. El producto del gen supresor de tumor p19ARF es inducido en células que sobre expresan c-myc, sugiriendo que p53 puede mediar la liberación del citocromo C inducida por c-myc (Amati y Land., 1994). Además c-myc está involucrado en el desarrollo de tumores en cérvix, interactuando con el HPV-16 (Ocádiz *et al.*, 1987; 1989).

H-Ras

La activación de las proteínas Ras es un componente crucial en la transducción de señales extracelulares que estimulan proliferación y diferenciación (Pronk y Bos, 1994). Ras silvestre es activado por el cambio de GDP a GTP, proceso catalizado por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), además la proteína Ras oncogénica permanece en su forma activa unida a GTP (Bos, 1989). Ras activo se asocia con efectores tales como la proteína cinasa de la familia Raf, la subunidad catalítica de un fosfatidilinositol-3 (PI3K) y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Ral (RalGEFs) para ejercer sus efectos biológicos (Marshall, 1996; Bos, 1997). Las cinasas Raf controlan la activación de las cinasas MAP, Erk1 y Erk2 las cuales están involucradas en la fosforilación de la proteína en mitogénesis y diferenciación (Marais y Marshall, 1996). PI3K protege a las células transformadas por Ras de la fase de inicio de la apoptosis (Rob *et al.*, 1999).

Además las oncoproteínas E6 y E7 cooperan con el oncogén Ras para transformar células epiteliales, también se propone que H-ras regula la expresión de las oncoproteínas del HPV a través de la actividad de AP-1 (Medina-Martinez *et al.*, 1997). Por otro lado se han descrito mutaciones puntuales en los codones 12 y 61 de H-ras las cuales han sido relacionadas con el desarrollo de cáncer cervical (Van *et al.*, 1993).

Bcl-2

La proteína anti-apoptótica Bcl-2 se localiza en la parte exterior de la membrana nuclear y en la parte exterior de la membrana de la mitocondria además del retículo endoplásmico (El-Deyri *et al.*, 1994). Existe evidencia de que la mitocondria juega un papel muy importante en la muerte celular programada; esta evidencia incluye el descubrimiento de que el citocromo C es liberado de la mitocondria en células que están en apoptosis. Además del citocromo C, la activación de la caspasa-3 requiere un factor citosólico designado como el factor de activación de la proteasa apoptótica (Apaf-1) (Liu *et al.*, 1996). En células de mamíferos la caspasa-3 normalmente existe como precursor inactivo de 32 Kd, y es convertida proteolíticamente a un heterodímero activo de 20 y 10 Kd cuando las células entran en apoptosis (Nicholson *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1996). La caspasa-3 es autocatalítica, además de romper y activar otras caspasas para una rápida e irreversible apoptosis (Wang *et al.*, 1996). Entre los sustratos de la caspasa-3 podemos mencionar a la subunidad del factor de fragmentación de DNA (DFF) y la serina-treonina cinasa PAK2. DFF dispara la fragmentación del DNA activando una endonucleasa (Liu *et al.*, 1997), mientras que PAK2 se requiere para el rompimiento de la membrana y la formación de cuerpos apoptóticos (Rudel *et al.* 1997). Bcl-2 inhibe la activación de la caspasa-3 en respuesta a señales apoptóticas (Boulakia *et al.*, 1996); un posible mecanismo por el cual Bcl-2 detiene la activación de la caspasa-3 es bloqueando la liberación del citocromo C de la mitocondria debido a una sobre-expresión (Kluck *et al.*, 1997). La expresión de Bcl-2 especialmente en lesiones pre-invasoras, puede jugar un

papel muy importante en la apoptosis, además de ser considerado como un marcador de progresión de la enfermedad (Ozalp *et al.*, 2002). Además se ha observado en las displasias en etapas avanzadas y en carcinomas la expresión de Bcl-2, encontrando una fuerte asociación entre la presencia de Bcl-2 en epitelio con el grado de displasia y también con la actividad proliferativa (Brychtova *et al.*, 2000).

PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular)

Recientemente, el antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA) ha sido usado para identificar células en replicación. El PCNA actúa como un factor de la polimerasa δ y ϵ , es esencial para la replicación del DNA (Kelman *et al.*, 1997; Tsurimoto, 1998). La detección de PCNA en estudios de animales ha proporcionado resultados que son comparables con los del uso de timidina tritiada (Eldridge *et al.*, 1993; Folley *et al.*, 1993; Li., 1994). Estos resultados sugieren que el PCNA, puede servir como un marcador endógeno de proliferación celular. Además de este papel en la replicación del DNA, el PCNA está también involucrado en la reparación del DNA. La sobre expresión de PCNA sin tener proliferación celular se observó en células después de inducir daño al DNA con irradiación de UV (Celis y Madsen, 1986; Toschi y Bravo, 1998; Nichols y Sancar, 1992). Estudios recientes, sugieren que PCNA puede actuar como un sitio de acoplamiento, interactuando con numerosas proteínas, que están involucradas en la regulación del ciclo celular y reparación del DNA (Kelman, 1997; 1988).

Se ha demostrado, que la expresión de PCNA, es intensa en carcinomas orales que contienen el virus del papiloma humano tipo 16 y 18 (Soares *et al.*, 2003). Además, la inducción de PCNA esta asociada con la presencia del HPV, sugiriéndose que el HPV, puede reactivar a PCNA; de esta manera interfiere con la maquinaria de replicación de la célula del hospedero (Lu *et al.*, 1996).

Uno de los mecanismos para que una célula prolifere descontroladamente y pueda dar origen a un cáncer, es la evasión de la apoptosis además de otros.

APOPTOSIS

Apoptosis es la muerte celular programada genéticamente, la cual juega un papel muy importante durante el desarrollo embrionario, homeostasis y en la defensa de los organismos multicelulares (Kerr *et al.*, 1972). Las características morfológicas y bioquímicas de las células que están en apoptosis, incluyen la condensación de la cromatina, el rompimiento de la membrana plasmática la cual involucra el cambio de lugar de fosfatidilserina de la membrana plasmática interna, hacia el exterior y la fragmentación del DNA internucleosomal. La estricta regulación de la muerte celular programada, es esencial para la prevención de enfermedades. En los humanos, diversas enfermedades están asociadas con las deficiencias en los mecanismos de apoptosis, entre las que se encuentran algunos desordenes neurodegenerativos, el SIDA y cáncer (Barr y Tomei., 1994). La célula cancerosa tiene seis capacidades : (1) autosuficiencia en la producción de sus

propias señales de crecimiento, (2) se convierten insensibles a señales que son inhibitorias, (3) se dirigen hacia una angiogénesis, (4) tienen un potencial replicativo ilimitado, (5) provocan la metástasis, y (6) evaden la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2000). La apoptosis, es iniciada por mecanismos, que regulan el crecimiento y diferenciación celular, así como la expresión de protooncogenes (genes normales) y oncogenes (versiones alteradas) (Raff, 1992), entre los cuales está pRB, el cual controla la proliferación y la apoptosis a través de la represión activa de los promotores dependientes de E2F. La apoptosis es regulada por un mecanismo, a través de la liberación y regulación del citocromo C, mediado por p53 y/o p73, a través de la regulación transcripcional de genes proapoptóticos como APAF1, la pérdida de la función de pRB resulta en hiperproliferación, conduciendo hacia un bloqueo del crecimiento y/o apoptosis.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Dado que el CaCu representa un enorme problema de salud, considerado como principal causa de muerte en México, han surgido numerosas líneas de investigación a nivel nacional e internacional. Desde hace algunos años, diferentes expertos en este campo, han formado colaboraciones y grupos multidisciplinarios y multi-institucionales para abordarlo. Por lo tanto es de nuestro interés, conocer la expresión de algunos genes que participan en la proliferación y la apoptosis en el tejido cervical cuando se le administra 17β -estradiol, ya que se ha observado una importante relación estrógenos-HPV en el desarrollo de CaCu, debido al uso desmedido de anticonceptivos y a las infecciones persistentes con HPV. Encaminado el presente trabajo, hacia la contribución de los conocimientos para la cura y erradicación de esta enfermedad; para lo cual se emplearon tecnologías de punta, como son PCR *in situ*, RT-PCR *in situ*, inmunohistoquímica y TUNEL.

HIPÓTESIS

- Si el estrógeno contribuye al incremento de la expresión genética viral (E6, E7) del Virus del Papiloma Humano (HPV) y por lo tanto a una subsecuente progresión neoplásica, entonces se encontrará alterada la expresión de algunos genes importantes en proliferación celular y apoptosis, en tejido cervical de ratones transgénicos K14HPV16-E7 tratados con 17β -estradiol.

OBJETIVO GENERAL

- Analizar la expresión de los genes relacionados con proliferación celular y apoptosis, en tejidos de cérvix de ratones transgénicos K14HPV16-E7 tratados con 17β -estradiol.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Utilizar cultivos primarios de Queratinocitos normales y Queratinocitos inmortalizados con HPV 16 para probar los oligos problema y para la estandarización de la técnica de RT-PCR *in situ*.
- Analizar la expresión de los genes relacionados con proliferación celular como son: p21, c-myc, H-ras y bcl-2, mediante la técnica de RT-PCR *in situ* en tejidos de cérvix de ratones transgénicos K14HPV16-E7, tratados con 17β -estradiol.
- Determinar indirectamente los cambios de proliferación celular en tejidos de cérvix de ratones transgénicos k14HPV16-E7 tratados con 17β -estradiol mediante Inmunohistoquímica.
- Determinar los niveles de apoptosis en tejidos de cérvix de ratones transgénicos K14HPV16-E7 tratados con 17β -estradiol mediante la técnica de TUNEL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizaron Cultivos Primarios de Queratinocitos normales y Queratinocitos inmortalizados con HPV 16. Las células fueron cultivadas en cajas Petri adecuadas con medio especial para Queratinocitos (Invitrogen, USA), antibiótico ciprofloxacina (10 µg/ml) y fungizona (Invitrogen, USA) utilizando una concentración final de 2.5 µg/ml. Se crecieron las células hasta obtener la confluencia, posteriormente se extrajo el medio agregando PBS para lavar en 2 ocasiones, se extrajo el PBS, inmediatamente después se adicionó tripsina incubando a 37°C durante 5 minutos para desprender las células de la caja. Para detener la acción de la tripsina se agregó medio especial para queratinocitos enriquecido con suero, se mezcló con una pipeta hasta disolver perfectamente los agregados y se centrifugó a 2000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen suficiente para sembrar en el número de cajas deseadas a confluencia, se agregó a cada una de las cajas el medio especial de queratinocitos e incubó en una atmósfera de CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C para permitir su crecimiento. Finalmente se extrajo RNA total de queratinocitos normales y de queratinocitos inmortalizados con el oncogen viral E7 del HPV16, el cual se cuantificó con la ayuda de un espectrofotómetro (Perkin Elmer MBA 2000) a una longitud de onda de 260 nm.

Los queratinocitos inmortalizados con el HPV 16, son una línea celular establecida y proporcionada por el Dr. Frank Röesl (Deutsches Krebsforschungszentrum, Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie, Abteilung Tumorstudiologie, Heidelberg, Germany). Esta línea celular, fué manipulada al igual que el cultivo primario de queratinocitos.

Extracción de RNA total

La obtención del RNA total de los cultivos celulares antes mencionados, se realizó por el método de Trizol, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA), descrito a continuación:

Se agregaron 2 ml de Trizol, por cada caja Petri a temperatura ambiente y se colocaron en 2 tubos para microcentrifuga. A cada uno de los tubos se les agregó 200 µl de cloroformo (almacenado a -20°C) por cada ml de Trizol, se agitó vigorosamente durante 30 seg. manualmente y después con vortex hasta obtener un color rosa uniforme, se incubó 15 min a 4°C (se agitó con vortex cada 5 min y al final durante 30 seg). Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/15 min/ 4°C. La fase inferior (orgánica) contiene DNA y proteínas, mientras que la superior es la fase acuosa (60% del volumen del Trizol, el cual contiene el RNA total). Se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo, se agregó un volumen de isopropanol por cada ml de trizol, se mezcló suavemente; se incubó 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/10 min/ 4°C. La pastilla (RNA total) se lavó con 1 ml de etanol al 80% [en agua tratada con dietilpirocarbonato

(DEPC) almacenado a -20°C] por cada ml de Trizol, se agitó con vortex para resuspender la pastilla, se centrifugó a no más de 9000 rpm/10min/ 4°C , para repetir el lavado, se decantó en un solo paso y se dejó secar, finalmente se resuspendió en 100 μl de agua DEPC calentando a $60^{\circ}\text{C}/10$ min y se almacenó a -20°C .

Para visualizar el RNA obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa (BIO-RAD Laboratories, USA) al 1.8% en buffer tris-acetatos y EDTA (Acido etilen-diamino-tetra-acético) (TAE), teñido con bromuro de etidio, utilizando como solución amortiguadora o buffer de carga el colorante "Orange G" y visualizados en un trans-iluminador de luz U.V. Finalmente la imagen fue obtenida con una cámara GeneCam (SynGene, USA).

Síntesis del cDNA (Reacción de la Transcriptasa Reversa)

Partiendo del RNA total extraído de ambas líneas celulares, se tomó un volumen de muestra equivalente a 5 μg de RNA, al cual se le agregó 1 μl de oligonucleótido de timina (oligodT, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y agua tratada con DEPC al 0.1% para tener un volumen final de 12 μl , se incubó a 70°C durante 10 min. e inmediatamente se incubó en hielo durante 1 min. Posteriormente se le agregaron 4 μl de buffer 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM y MgCl_2 15mM), 2 μl de ditiotritol (DTT, 0.1mM), 1 μl de deoxinucleótidos tri-fosfatados : dATP, dGTP, dCTP y dTTP (dNTP's, 0.2 mM); 1 μl de inhibidor de enzimas que degradan el ARN (RNase Cloned, 10 U/ μl) se incubó a 42°C durante 2 min. y finalmente se agregó 1 μl de la enzima transcriptasa reversa, "SuperScriptTM II Rnase H" (200 U/ μl) y se dejó actuar a 42°C durante 2 horas. Finalmente, se incubó a 70°C durante 15 min almacenando el cDNA a -20°C .

NOTA: Los reactivos utilizados, fueron obtenidos de la casa comercial Invitrogen, Life Technologies, USA. La metodología es la recomendada por el fabricante.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se prepararon tubos con un volumen de reacción final de 50 μl , los cuales contenían: 39 μl de agua ultrapura, 2.5 μl de Cloruro de Magnesio (MgCl_2 , 2mM), 1 μl del oligo sentido (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μl de oligo antisentido (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 5 μl de Buffer 10x (Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM), 1 μl dNTP's (0.2 mM) y 0.2 μl de la enzima Taq DNA polimerasa (5U/ μl) (Sambrook J., 1989). Las condiciones de amplificación son las siguientes: $\beta 2$ -microglobulina ($94^{\circ}\text{C}/1$ min, $60^{\circ}\text{C}/1.30$ min, $72^{\circ}\text{C}/1$ min por 30 ciclos. Wang *et al.*, 1993); E7 HPV ($94^{\circ}\text{C}/30$ seg, $63^{\circ}\text{C}/1$ min, $72^{\circ}\text{C}/1$ min por 30 ciclos. Aguilar-Lemarrooy *et al.*, 2002); p21 ($94^{\circ}\text{C}/30$ seg, $59^{\circ}\text{C}/1$ min, $72^{\circ}\text{C}/1$ min por 30 ciclos. Saegusa *et al.*, 2001); p53 ($94^{\circ}\text{C}/1$ min, $60^{\circ}\text{C}/1.30$ min, $72^{\circ}\text{C}/1$ min por 30 ciclos. Zakut-Houri *et al.*, 1985) y c-myc ($94^{\circ}\text{C}/1$ min, $65^{\circ}\text{C}/45$ seg, $72^{\circ}\text{C}/1$ min por 30 ciclos. Gartel *et al.*, 2001).

Para visualizar los productos del RT-PCR correspondientes a la expresión de dichos genes, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE (BIO-RAD, Laboratories, USA). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV. Por cada ensayo se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, Life Technologies, USA). Los geles fueron analizados utilizando una cámara digital (GeneCam, Syngene, USA).

Ratones Transgénicos

Se proporcionaron 200 laminillas de tejidos de ratones silvestres y transgénicos, que incluyen el tracto reproductivo completo de 30 diferentes ratones hembras de la cepa FVB/N que muestran ser permisivos a la carcinogénesis epidermal (Hennings, 1993). Los 30 ratones pertenecen a 4 diferentes grupos: silvestres sin/con tratamiento hormonal (Wt-E, Wt+E) y K14E7 sin/con tratamiento hormonal (E7-E, E7+E) y están contruidos, con 2 kb del promotor humano de la citoqueratina 14 (K14), el cual regula la expresión de la región temprana del papiloma virus humano tipo HPV16-E7

A los ratones silvestres Wt y K14E7 se les administró la hormona 17 β -estradiol (0.10 mg/60 días) al mes de nacidos durante seis meses en la parte dorsal, para inducirles cáncer en cérvix. Posterior al tratamiento, se sacrificaron y el tracto reproductivo se separó y se fijó en paraformaldehído al 4% durante 24 hrs, para después incluirlo en parafina y realizar los cortes a 5 μ m con la ayuda de un microtomo, colocándolos en porta objetos previamente silanizados. Dichos tejidos, fueron proporcionados por el Dr. Paul F. Lambert (McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin Medical School, 1400 University Avenue, Madison, Wisconsin 53706).

Posteriormente se realizó el estudio de la expresión de algunos genes que están relacionados en apoptosis y proliferación, para lo cual se emplearon las técnicas de PCR *in situ* (para ver la expresión de los genes), RT-PCR *in situ* (para ver la expresión a nivel de mRNA), ensayo de TUNEL (para detección de los niveles de apoptosis) e Inmunohistoquímica (para la expresión de la proteína). También se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina para el análisis histopatológico.

PCR *in situ*

Los tejidos previamente fijados sobre un portaobjeto silanizado, se incubaron a 65-70°C por 30 min, después se sumergieron en xileno durante 2 horas y etanol absoluto durante 30 min, se rehidrataron en agua bidestilada durante 3 min, seguido de 10 min en ácido clorhídrico 0.02N para romper los puentes de hidrógeno del DNA y RNA. Para permeabilizar la membrana se

dejaron por 3 min. en amortiguador salino de fosfato (PBS) 1X y Tritón X-100 (0.01%), posteriormente se les agregó proteinasa K (PK) 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durante 30 min. para degradar parcialmente las proteínas, después se lavaron en PBS. Los sitios inespecíficos se acetilaron con ácido acético anhídrido 0.25% más trietanolamina durante 10 min, posteriormente se sumergieron en ácido acético al 20%.

Los oligos fueron diseñados para alinearse con el fragmento del cDNA de interés en nuestro estudio y son los siguientes: HPRT (control interno), Myc, Bcl-2, E6, E7, p21, H-ras (Saegusa *et al.*, 2001; Gartel *et al.*, 2001; Zakut-Houri *et al.*, 1985; Aguilar *et al.*, 2002) ver Tabla 1.

Para la amplificación del DNA, se empleo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en donde se utilizó un termociclador Gene Amp *In situ* PCR System 1000 Thermal Cycle (Perkin-Elmer), para lo cual se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 50 μl que contiene: 36.5 μl H₂O, 5 μl de Buffer 10X, 1 μl de cada oligo a una concentración de 100ng/ μl (sentido y antisentido), 2.5 μl de dNTPs en el cual uno de los nucleótidos (dUTP) lleva unido la digoxigenina (DIG), 3 μl de cloruro de magnesio (MgCl₂, 2mM), 0.5 μl de la enzima Taq polimerasa (5U/ μl).

Las condiciones de amplificación del PCR variaron de acuerdo a los oligonucleótidos empleados y se describen a continuación.

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados y condiciones de amplificación

| GEN | SECUENCIA | CONDICIONES |
|-----------------|--|--|
| E6 | S- actgcaatgtttcaggaccc AN-tcaggacacagtggctttg | 3min a 94°C 30seg a 94°C 1min a 60°C 1min a 72°C |
| E7 | S- cccagctgtaatcatgcatg AN-tgccattaacaggtcttcc | 3min a 94°C 30seg a 94°C 1min a 60°C 1min a 72°C |
| HPRT | S- gtaatgatcagtcacgggggac AN-ccagcaagcttgcaaccttaacca | 3min a 94°C 1MIN a 94°C 1min a 59°C 1min a 72°C |
| c-Myc 183 pb | S- ctcaacgacagcagctcgccc AN-ggagacgtggcacctcttgac | 3min a 94°C 1MIN a 94°C 1min a 60°C 1min a 72°C |
| h-ras 136 pb | S- agctacggcatcccctacatc AN-agccggggccactctcatcag | 3min a 94°C 30 seg a 94°C 30 seg a 56°C 30 seg a 72°C |
| P21 262 pb | S- ttcagagccacaggcaccatg AN-gggaccaggggctcaggtaga | 3min a 94°C 30 seg a 94°C 30 seg a 60°C 30 seg a 72°C |
| Bcl-2 113 pb | S-tcctaacggagaagtaagag AN-gaatctgtttgctctcatac | 3min a 94°C 30 seg a 94°C 30 seg a 60°C 30 seg a 72°C |

Después de la amplificación se lavaron los tejidos en PBS y se bloquearon con la solución que contiene: 100 µl de Tris pH 7.4, 27 µl de NaCl 4M, 50 µg de BSA, 873 µl de H₂O) durante 30 min, después se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a una fosfatasa alcalina (Anti-DIG-AP, 150 U/µl) (Boehringer Mannheim, USA) durante 2 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en una solución que contiene: 34.5 ml de H₂O, 1.5 ml de NaCl 4M, 4 ml de Tris 1 M pH 7.5 y 40 µl de Tween durante 30 min, seguido de un buffer de detección para cambiar el pH y proporcionar el medio apropiado para que la fosfatasa alcalina reaccione con el sustrato, el buffer contiene: 855 µl de H₂O, 100 µl de Tris 1M pH 9.5, 20 µl de MgCl₂ 250

mM, 25 μ l de NaCl 4M. El color se desarrollo con la ayuda del Substrate Kit, Liquid BCIP/NBT (Zymed, Lab.USA) mezclando en 1 ml de agua ultrapura, agregando primero una gota del vial 1 y 3 (ver lista de reactivos y soluciones) homogenizando, para posteriormente agregar 1 gota del vial 2 (ver lista de reactivos y soluciones). Después, se agregaron aproximadamente 50 μ l de sustrato al tejido, incubando y observando constantemente al microscopio, hasta visualizar la reacción de color azul-morado. El tiempo para detener la reacción, vario de acuerdo a las condiciones empleadas, deteniéndose la reacción en agua bidestilada. Finalmente, se fijaron las muestras con un medio de montaje histológico (Permount Fisher Scientific, USA).

RT-PCR *in situ*

Los tejidos previamente fijados sobre portaobjetos silanizados, se incubaron a 65-70°C por 30 min, después se sumergieron en xileno durante 2 horas y etanol absoluto durante 30 min, rehidratándolos en agua libre de RNasas tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) durante 3 min, seguido de 10 min en HCl 0.02N para romper los puentes de hidrógeno del DNA y RNA. Para permeabilizar la membrana se dejaron por 3 min en amortiguador salino de fosfato (PBS) 1X y Tritón X-100 (0.01%), posteriormente se les agregó proteinasa K (PK) 0.5 μ g/ μ l durante 30 min para degradar parcialmente las proteínas, previamente lavado en PBS. Posteriormente se hizo una dilución 1:25 de la solución stock de DNasa libre de RNasa que contiene (352.8 μ l de H₂O DEPC, 16 μ l de Tris 1M pH 7.4, 9.6 μ l de MgCl₂ 250 mM, 1.6 μ l de CaCl₂ 500 mM, 10 μ l de DNasa 10U/ μ l) incubando a temperatura ambiente durante toda la noche para degradar el DNA genómico, quedando el RNA el cual se acetilo para bloquear sitios inespecificos con ácido acético anhídrido 0.25% + trietanolamina durante 10 min, posteriormente se sumergió en ácido acético al 20%.

Para la obtención del cDNA se preparó la mezcla de reacción: 12.9 μ l de H₂O DEPC, 4 μ l de Buffer 5X, 1 μ l de deoxinucleótidos tri-fosfatados : dATP, dGTP, dCTP y dTTP (dNTP's, 0.2 mM); 0.5 μ l de inhibidor de RNasas, 0.5 μ l de oligonucleótido de timina (oligo dT 0.5 μ g/ μ l), 0.6 μ l de ditiotreitól (DTT, 0.1mM), 1 μ l de la enzima transcriptasa reversa, SuperScript™ II Rnase H⁻ (200 U/ μ l) y se incubo durante 2 horas a 37°C.

Para la amplificación del cDNA se utilizo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual se preparó una mezcla de reacción a un volumen final de 50 μ l: 36.5 μ l de H₂O, 5 μ l de Buffer 10X, 1 μ l de cada oligo a una concentración de 100ng/ μ l (sentido y antisentido), 2.5 μ l de dNTPs en el cual uno de los nucleotidos (dUTP) lleva unido la digoxigenina (DIG), 3 μ l de cloruro de magnesio (MgCl₂, 2mM) y 0.5 μ l de la enzima Taq DNA polimerasa (5U/ μ l).

Las condiciones de amplificación (descritas en la tabla 1), variaron de acuerdo a los oligonucleótidos empleados, en donde se utilizo un termociclador Gene Amp *In situ* PCR System 1000 Thermal Cycle (Perkin-Elmer).

Después de la amplificación, se lavaron los tejidos en PBS y se bloquearon con la solución: 100 μ l de Tris pH 7.4, 27 μ l de NaCl 4M, 50 μ g de BSA, 873 μ l de H₂O durante 30 min, después se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una fosfatasa alcalina (Anti-dig-AP, 150 U/ μ l (Boehringer Mannheim USA) durante 2 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con la solución que contiene: 34.5 ml de H₂O, 1.5 ml de NaCl 4M, 4 ml de Tris 1 M pH 7.5, 40 μ l de Tween durante 30 min, seguido de un buffer de detección para cambiar el pH y proporcionar el medio apropiado para que la fosfatasa alcalina reaccione con el sustrato, el buffer contiene: 855 μ l de H₂O, 100 μ l de Tris 1M, pH 9.5, 20 μ l de MgCl₂ 250 mM, 25 μ l de NaCl 4M. El color se desarrolló con la ayuda del Substrate Kit, Liquid BCIP/NBT (Zymed, Lab. USA) mezclando en 1 ml de agua ultrapura una gota del vial 1 y 3 (ver lista de reactivos) homogenizando para posteriormente agregar 1 gota del vial 2 (ver reactivos). Después se agregaron aproximadamente 50 μ l al tejido, incubando y observando constantemente al microscopio hasta visualizar la reacción de color azul-morado, el tiempo para detener la reacción es determinado en base a las condiciones empleadas; deteniéndose la reacción en agua bidestilada. Finalmente se fijaron las muestras en un medio de montaje histológico (Permount Fisher Scientific, USA).

Inmunohistoquímica

Los tejidos se desparafinaron durante 30 min a 65-70°C, se sumergieron en xileno durante 2 horas, posteriormente en etanol absoluto durante 30 min, lavándose con PBS por 2 min. Después se sumergieron en la solución de citratos durante 20 min en baño María, dejándose reposar por 20 min a temperatura ambiente. Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, los tejidos se colocaron en una solución con peróxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂) y metanol absoluto en una relación 1:9. Para eliminar cualquier tipo de señales inespecíficas se incubo el tejido con una solución bloqueadora del Kit Histomouse TM-SP (ver reactivos ZIMED Lab-SA-System) utilizando el reactivo A por 60 min, seguido del reactivo B durante 20 min; posteriormente se incubó con un anticuerpo primario de interés durante 2 horas y se adiciono el reactivo 1C durante 20 min, el cual es un anticuerpo secundario biotinilado, que sirve como un puente entre el anticuerpo primario y el reactivo 2, seguido de la adición de la estreptavidina-peroxidasa que se une a la biotina, la cual previamente se encuentra unida al anticuerpo primario. La presencia de la peroxidasa se revela por la adición de la solución sustrato-cromógeno (reactivos 3A, B, C, ver reactivos), la peroxidasa cataliza al peróxido de hidrógeno (sustrato) y convierte el cromógeno en un depósito de color rojo que demuestra la localización del antígeno, después se

contratiñe con 50 μ l de hematoxilina durante 3min. Finalmente se lava con agua destilada y PBS, para montarse en húmedo con el reactivo 5 (ver reactivos).

TUNEL ("TdT-mediated dUTP nick end labeling")

Los tejidos se incubaron a 65-70°C durante 30 min para ser desparafinados, después se sumergieron en xileno por 2 horas y en etanol absoluto durante 30 min, para permeabilizar la membrana se dejaron por 3 min en PBS 1X Triton X-100 (0.01%). Se incubaron con PK (0.5 μ g/ μ l) durante 30 min para degradar parcialmente las proteínas presentes, después de varios lavados en PBS durante 2 min c/u se incubaron por 20 seg en ácido acético al 20%, después se lavaron en PBS por 2 min. Posteriormente en una cámara húmeda y oscura se agregó la reacción de TUNEL durante 1 hora a 37°C, la cual contiene la enzima deoxinucleotidil transferasa y dUTP unido a fluoresceína, durante este tiempo de incubación la TdT cataliza la adición de dUTP-fluoresceína al OH 3' terminal del DNA (Detection Kit, AP Kit. Roche). A nuestro control positivo se le agregaron 50 μ l de la solución stock de DNasa libre de RNasa (352.8 μ l de H₂O DEPC, 16 μ l de Tris 1M pH 7.4, 9.6 μ l de MgCl₂ 250 mM 1.6 μ l de CaCl₂ 500mM y 10 μ l de DNasa 10 U/ μ l) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min para degradar el DNA genómico. Finalmente se contratiñeron las muestras con ioduro de propidio, durante 20 seg, para después ser observadas en el microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

Antes de iniciar los experimentos en los tejidos de ratón silvestres FVB y transgénicos K14HPV16, se hicieron tinciones con hematoxilina-eosina para realizar el análisis histopatológico (Figura 1) en donde se puede apreciar que el epitelio de cervix-útero del ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E) está conformado de 3 a 4 capas de células, con poco citoplasma y sin diferenciación, en general células clasificadas como normales. Por otro lado en el ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), se observa un epitelio formado de 10 a 13 capas de células, con los estratos bien diferenciados y núcleos normales, mientras que en los ratones transgénicos K14HPV16-E7 sin tratamiento hormonal (E7-E) se observa un epitelio muy delgado formado por 3 capas de células poco diferenciadas y núcleos con atíпия. Finalmente, en los ratones transgénicos K14HPV16-E7 con tratamiento (E7+E), el epitelio se ve con engrosamiento pronunciado, hiperplasia, núcleos grandes e irregulares con poco citoplasma y sin diferenciación, incluso se observa invasividad (Figura 2).

En la Figura 3, se ejemplifican las técnicas de PCR *in situ* y RT-PCR *in situ* para el gen p21 y su transcrito. Utilizando la técnica de PCR *in situ*, se detectó la señal en núcleos, mientras que al emplear el RT-PCR *in situ* la señal fue citoplasmática.

Se trabajó en paralelo con queratinocitos normales y queratinocitos inmortalizados para probar los oligos problema y como apoyo para la estandarización de la técnica de RT-PCR *in situ*. Primero se extrajo RNA total de queratinocitos normales y de queratinocitos inmortalizados con el oncogen viral E7 del HPV16, el cual se cuantifico con la ayuda de un espectrofotometro (Perkin Elmer MBA 2000) a una longitud de onda de 260nm.) La concentración para queratinocitos normales fue de 0.294 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mientras que para los queratinocitos inmortalizados fue de 0.294 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ambas muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1.8%, teñidos con bromuro de etidio y observandose en un transiluminador de luz UV para comprobar la integridad del RNA (Figura 4A). Posteriormente se realizó RT-PCR *in vitro* para el transcrito de β 2-microglobulina, obteniendo un producto de PCR de 100 pb como control de expresión (Figura 4B); mientras que para p53 fue de 500 pb, para p21 de 277 pb, para c-myc de 528 pb y para E7 de 269 pb (Figura 5). La amplificación se verificó mediante geles de agarosa al 2%.

Por otro lado se realizó RT-PCR *in situ* en los tejidos de ratón Wt-E, Wt+E, E7-E y E7+E. Para obtener las condiciones óptimas que se requieren para esta técnica, se realizaron experimentos a diferentes tiempos de exposición a la proteinasa K a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (15 min, 30 min, 1 hr, 2 hrs) observandose que el tiempo óptimo fue de 30 min. Paralelamente, se realizó una cinética a diferentes concentraciones y tiempos de exposición a la DNasa (2 hrs, 6 hrs, 12 hrs, 24 hrs y 48 hrs) a concentraciones de 0.1U, 0.2U y 0.4U. Apartir de estos resultados se obtuvo la concentración y el tiempo ideal en nuestro modelo

de estudio, que fue de 0.2U y 24 hrs, además para la amplificación se trabajó con diferentes números de ciclos (12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26 ciclos) y diferentes temperaturas dependiendo del gen de interés (datos no mostrados). De esta manera se logró la estandarización de la técnica de RT-PCR *in situ*.

Una vez estandarizada la técnica, se realizaron los experimentos para obtener la expresión de los genes de interés, empezando con el gen constitutivo HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa) el cual fue utilizado como control de expresión positivo (Figura 6), la cual se observa en forma similar para todos los tejidos. Por otro lado se realizó el análisis de RT-PCR *in situ* para los genes p21 (Figura 7) y c-myc (Figura 8). En estas imágenes se muestra que hay una mayor intensidad de expresión de p21 y c-myc en el epitelio de los ratones Wt+E y E7+E. En el ensayo de RT-PCR *in situ* para H-ras (Figura 9), no se observa variación considerable en la expresión en los tejidos de los ratones, mientras que para Bcl-2 (Figura 10) la expresión en el ratón Wt-E es de menor intensidad en el epitelio y la señal es basal, comparado con Wt+E, E7-E y E7+E en donde se observa una mayor intensidad de expresión en el tejido analizado.

Por otro lado se realizó la técnica de Inmunohistoquímica para PCNA (Figura 11) para determinar las células que se encuentran en proliferación en los epitelios de los ratones, observándose que la proliferación en los ratones Wt-E y Wt+E está localizada en la capa basal (de 2 a 3 capas) de acuerdo a la señal detectada en los núcleos que se observan de color café rojizo; mientras que en los ratones E7-E y E7+E la proliferación está localizada en todo el epitelio.

Para detectar las células que se encuentran en apoptosis se realizó la técnica de TUNEL (Figura 12), las células apoptóticas están expresadas por la señal que se detecta en los núcleos de color verde fluorescente, sin embargo para los ratones Wt-E, Wt+E y E7-E, se observó muerte celular en todo el epitelio, mientras que para el ratón E7+E, la muerte celular es menor, únicamente expresada en los estratos superiores, además los núcleos de las células no-apoptóticas que fueron contrateñidas con yoduro de propidio se observan de color rojo. Cada experimento se realizó por triplicado.

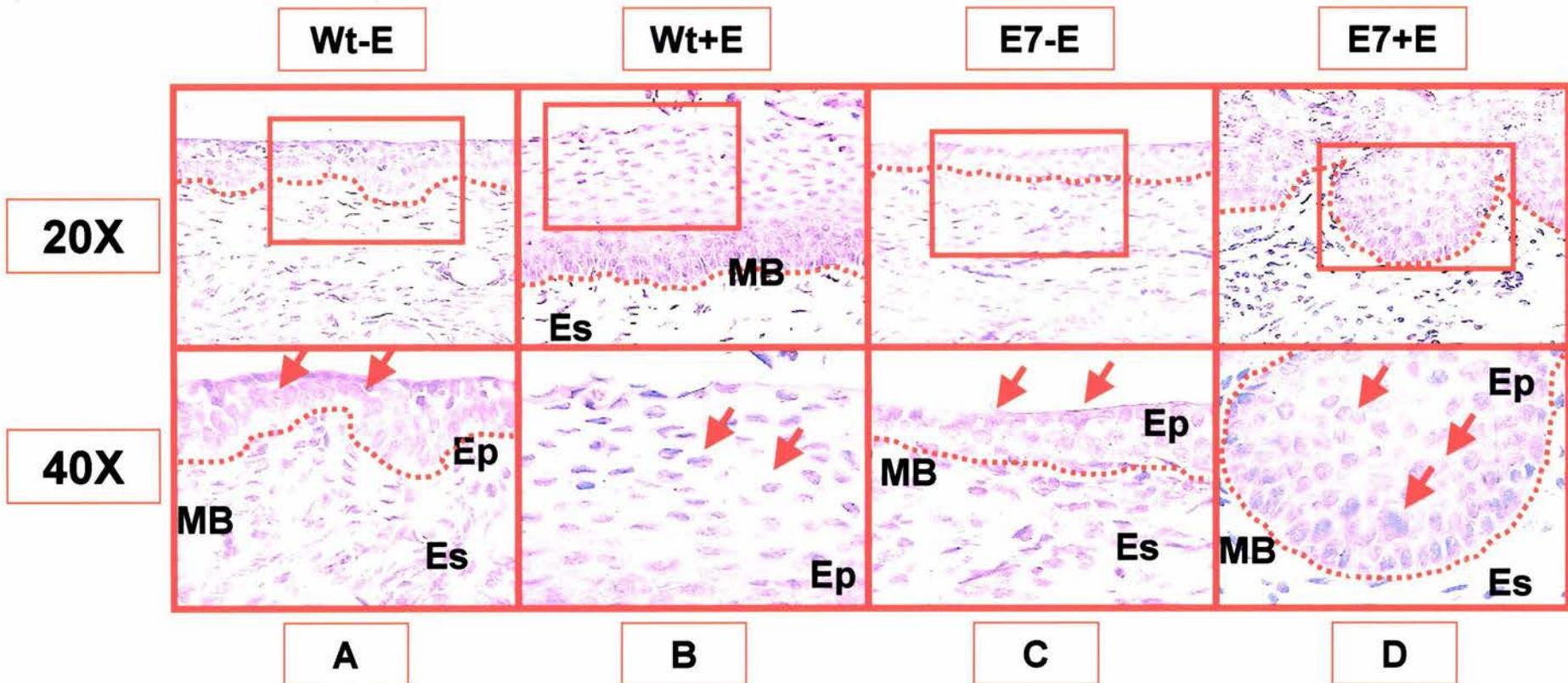


Figura 1. Tinción de hematoxilina-eosina. A) Ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), B) Ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), C) Ratón transgénico K14HPV16 sin tratamiento (E7-E), D) Ratón transgénico K14HPV16 con tratamiento (E7+E). Las líneas punteadas delimitan al epitelio del estroma, los recuadros indican el área que se observa en 40X y las flechas indican la localización de la señal nuclear. Membrana basal (MB), epitelio (Ep), estroma (Es). Amplificación 20X y 40X.

E7+E

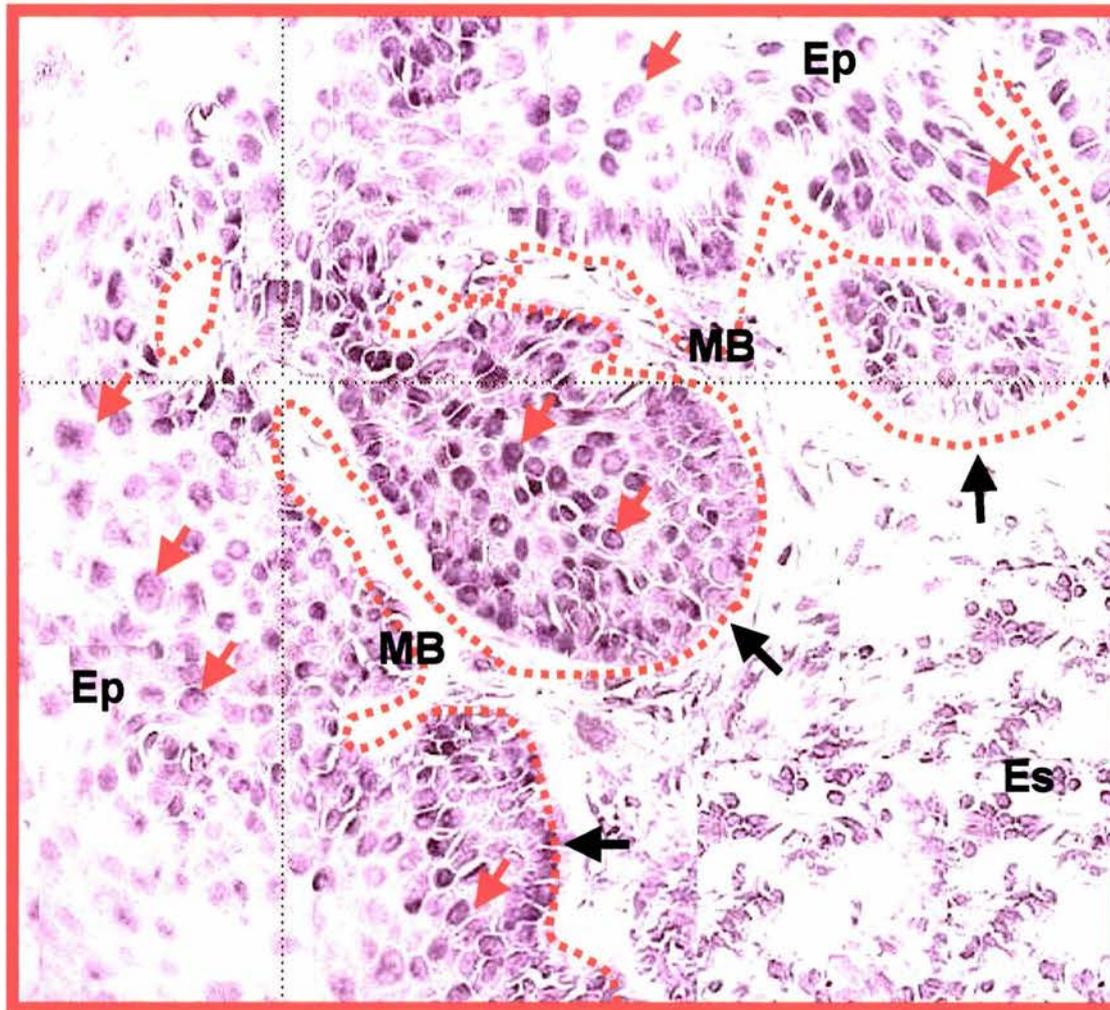


Figura 2. RT-PCR *in situ* de cervix para detectar la expresión del oncogén E7 en el ratón transgénico K14HPV16 (E7+E). La señal detectada es citoplasmática indicada por las flechas rojas. También se puede observar el carcinoma *in situ*, con un epitelio muy irregular sin la formación de estratos, con núcleos grandes y pequeños indicados por el contorno citoplasmático señalado por las flechas rojas. Las líneas punteadas delimitan al epitelio (Ep) del estroma (Es), las flechas negras indican la invasividad del tumor. Amplificación 40X.

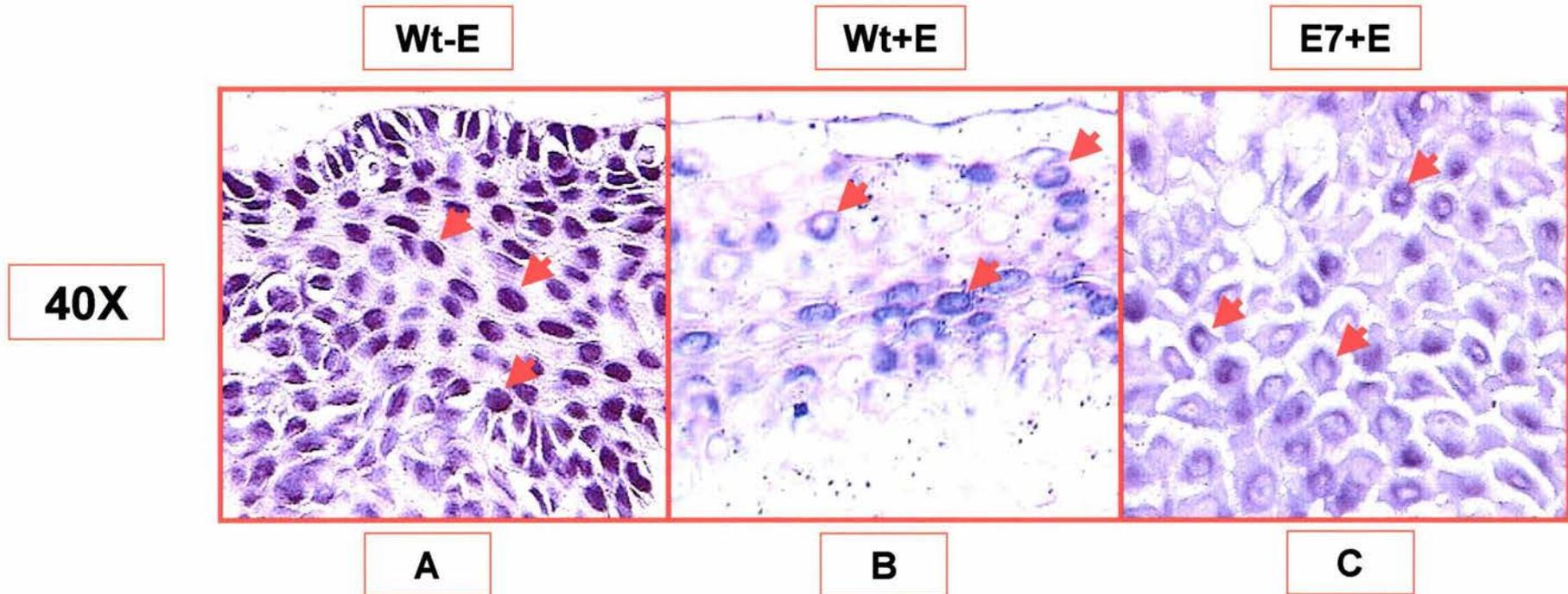


Figura 3. Comparación de las diferentes técnicas. A) Técnica de PCR *in situ* para el gen p21 de un ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), la señal detectada es nuclear mostrada por las flechas rojas. B) RT-PCR *in situ* para el del gen p21 de un ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), la señal se detecto en el citoplasma y esta indicada por las flechas. C) RT-PCR *in situ* para el gen p21 de un ratón K14HPV16 con tratamiento (E7+E), la señal es citoplasmática indicada con las flechas. Amplificación 40X.

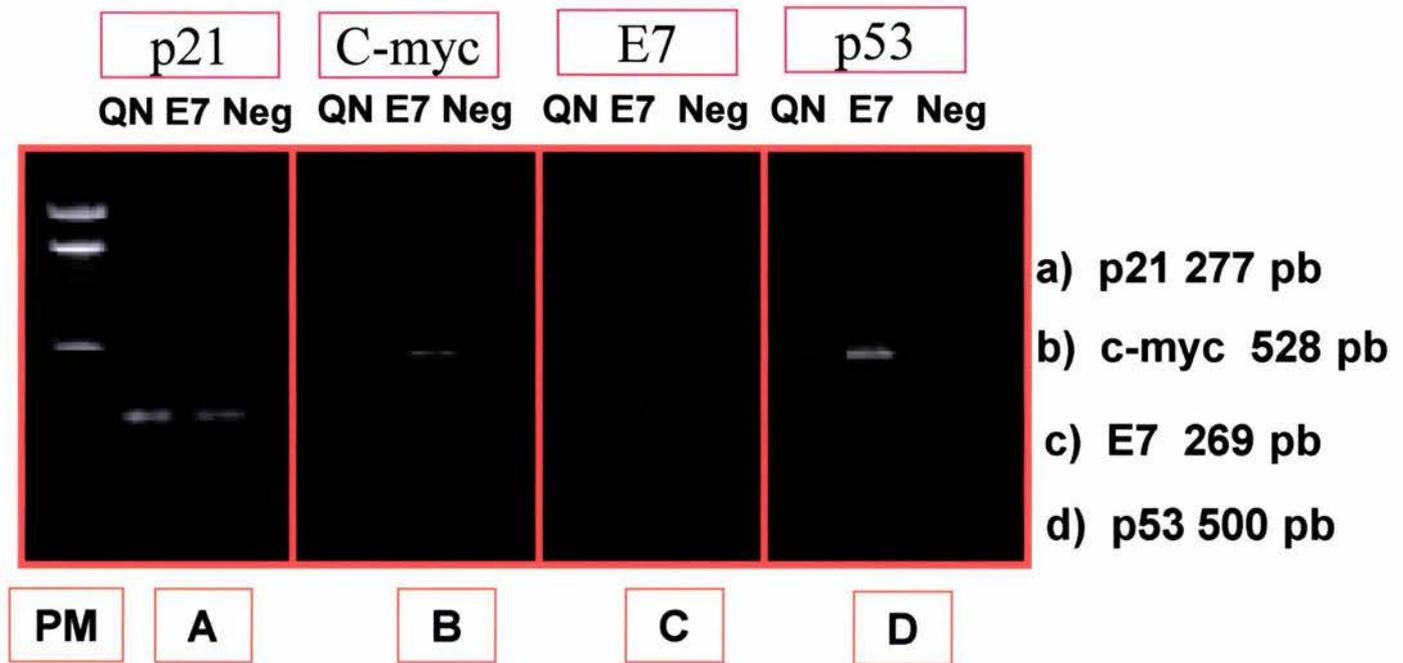


Figura 5. Gel de agarosa representando el RT-PCR *in vitro* para los genes: A) p21 (277 pb), B) c-myc (528 pb), C) E7 (269 pb) y D) p53 (500 pb) en queratinocitos normales (QN) y queratinocitos transformados con el oncogén E7 (E7), el negativo (Neg) es utilizado como control de la reacción al cual no se le adiciona cDNA. Marcador de peso de 100 pb (PM)

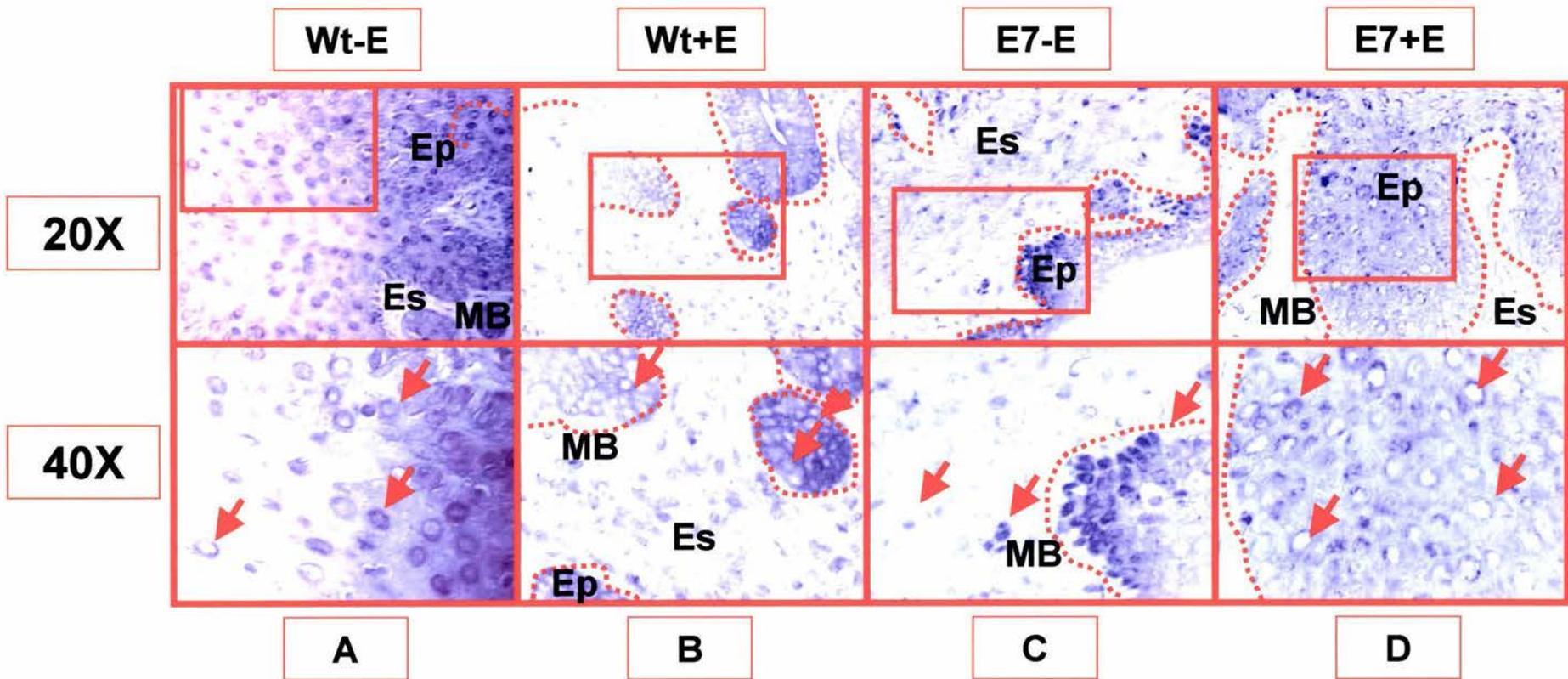


Figura 6. RT-PCR *in situ* para detectar la expresión del gen HPRT en tejido de cérvix-útero. La señal citoplasmática es indicada por las flechas; panel A) Ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), B) Ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), C) Ratón transgénico K14HPV16 sin tratamiento (E7-E), D) Ratón transgénico K14HPV16 con tratamiento (E7+E). Las líneas punteadas delimitan al epitelio del estroma, los recuadros indican el área que se observa en 40X y las flechas indican la localización de la señal nuclear. Membrana basal (MB), epitelio (Ep), estroma (Es). Amplificación 20X y 40X.

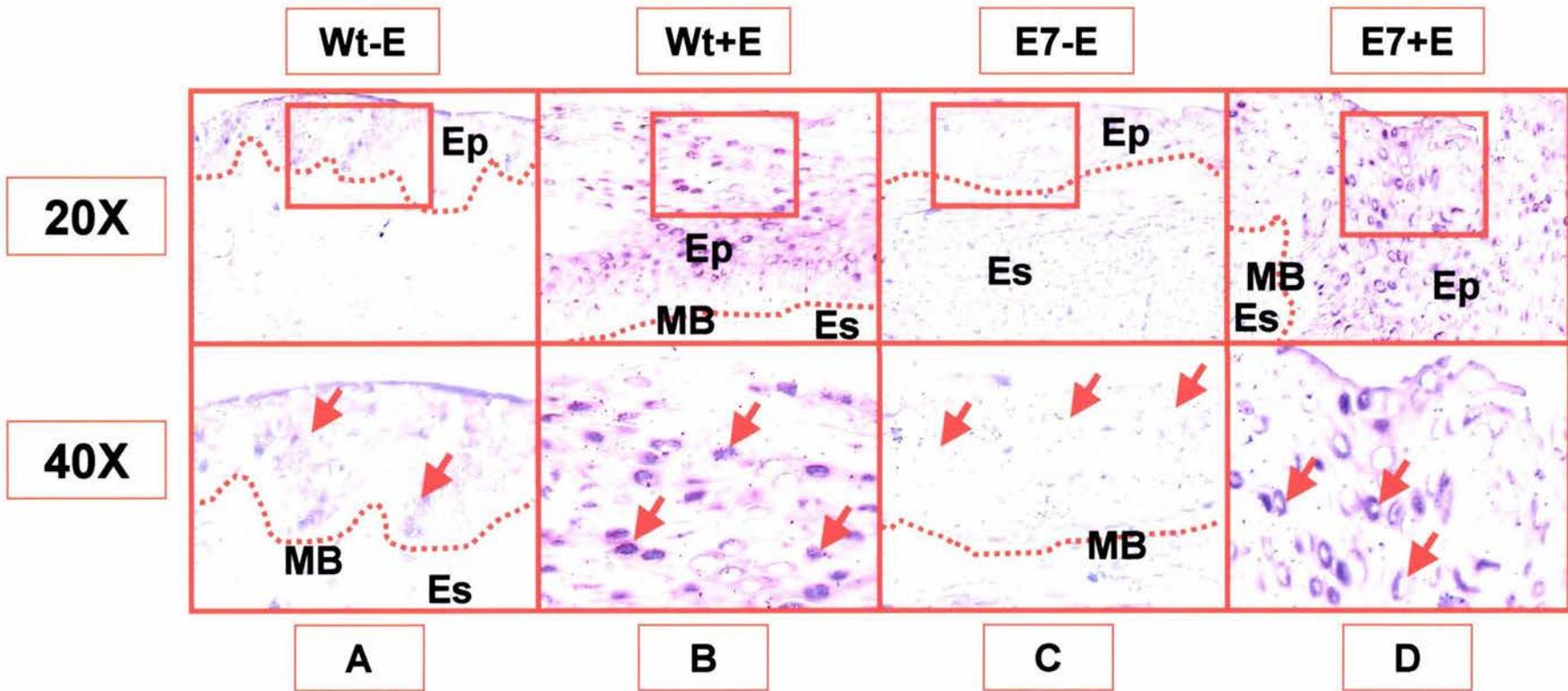


Figura 7. RT-PCR *in situ* de para detectar la expresión del gen p21 en tejido de cérvix-útero. La señal citoplasmática es indicada por las flechas; Panel A) Ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), B) Ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), C) Ratón transgénico K14HPV16 sin tratamiento (E7-E), D) Ratón transgénico K14HPV16 con tratamiento (E7+E) . Las líneas punteadas delimitan al epitelio del estroma, los recuadros indican el área que se observa en 40X y las flechas indican la localización de la señal nuclear. Membrana basal (MB), epitelio (Ep), estroma (Es). Amplificación 20X y 40X.

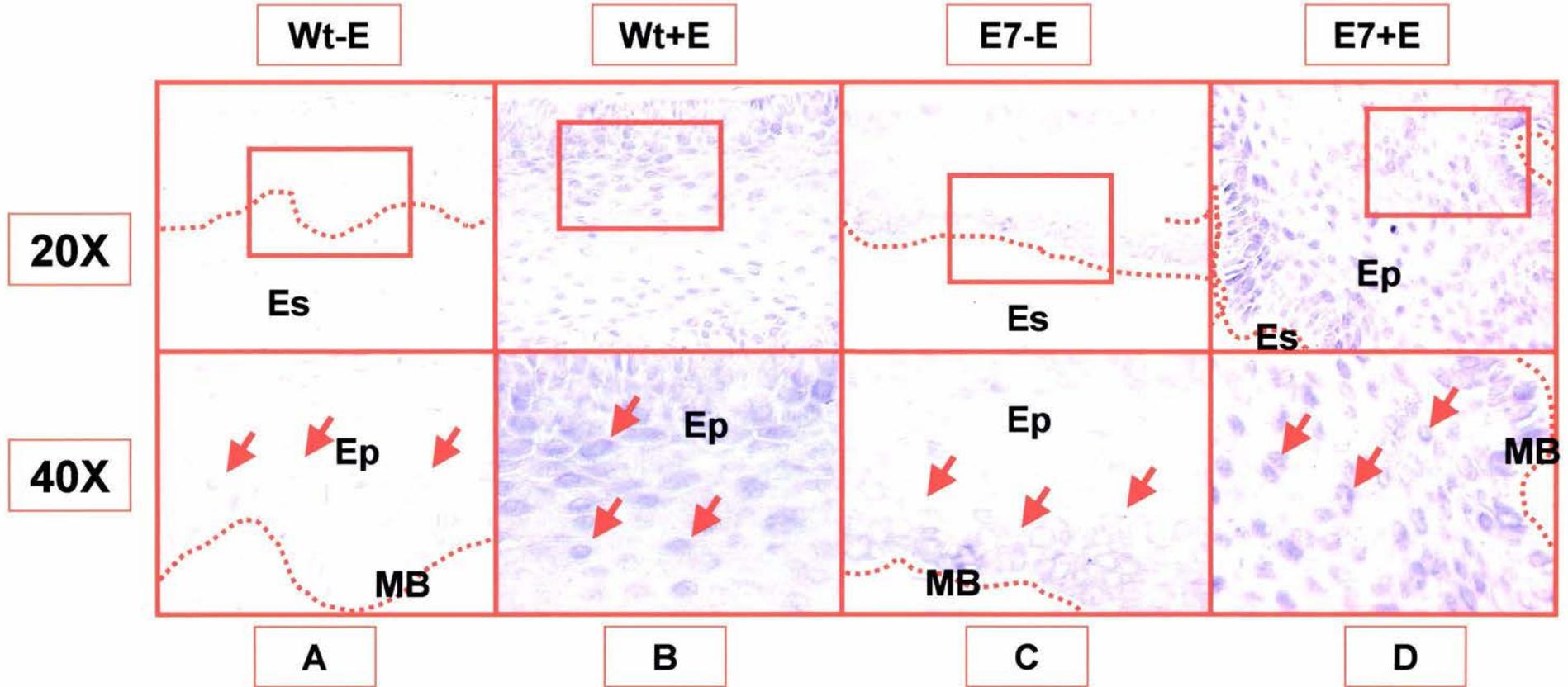


Figura 8. RT-PCR *in situ* para detectar la expresión del gen c-myc en tejido de cérvix-útero. La señal citoplasmática es indicada por las flechas; Panel A) Ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), B) Ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), C) Ratón transgénico K14HPV16 sin tratamiento (E7-E), D) Ratón transgénico K14HPV16 con tratamiento (E7+E) . Las líneas punteadas delimitan al epitelio del estroma, los recuadros indican el área que se observa en 40X y las flechas indican la localización de la señal nuclear. Membrana basal (MB), epitelio (Ep), estroma (Es). Amplificación 20X y 40X.

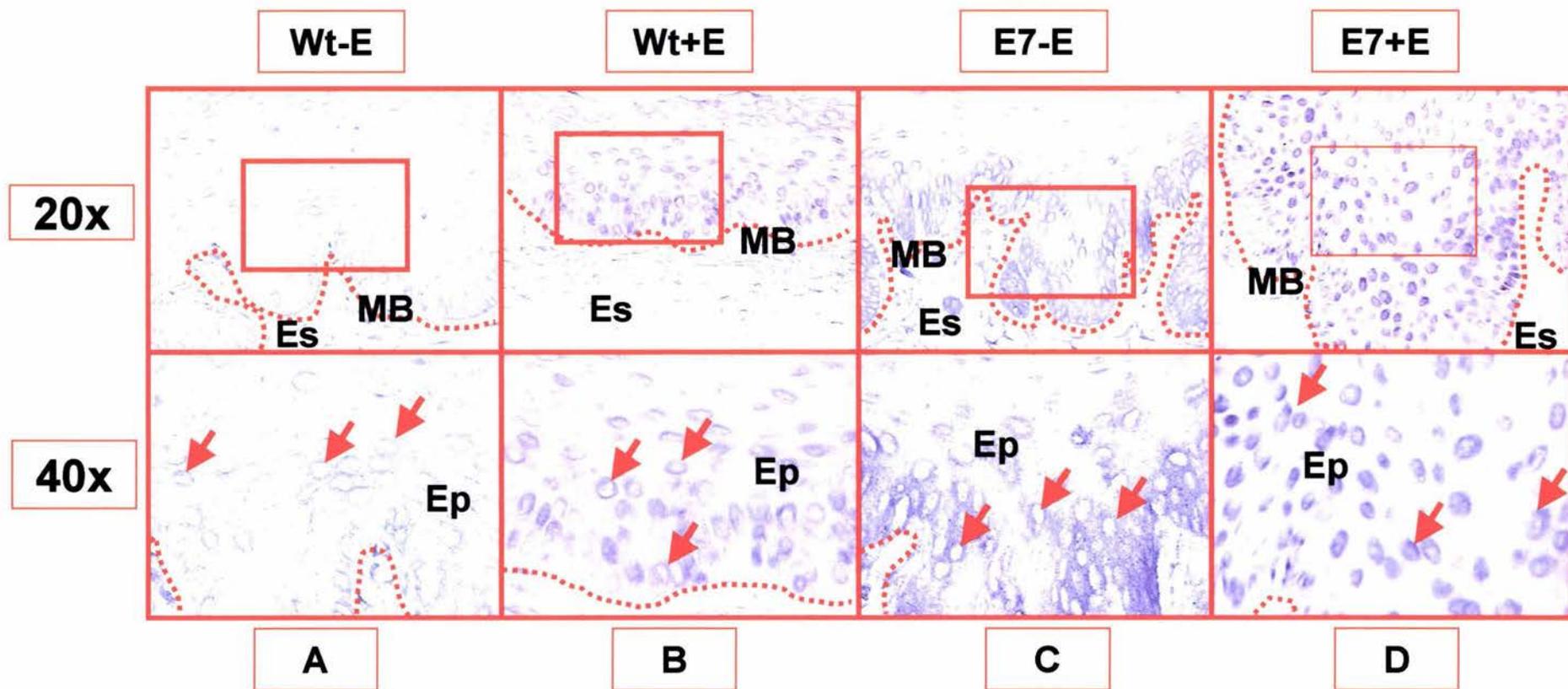


Figura 9. RT-PCR *in situ* para detectar la expresión del gen H-ras en tejido de cervix-útero. La señal citoplasmática es indicada por las flechas; Panel A) Ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), B) Ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), C) Ratón transgénico K14HPV16 sin tratamiento (E7-E), D) Ratón transgénico K14HPV16 con tratamiento (E7+E) . Las líneas punteadas delimitan al epitelio del estroma, los recuadros indican el área que se observa en 40X y las flechas indican la localización de la señal nuclear. Membrana basal (MB), epitelio (Ep), estroma (Es). Amplificación 20X y 40X.

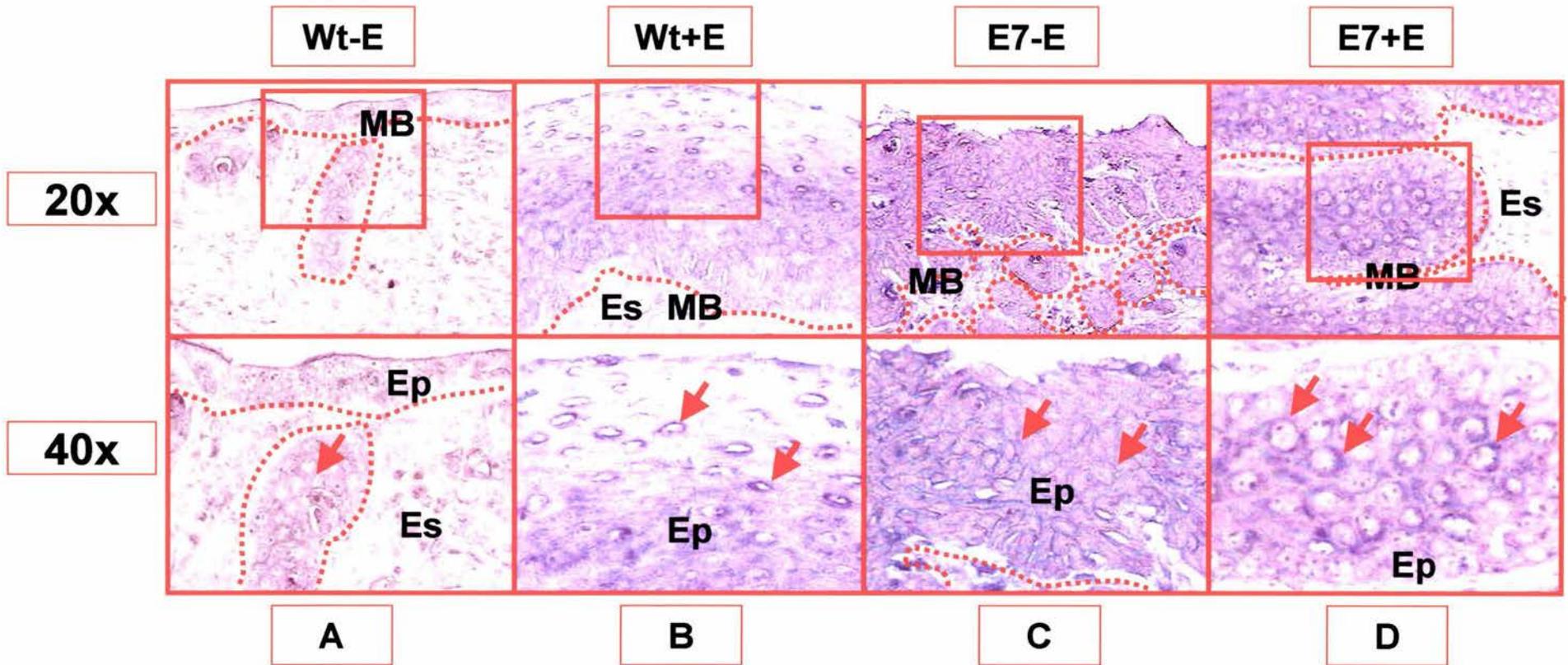


Figura 10. RT-PCR *in situ* para detectar la expresión del gen Bcl-2 en tejido de cervix-útero. La señal citoplasmática es indicada por las flechas; Panel A) Ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), B) Ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), C) Ratón transgénico K14HPV16 sin tratamiento (E7-E), D) Ratón transgénico K14HPV16 con tratamiento (E7+E). Las líneas punteadas delimitan al epitelio del estroma, los recuadros indican el área que se observa en 40X y las flechas indican la localización de la señal nuclear. Membrana basal (MB), epitelio (Ep), estroma (Es). Amplificación 20X y 40X.

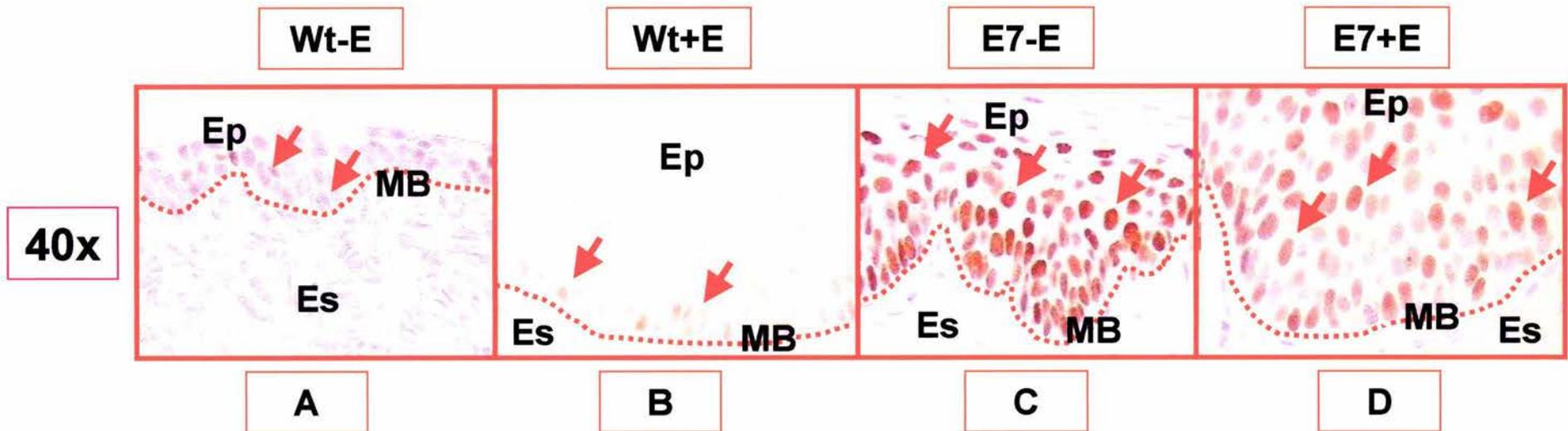


Figura 11. Inmunohistoquímica. PCNA para detectar células en proliferación en tejido de cervix-útero. La señal citoplasmática es indicada por las flechas; Panel A) Ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), B) Ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), C) Ratón transgénico K14HPV16 sin tratamiento (E7-E), D) Ratón transgénico K14HPV16 con tratamiento (E7+E). Las líneas punteadas delimitan al epitelio del estroma, los recuadros indican el área que se observa en 40X y las flechas indican la localización de la señal nuclear. Membrana basal (MB), epitelio (Ep), estroma (Es). Amplificación 20X y 40X.

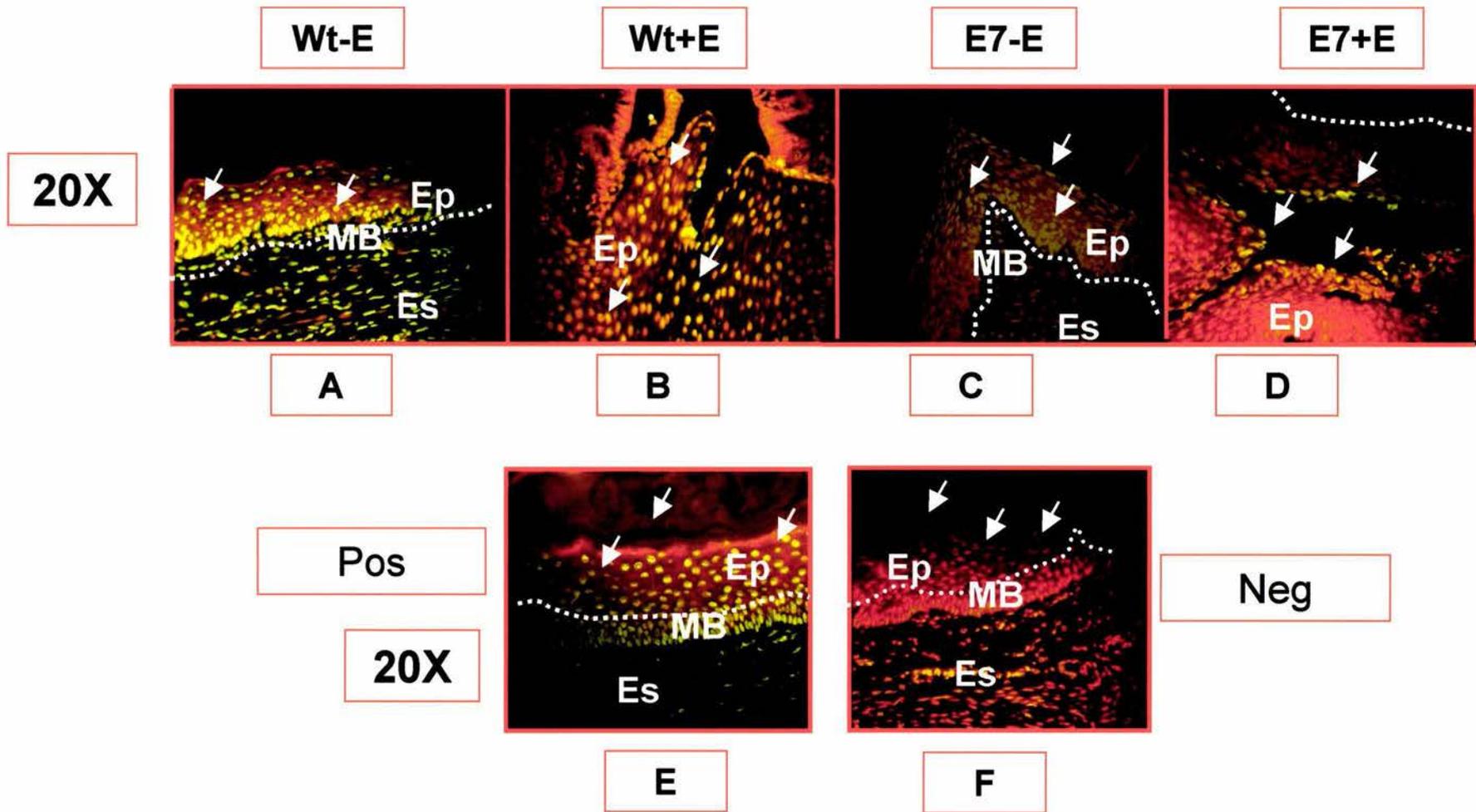


Figura 12. Ensayo de TUNEL para la detección de células apoptóticas en tejido de cervix-útero, la señal es detectada en el núcleo indicada por las flechas; los núcleos verdes representan células en apoptosis, los núcleos café-rojizos representan células no apoptóticas. La señal citoplasmática es indicada por las flechas; Panel A) Ratón silvestre FVB sin tratamiento (Wt-E), B) Ratón silvestre FVB con tratamiento (Wt+E), C) Ratón transgénico K14HPV16 sin tratamiento (E7-E), D) Ratón transgénico K14HPV16 con tratamiento (E7+E), E) Control positivo (Pos) tratado con DNasa y F) control negativo (Neg) sin DNasa ni enzima TdT. Amplificación 20X. Las líneas punteadas delimitan al epitelio del estroma y las flechas indican la localización de la señal nuclear. Membrana basal (MB), epitelio (Ep), estroma (Es). Amplificación 20X y 40X.

DISCUSION

El uso de los modelos de estudio como son los ratones silvestres FVB y transgénicos K14HPV16-E7 ha sido útil para estudiar el papel del estradiol en la inducción de la proliferación celular y de esta manera poder detectar la expresión de los genes que participan en la proliferación y apoptosis en el epitelio del cérvix-útero. Como se puede observar en algunos de los ratones Wt-E, existe un epitelio muy delgado con células únicamente basales (de 3 a 4 capas de células), mientras que en otros ratones Wt-E el epitelio es un poco más amplio (de 4 a 7 capas de células), además, los estratos (basal, espinoso, granular y cornificado) no se encuentran bien diferenciados quizá, debido a la etapa estral en la que se encuentre el ratón, sin embargo las células son normales con núcleos de tamaño regular y poco citoplasma debido a que las células basales están en constante proliferación (Figura 11) además se observan niveles importantes de muerte celular en todo el epitelio (Figura 12). Esto nos indica que existe un equilibrio entre la proliferación y la apoptosis en los ratones silvestres. Además, en comparación con el ratón Wt+E en donde se puede observar un epitelio más amplio con los estratos bien definidos, núcleos regulares, la proliferación se restringe a las capas basales (Figura 11) y la muerte celular se aprecia en todo el epitelio (Figura 12). El cambio en el grosor del epitelio puede ser debido a la actividad biológica del 17β -estradiol (E2), el cual juega un papel muy importante durante el desarrollo, crecimiento y función del tracto reproductivo tanto masculino como el femenino, además, son importantes dentro de la fisiología vascular y la neuroquímica. En los ratones E7-E ocurre algo muy similar al Wt-E, un epitelio delgado en algunos ratones, pero en otros es más amplio el número de células basales, sin la formación de estratos, pero generalmente en ambos ratones se observa displasia e hiperplasia media, y tanto la proliferación (Figura 11) como la apoptosis (Figura 12) se observan en todo el epitelio. Únicamente los ratones transgénicos E7+E desarrollaron carcinoma *in situ* (Figura 3) con células no diferenciadas, sin estratos diferenciados, por lo que existen elevados niveles de proliferación, observándose en todas las capas con bajos niveles de apoptosis lo que establece una condición preneoplásica. Además, se ha reportado que la exposición crónica a estrogénos de ratones que expresan los oncogenes del HPV desarrollan cáncer *in situ* (Arbeit *et al.*, 1999). Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura.

Por otro lado, las actividades biológicas de los estrógenos han sido bien estudiadas y caracterizadas por los receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$) (Lubahn *et al.*, 1993; Schomberg *et al.*, 1999). El receptor a estrógeno α actúa como factor de transcripción el cual es activado por su ligando, el mecanismo clásico de la acción de $ER\alpha$ está asociado con la formación de un homodímero nuclear que es inducido por el estrógeno y que se une a elementos de respuesta a estrógeno (ERE) en la región regulatoria 5' del promotor en sus genes blanco. Sin embargo se ha visto que $ER\alpha$ también interactúa con la proteína Sp1 para transactivar genes a través de la unión Sp1(N)x ERE. $ER\alpha$ se une al dominio de unión del DNA en el carboxilo terminal de la proteína Sp1 (Safe, 1999; 2001).

Estudios recientes han demostrado que el estrógeno y los oncogenes del virus del papiloma humano (HPV) cooperan entre sí, además, se ha demostrado que el epitelio escamoso cervical contiene receptores a estrógeno (Gao *et al.*, 1983) por lo que responden a la administración crónica de estrógeno con una persistente proliferación (Quarmby, 1984). Esto sugiere que el estrógeno y los oncogenes del HPV actúan de una manera sincronizada para inducir una proliferación neoplásica en el epitelio escamoso del cérvix, preparándola para una segunda etapa que guíe hacia la carcinogénesis (Cohen, 1991).

EXPRESION DE p21

Como se observa en la Figura 7, el 17 β -estradiol induce un aumento en la expresión de p21, acompañado de una hiperproliferación en la epidermis tanto en los ratones Wt+E como en los ratones E7+E. Por otro lado, también se ha descrito que hay un aumento en las proteínas p21, ciclina D1, CDK2, CDK4 y CDK6 en los ratones transgénicos E6/E7 que están regulados por el promotor de la involucrina en la cepa B6SJL derivada de la cruce C57BLXCJL (Crish *et al.*, 2000). Además la formación de los complejos de la CDK4 con las ciclinas puede ser promovido por p21 (LaBaer, 1997) por lo que p21 puede actuar no únicamente como inhibidor del ciclo celular, si no como un regulador positivo del ciclo celular (Ming-Derg, 2002).

Interesantemente se ha encontrado que p21 es regulado por E7 a nivel transcripcional y postranscripcional cuando se induce un daño al DNA (Jones *et al.*, 1999; Jian *et al.*, 1998). En comparación a esta situación, existe una mínima inducción transcripcional de mRNA de p21 en respuesta únicamente a la expresión de E7, además de la estabilización de la proteína (Jones *et al.*, 1999). La capacidad de E7 para incrementar los niveles de p21 en forma independiente de p53, está apoyada por la observación de que los niveles de p21 se incrementan en respuesta a la expresión de E7, incluso cuando la actividad de p53 está inhibida por la expresión de la oncoproteína E6 (Jones *et al.*, 1999). Además, en colaboración con Heilderberg hemos observado que los niveles de la proteína de p53 y p21 se incrementan en queratinocitos que expresan el oncogén E7 por mecanismos no transcripcionales (Aguilar *et al.*, 2002; Jian *et al.*, 1998). De esta manera la expresión de la oncoproteína imita pero no evoca una respuesta de p53 cuando hay daño al DNA (Jones *et al.*, 1999).

Se ha visto que el promotor de p21 contiene seis sitios de unión a Sp1, por lo que se podría proponer que la interacción entre ER y Sp1 podría estar involucrada en la inducción de p21 por el 17 β -estradiol. En este trabajo, los resultados obtenidos muestran que tanto los ratones Wt+E como los ratones E7+E, tienen una mayor intensidad de expresión del transcrito de p21, lo cual está acorde con la literatura reportada; sin embargo el mecanismo preciso por el cual sucede esto no está aún caracterizado, por lo que se proponen algunas vías, entre las cuales se involucra E7, Sp1 y el 17 β -estradiol (Gartel *et al.*, 1999).

EXPRESION DE c-myc

Como se observa en la Figura 8, el 17 β -estradiol aumenta el nivel de expresión de c-myc en el cérvix de ratones Wt+E y E7+E (en el 75% y 80% de tejido analizado respectivamente) en comparación con los ratones Wt-E y E7-E con una baja intensidad de expresión. Tal efecto se ha observado en células de cáncer de mama y útero de rata (Tsai *et al.*, 1997; Huet-Hudson *et al.*, 1989). Por otro lado, se ha encontrado que la región central de c-Myc interactúa con el dominio de dedos zinc de Sp1 (Gartel, 2001), por lo que podría sugerirse que existe una interacción entre c-myc, Sp1, E7 y 17 β -estradiol incrementando de esta manera la expresión de c-myc. Nuestros resultados pueden sugerir que existe una cooperación entre oncogenes, tales como E7 y c-myc favoreciendo el desarrollo de tumor en los ratones E7+E. Además se ha reportado en la literatura que el 17 β -estradiol sinergiza con E7.

EXPRESION DE H-ras

Como se ha observado, el 17 β -estradiol mantiene los niveles de expresión de H-ras muy similares en el cérvix de ratones Wt-E, Wt+E, E7-E y E7+E en la mayor parte del tejido analizado (Figura 9). Por otro lado se ha demostrado que la región 5' del gen de H-ras murino es muy similar a la del ratón y el humano (Damante *et al.*, 1987) por lo que las regiones promotoras de H-ras del ratón, rata y humano son sitios muy ricos en residuos de guanina y citosina (G-C) y además contienen secuencias consenso que son importantes para la unión al factor de transcripción de Sp1. Como se ha visto, la transcripción del gen H-ras está muy bien regulada en tejido normal, y que cuando esta regulación se ha perdido, puede resultar en una sobre-expresión la cual se observa en tejido tumoral. Por otro lado, se ha reportado una secuencia regulatoria en el intrón 1 de H-ras, la cual contiene elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), por lo que se puede sugerir que existe una interacción entre H-ras y el receptor de estrógeno y que hay un efecto estimulador del estrógeno sobre la transcripción del gen H-ras, así la alteración en la regulación transcripcional del estrógeno sobre H-ras, juega un papel muy importante durante la progresión del cáncer (Pethe *et al.*, 1999). Sin embargo en nuestro modelo de estudio, los resultados en el transcrito de H-ras no se observan aumentados en respuesta a 17 β -estradiol ni al oncogén E7 del HPV, lo que sugiere que H-ras está expresado de manera normal en tejido cervical y que no participa directamente en la carcinogénesis, al menos en esta etapa. Se necesitan estudios adicionales para descartar la posibilidad de que H-ras esté mutado.

EXPRESION DE Bcl-2

Como se observa en la expresión de Bcl-2 (Figura 10), únicamente el ratón Wt-E presenta la expresión a nivel basal, mientras que en los ratones Wt+E, E7-E y E7+E se detecta un incremento en la expresión en todo el epitelio. Por otro lado, reportes previos indican que el 17 β -estradiol aumenta la expresión del

mRNA y de la proteína de Bcl-2 en células de ovario (Choi *et al.*, 2001). Además se ha relacionado el estrógeno con la carcinogénesis de mama, aumentando la expresión de Bcl-2 (Xie *et al.*, 2000). Estudios recientes han demostrado que el promotor de Bcl-2 contiene sitios de unión a Sp1 (Dong *et al.*, 1999). En nuestros resultados con los ratones Wt+E, podríamos sugerir que Sp1 está involucrado en esta expresión. Sin embargo en el ratón E7-E se presenta un incremento que puede ser atribuido a otro mecanismo. Con base a lo anterior, en este modelo se puede proponer que existen eventos importantes que participan durante el desarrollo de la carcinogénesis, E7 más la acción hormonal, puede inhibir la expresión de Rb, que a su vez aumentan los niveles Bcl-2, facilitando la proliferación celular y disminuyendo la apoptosis.

DETECCION DE PROLIFERACION (PCNA)

Se detectó el PCNA en muestras de cervix mediante inmunohistoquímica (Figura 11). Se observó que en los ratones Wt-E y Wt+E se expresa a nivel de capa basal, detectándose por coloración rojiza en los núcleos de las células lo cual es una característica de un epitelio normal en comparación con los ratones E7-E y E7+E, en donde se puede observar que el PCNA es detectado en el epitelio, lo cual podría ser el resultado de una desregulación en el ciclo celular.

DETECCION DE APOPTOSIS (TUNEL)

La técnica de TUNEL permite detectar la células apoptóticas por medio del uso de la enzima TdT, la cual cataliza la unión de fluoresceína- dUTP a los extremos 3'OH libres del DNA que es fragmentado, esto nos permitió observar que los núcleos de las células apoptóticas son de color verde fluorescente, mientras que los núcleos de las células normales que fueron contrateñidos con yoduro de propidio son de color café-rojizo (Figura 12). Estos resultados indican que en los ratones Wt-E, Wt+E y E7-E, la apoptosis es mayor, en comparación con los ratones E7+E en donde la apoptosis es mucho menor y solo se observa en la parte superior del epitelio. Esto sugiere que efectivamente, a los ratones E7+E cuando se les administra 17 β -estradiol en forma crónica, se inhibe la apoptosis y de esta manera se favorece el desarrollo de la carcinogénesis.

Como hemos observado en los resultados, la utilidad de la técnica de RT-PCR *in situ* radica en que se pueden amplificar genes de interés y sus transcritos, además, se puede aplicar en cualquier tipo de tejido que se pretenda estudiar. Es una técnica moderna que hasta hoy en día, pocos grupos de investigación la utilizan como una herramienta determinante en la expresión genética debido a su complejidad. En México, nuestro grupo ha logrado estandarizar esta técnica, en diferentes tejidos (humano, ratón, cabra) resultados que han sido evaluados por expertos a nivel mundial.

CONCLUSIONES

- * El oncogen E7 del HPV16 y la administración crónica de hormonas sexuales como es el 17β -estradiol incrementan el riesgo de desarrollo de cáncer cervical en nuestro modelo de estudio.
- * El 17β -estradiol causa una hiperproliferación celular en epitelio de cérvix en los ratones Wt+E y E7+E.
- * El 17β -estradiol induce la expresión de p21 y de c-myc en tejido cervical de los ratones Wt+E y E7+E.
- * El 17β -estradiol no tiene efecto sobre la expresión de H-ras en este modelo de estudio.
- * El 17β -estradiol induce la expresión de Bcl-2 en ratones Wt+E, E7-E y E7+E, sin embargo E7 causa el mismo efecto por mecanismos diferentes.
- * Existe una proliferación celular que se restringe únicamente en la capa basal de los ratones Wt-E y Wt+E, en cambio en los ratones E7-E y E7+E se observa una proliferación de manera incrementada a través de todo el epitelio cervical, posiblemente debido a la formación de complejos entre E7 con Rb.
- * En cuanto a los niveles de apoptosis, se observa que es mayor en los ratones Wt-E, Wt+E y E7-E, comparados con los que presentan los ratones E7+E, debido a un posible sinergismo que se da entre el oncogen E7 del HPV16 y el 17β -estradiol.

PERSPECTIVAS

Los modelos animales son una buena herramienta para la búsqueda de nuevos marcadores biológicos, los cuales nos permitan detectar y pronosticar a tiempo si existen indicios de desarrollo de enfermedades tales como el cáncer. De tal manera que los ratones transgénicos K14HPV16 son un modelo ideal para estudiar el desarrollo de la carcinogénesis y la expresión de genes relacionados con proliferación celular y apoptosis. Sería de gran importancia aplicar esta misma técnica (RT-PCR *in situ*) para conocer la expresión de genes que están involucrados en la respuesta inmune del modelo en estudio.

Dentro de las metas que se pretenden alcanzar en trabajos complementarios son, entre otras, analizar la expresión de genes en ratones transgénicos para el oncogén E6. Los resultados obtenidos en este trabajo, se pretenden llevar a foros nacionales e internacionales, además de publicarlos en revistas científicas internacionales.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Lemarroy A, Gariglio P, Whitaker NJ, Eichhorst ST, zur Hausen H, Krammer PH, Rosl F. (2002). Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene*. Jan 10;21(2):165-75.

Amati B, Land H. (1994). Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev*. Feb;4(1):102-8. Review.

Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. (1994). HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet*. Feb;6(2):157-62.

Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. (1993). Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E6/E7 ORFs. *Am J Pathol*. Apr;142(4):1187-97.

Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. (1994). Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol*. Jul;68(7):4358-68.

Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. (1996). Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 2;93(7):2930-5.

Auborn KJ, Woodworth C, DiPaolo JA, Bradlow HL. (1991). The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer*. Dec 2;49(6):867-9.

Barr PJ, Tomei LD. (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)*. May;12(5):487-93. Review.

Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A. (1994). Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer*. Mar 1;56(5):640-5.

Berumen J, Miranda EI, Zafra G, Casas L, Segura E, Ordonez RM, Aguirre J, Martinez M, Rosas A, Ibarra V, Pedraza L, Saad A, Marroquin A, Gutierrez M, Martinez A, Gariglio P. (1997). [Molecular epidemiology of high-incidence cancers in Mexico] *Gac Med Mex*;133 Suppl 1:35-41.

Berumen J., Miranda EI., Zafra G., Casas L., Segura E., Ordonez R.M., Aguirre J., Martinez M., Rosas A., Ibarra V., Pedraza L., Saad A., Marroquin A., Gutierrez M., Martinez A, Gariglio P. (1997). Molecular epidemiology of high-incidence cancers in Mexico. *Gac Med Mex* ;133 Suppl 1:35-41.

Berumen J., Ordoñez R.M., Lazcano E., Salmeron J., Galván S.C., Estrada R.A., Yunes E., García-Carranca A., González-Lira G., Madrigal de la Campa A. (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 93; 1325-1330.

Bos J.L.(1989). Ras oncogenes in human cancer: review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689.

Bos J.L. (1997). Ras-like GTPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1333: M19-31.

Bosch A., McCray P.B.Jr., Chang S.M., Ulich T.R., Simonet W.S., Jolly D.J., Davidson B. L. (1996). Proliferation induced by keratinocyte growth factor enhances *in vivo* retroviral-mediated gene transfer to mouse hepatocytes. *J. Clin. Invest.* Dec 15;98(12):2683-2687.

Boulakia C.A., Chen G.N.F.W., Teodoro J.G., Branton P.E., Nicholson D.W., Poirier G.G. and Shore G.C. (1996). Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDA protein prevent E1A -induced processing of CPP32 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. *Oncogene.* 12:529-535.

Boutwell R.K. (1989). Model systems for defining initiation, promotion, and progression of skin neoplasms. *Prog Clin Biol Res.*298:3-15.

Brisson J., Morin C., Roy M., Bouchard C., Leclerc J., Christen A., Guimont C., Penault F. and Meisels A. (1994). Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions. *Am. J. Epidemiol.* 140,700-710.

Brychtova S, Brychta T, Kotrsova L, Pilka R, Tichy M, Ticha V, Kolar Z. Expression of Bcl-2 in dysplastic and neoplastic cervical lesions in relation to cell proliferation and HPV infection. *Neoplasma.* 2000;47(3):143-7.

Camus S, Higgins M, Lane DP, Lain S. (2003). Differences in the ubiquitination of p53 by Mdm2 and the HPV protein E6. *FEBS Lett.* Feb 11;536(1-3):220-4.

Celis J.E. and Madsen P. (1986). Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Letters.* 9:277-283.

Chen-Levy Z., Nourse J. and Cleary M.L. (1989). The bcl-2 candidate protooncogene product is a 24-Kilodalton Integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) traslocation. *Moll. Cell. Biol.* 9:701-710.

Chinnaiyan A.M., Orth K., O'Rourke K., Duan H. and Dixit V.M. (1996). Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-XL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J. Biol. Chem.* 271:4573-4576.

Cho NH, Kim YT, Kim JW (2002). Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J.* Dec;43(6):722-8. Review.

Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. (2001). Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology*. Jun;142(6):2351-60.

Claassent G.F. and Hann S.R. (1999) Myc-mediated transformation: the repression connection. *Oncogene* 18: 2925-2933.

Cohen SM, Ellwein LB. (1991). Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res*. Dec 15;51(24):6493-505. Review.

Crish JF, Bone F, Balasubramanian S, Zaim TM, Wagner T, Yun J, Rorke EA, Eckert RL.(2000): Suprabasal expression of the human papillomavirus type 16 oncoproteins in mouse epidermis alters expression of cell cycle regulatory proteins. *Carcinogenesis*. May;21(5):1031-7.

Damante G, Filetti S, Rapoport B. (1987). Nucleotide sequence and characterization of the 5' flanking region of the rat Ha-ras protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb;84(3):774-8.

DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8;94(14):7245-50.

Drinkwater N.R. (1990). Experimental models and biological mechanisms for tumor promotion. *Cancer Cells*. Jan;2(1):8-15. Review.

Dong L, Wang W, Wang F, Stoner M, Reed JC, Harigai M, Samudio I, Kladd MP, Vyhldal C, Safe S. (1999). Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. *J Biol Chem*. Nov 5;274(45):32099-107.

Dyson N., Howley P.M., Munger K., and Harlow E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. Feb 17;243(4893):934-7.

Eldridge S.R., Butterworth B.E. and Goldsworthy T.L. (1993). Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents. *Environmental Health Perspectives* 101 (suplemento 5) 211-218.

El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. Nov 19;75(4):817-25.

El-Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M., Velculescu V.E., Canman C.E., Jackman J., Pietenpol J.A., Burrell M., Hill D.E., Wang Y., et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*. Mar 1;54(5):1169-74.

Folley J., Ton T., Maronpot R., Butterworth B. and Goldsworthy T.L. (1993). Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. *Environmental Health Perspectives* 101 (suplemento 5) 199-206.

Gao YL, Twiggs LB, Leung BS, Yu WC, Potish RA, Okagaki T, Adcock LL, Prem KA. (1983). Cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in primary cervical carcinoma: clinical and histopathologic correlates. *Am J Obstet Gynecol.* Jun 1;146(3):299-306.

Gariglio P, Benitez-Bribiesca L, Berumen J, Alcocer J M, Tamez R, Madrid V. (1998). Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans. *Arch Med Res.* Winter;29(4):279-84. Review.

Gartel AL, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hay N, Najmabadi F, Tyner AL. (2001) Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 10;98(8):4510-5.

Gartel AL, Tyner AL. (1999). Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* Feb 1;246(2):280-9. Review.

Gerard G. N. (2000). The Role of Papillomavirus in Gynecological Diseases. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 37(3):183-215.

Graccia A.J. and Kastan M.B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* ,12:2973-2983.

Guo L, Yu QC, Fuchs E. (1993). Targeting expression of keratinocyte growth factor to keratinocytes elicits striking changes in epithelial differentiation in transgenic mice. *EMBO J.* Mar;12(3):973-86.

Halbert CL, Demers GW and Galloway DA (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Journal of Virology.* Jan: 473-478.

Hanahan D. and Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
Hennings H., Adam B.G., David T.L., Ljubicka S., Krsmanovic L.M., Sly. and Stuart H., and Yuspa. (1993). FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis.* 14(11):2353-2358.

Helt AM, Funk JO, Galloway DA. (2002). Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol.* Oct;76(20):10559-68.

Hickman ES, Moroni MC, Helin K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* Feb;12(1):60-6. Review.

Hildesheim A., Schiffman M., Bromley C., Wacholder S., Herrero R., Rodríguez A., Bratti M.C, Sherman M.E, Scarpidis U., Lin Q., Terai M., Bromley R.L., Buetow K., Apple R.J., Burk R.D. (2001). Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93; 315-318.

Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK. (1989). Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology.* Sep;125(3):1683-90.

Jones DL, Thompson DA, Suh-Burgmann E, Grace M, Munger K. (1999). Expression of the HPV E7 oncoprotein mimics but does not evoke a p53-dependent cellular DNA damage response pathway. *Virology.* Jun 5;258(2):406-14.

Jones D.L., Thompson D.A. and Munger K. (1997). Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology.* Dec 8;239(1):97-107.

Juin P., Hueber A.O., Littlewood T. and Evan G. (1999). C-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev.* 13:1367-1381.

Kelman Z. and Hurwitz J. (1988). Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism. *Trends in Biochemical Sciences.* 23:236-238.

Kelman Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene.* 14:629-640.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Aug;26(4):239-57. Review.

Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Grenn D.R. and Newmeyer D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275:1132-1136.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* Apr 1;11(7):847-62.

Lai M.D., Jiang M.J. and Wing L.Y. (2002). Estrogen stimulates expression of p21Waf1/Cip1 in mouse uterine luminal epithelium. *Endocrine.* Apr;17(3):233-9.

Lakin N.D. and Jackson S.P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene.* 18:7644-7655.

Lee LA, Resar LM, Dang CV(1995). Cell density and paradoxical transcriptional properties of c-Myc and Max in cultured mouse fibroblasts. *J Clin Invest.* Feb;95(2):900-4.

Li S. (1994). Relationship between cellular DNA synthesis, PCNA expression and sex steroid hormone receptor status in the developing mouse ovary, uterus and oviduct. *Histochemistry.* Nov;102(5):405-13

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* Jul 12;86(1):147-57.

Liu X., Zou H., Slaughter C. and Wang X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.

Levine A.J. (1997). p53; the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell,* 88:323-331 .

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O.(1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1;90(23):11162-6.

Lu S, Syrjanen K, Havu VK, Syrjanen S.(1996). Expression of PCNA is associated with the presence of HPV DNA in skin warts. *Arch Dermatol Res.* Dec;289(1):35-9.

Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT.(1994). Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 29;91(7):2436-40. Review.

Marais R, Marshall CJ. (1996). Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv.* 1996;27:101-25. Review.

Martinez A.(1998) Detection of mRNA in tissue sections by in situ RT-PCR. *Cell Vis.* Jan-Feb;5(1):70.

Marshall C.J. (1996). Ras effector. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:197-204.

Medina-Martinez O, Vallejo V, Guido MC, Garcia-Carranca A.(1997). Ha-ras oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. *Mol Carcinog.* Jun;19(2):83-90.

Mitrani-Rosenbaum S., Tsvieli R. and Tur-Kaspa R. (1989). Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *J. Gen. Virol.* 70: 2227-2232.

Mohar A., Lazcano E., Gariglio P., et al. (1999). Carcinoma cérvico-uterino en México: Una perspectiva multidisciplinaria. En: Diez Problemas de Salud Pública (J.R. de la Fuente y J. Sepúlveda, compiladores). Fondo de Cultura Económica. 187-208, Mexico.

Munger K, Howley PM.(2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* Nov;89(2):213-28. Review.

Newfiel L., Bradlow H.L., Sepkovic D.W. and Auborn, K. (1998). Estrogen metabolism and the malignant potential of human papilomavirus immortalized keratinocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217:322-326.

Nichols A.F. and Sancar A. (1992). Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nuclei Acids Research.* 20:2441-2446.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA.(1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* Jul 6;376(6535):37-43.

Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M, Graef AM, Gariglio P.(1987). High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.* Aug 1;47(15):4173-7.

Ocadiz R, Saucedo R, Salcedo M, Ortega V, Rodriguez H, Gordillo C, Chavez P, Gariglio P.(1989). Occurrence of human papillomavirus type 16 DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine-cervix carcinoma. *Arch Invest Med (Mex).* Oct-Dec;20(4):355-62.

Ozalp SS, Yalcin OT, Tanir HM, Dundar E, Yildirim S. Bcl-2 expression in preinvasive and invasive cervical lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2002;23(5):419-22.

Pater M.M., Mittal R. and Pater A. (1994). Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomaviruses. *Trends Microbiol.* 2, 229-234.

Pestell R.G., Albanese C., Reutens A.T., Segall J.E., Lee R.J. and Arnold A. (1999). The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev.* Aug;20(4):501-34.

Prendergast G.C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18: 2967-2987.

Pethe V, Shekhar PV. (1999). Estrogen inducibility of c-Ha-ras transcription in breast cancer cells. Identification of functional estrogen-responsive transcriptional

regulatory elements in exon 1/intron 1 of the c-Ha-ras gene. *J Biol Chem.* Oct 22;274(43):30969-78.

Pronk G.J. and Bos J.L. (1994). The role of p21 ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1198: 131-147.

Raff M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.

Quarmby VE, Korach KS. (1984). Differential regulation of protein synthesis by estradiol in uterine component tissues. *Endocrinology.* Aug;115(2):687-97.

Rob M.F., Wolthius and Johannes L.B. (1999). Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Current Opinion in Genetics and Development.* 9: 112-117.

Rudel T. and BoKoch G.M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571-1574.

Saegusa M, Machida D and Okayasu I (2001). Possible Associations among Expression of p14 ARF, p16 INK4a, p21KIP1, and p53 Accumulation and the Balance of Apoptosis and Cell Proliferation in Ovarian Carcinomas. *Cancer.* Vol 92: 1177-1189.

Safe S. (2001). Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm.*62:231-52. Review.

Sauceda R, Ocadiz R, Gutierrez AL, Salcedo M, Ortega V, Figueroa HH, Gariglio P.(1988). Novel combination of c-myc, N-myc and N-ras oncogene alteration in brain tumors. *Brain Res.* Apr;427(2):123-32.

Schneider A., Hotz M. and Gissmann L. (1987). Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int. J. Cancer* 40, 198-201.

Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, Korach KS. (1999). Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology.* Jun;140(6):2733-44.

Sheffner M., Romanczuk H., Munger K., Huibregste J.M., Mietz J.A. and Howley P.M. (1994). Of human papillomavirus proteins. *Curr .Top. Microbiol. Immunol.* 186,83-99.

Sherr C.J. and Roberts J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* May 15;9(10):1149-63. Review.

Shiffman M., Haley N.J., Felton J. S., Andrews A. W., Kaslow R.A., Lancaster W.D., Kuurman R.J., Brinton L.A., Lannom L.B. and Hoffman D. (1987). Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituents in the cervix. *Cancer Res.*47, 3886-3888.

Soares CP, Benatti Neto C, Fregonezi PA, Teresa DB, Santos RT, Longatto Filho A, Maeda MY. (2003). Computer-assisted analysis of p53 and PCNA expression in oral lesions infected with human papillomavirus. *Anal Quant Cytol Histol.* Feb;25(1):19-24.

Song S, Liem A, Miller JA, Lambert PF. Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology.* 2000 Feb 15;267(2):141-50.

Spyridopoulos I., Sullivan A.B., Kearney M., Isner J.M. and Losordo D.W. (1997). Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation.* 95: 1505-1514.

Tsai LC, Hung MW, Yuan CC, Chao PL, Jiang SY, Chang GG, Chang TC. (1997). Effects of tamoxifen and retinoic acid on cell growth and c-myc gene expression in human breast and cervical cancer cells. *Anticancer Res.* Nov-Dec;17(6D):4557-62.

Toschi L. and Bravo R. (1988). Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *Journal of Cell Biology.* 107:1623-1628
Tsurimoto T. (1998). PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochim Biophys Acta.* Nov 26;1443(1-2):23-39. Review.

Van Le L, Stoerker J, Rinehart CA, Fowler WC.(1993). H-ras codon 12 mutation in cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* May;49(2):181-4.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N.(1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* Sep;189(1):12-9.

Wang X., Zelenski N.G., Yang J., Sakai J., Brown M.S. and Goldstein J.L. (1996). Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by cyp32 during apoptosis. *EMBO J.* 15:1012-1020.

Westbrook TF, Nguyen DX, Thrash BR, McCance DJ. (2002). E7 abolishes raf-induced arrest via mislocalization of p21(Cip1). *Mol Cell Biol.* Oct;22(20):7041-52.

Xie B, Tsao SW, Wong YC.(2000). Sex hormone-induced mammary carcinogenesis in the female Noble rats: expression of bcl-2 and bax in hormonal mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* May;61(1):45-57.

Yager J.D. and Liehr J.G. (1996). Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:203-232.

Yuan F, Chen DZ, Liu K, Sepkovic DW, Bradlow HL, Auborn K.(1999). Anti-estrogenic activities of indole-3-carbinol in cervical cells: implication for prevention of cervical cancer. *Anticancer Res.* May-Jun;19(3A):1673-80.

Zakut-Houri R, Bienz-Tadmor B, Givol D and Oren M (1985). Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J.* Vol4: 1251-1255.

Zur Hausen H. (1991). Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*,184:9-14.

Zur Hausen H. (1996). Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochem. Biophys. Acta.* 1288; F55-F78

APÉNDICE

Tris (Hidroximetil-amino-metano)

- 1M
- 121.1 g Tris base (Invitrogen, USA)
- 800 ml de agua
- Ajustar a pH 7.4
- Aforar a 1L
- Esterilizar en autoclave.

TAE (Amortiguador Tris-acetatos)

- Para 1L a 50X
- 242g Tris base
- 57.1 ml Acido acético glacial (Merck, México)
- 100 ml EDTA 0.5M pH 8.0 (SIGMA, USA)
- Aforar a 1L
- Esterilizar en autoclave

Bromuro de etidio (Br⁻et⁺)

- 1 g de bromuro de etidio (Research Organics, USA)
- 100 ml H₂O
- Agitar varias horas
- Almacenar en frasco ámbar a 4°C

Agua destilada

Se utiliza agua destilada esterilizada en autoclave la cual es nuevamente esterilizada por filtración (poro de 0.2 mm) y almacenada en alícuotas a -20°C.

EDTA (Acido etilen-diamino-tetra-acético)

- Para 1 L
- 186.1 g EDTA
- 800 ml agua
- Ajustar a pH 8.0 con aprox. 20 g de lentejas de NaOH.(J.T. Baker)
- Aforar a 1L
- Esterilizar en autoclave

DEPC (Dietil pirocarbonato)

- Para 100 ml al 0.1%
- 0.1 g DEPC (Sigma, USA)
- 100 ml agua
- Esterilizar en autoclave

-Esterilizar por filtración

NaOH (Hidróxido de sodio)

- 1N
- 4g NaOH
- 100 ml H₂O
- 0.1 M pH 8.5 – 9.0
- Ajustar pH con bicarbonato de sodio

Deoxinucleótidos tri-fosfatados (dNTP's) (Invitrogen)

- 10 µl dATP 100 mM
- 10 µl dCTP 100 mM
- 10 µl dGTP 100 mM
- 10 µl dTTP 100 mM
- 60 µl de agua ultra pura

Buffer salino de fosfatos 10X (PBS)

- NaCl 160g (J.T.Baker)
- KCl 4g (J.T.Baker)
- Na₂HPO₄ 28.8g (J.T.Baker)
- KH₂PO₄ 4.0 g (J.T.Baker)

Se disuelven en 2 litros de agua destilada y se ajusta a pH 7.5, para posteriormente esterilizarse en autoclave.

PBS 1X-Tritón X100 (0.01%)

Para preparar 50 ml de esta solución, se toman 5 ml de PBS 10X y se disuelven en 45 ml de agua destilada, agregándole 5 µl de tritón X-100 (detergente no iónico BIO-RAD).

Proteinasa K (PK) (Invitrogen)

Para preparar la PK a una concentración de (0.5 mg/ml), se toma una alícuota de 10 µl de la proteinasa K (20 mg/ml) mas 390 µl de agua ultrapura.

DNasa STOCK (Invitrogen)

- 352 µl H₂O ultrapura
- 16 µl tris 1M pH 7.4
- 9.6 µl MgCl₂ 250 mM
- 1.6 µl CaCl₂ 500 mM
- 10 µl DNasa 10 U/ml

Se hace una dilución de DNasa 0.1U/muestra 1:25

Acético anhídrido 0.25% + 0.1 M de Trietanolamina

Se pesan 0.98 grs de Trietanolamina (Sigma) y se disuelven en 50 ml de agua destilada, agregándoles 128 μ l de acético anhídrido (Merck).

Acido acético al 20 % (Merck)

Para preparar 50 ml, se toman 5 ml de ácido acético y se mezclan en 45 ml de agua destilada.

Mezcla de reacción para PCR (DIG Labeling Mix) (Invitrogen)

Reactivos

- Agua estéril
- Buffer de PCR 10X (200 mM Tris –HCl pH 8.0, 500 mM KCl). Para una reacción de 50 μ l se agregan 5 μ l a una concentración final de 0.5X
- DIG para PCR (2 mM dATP, DCTP, 1.9 mM dTTP, 0.1 mM digoxigenina-11-dUTP) con un volumen de 10 μ l a una concentración final de 200 mM dNTP
- Primer 1 con un volumen de 1 μ l y a una concentración final de 0.1-1 mM
- Primer 2 con un volumen de 1 μ l y a una concentración final de 0.1-1 mM
- Taq DNA polimerasa a un volumen de 0.2 – 1 μ l y a una concentración final de 1-5 U/100 ml
- DNA con volumen y concentración variable

Oligo (dt)₁₂₋₁₈ (Invitrogen)

Concentración: 0.5 μ g/ μ l

Descripción: Oligo (dt)₁₂₋₁₈ para reconocer la cola de poli(A) del mRNA, conveniente para usar en la síntesis de cDNA con la enzima transcriptasa reversa. El primer está en agua DEPC a una concentración de 0.5 μ g/ μ l, fosforilado en la terminación 5'.

Obtención de cDNA

- 12.8 μ l de agua ultrapura
 - 4 μ l de Buffer 5X
 - 1 μ l dNTPs 10 mM
 - 0.25 μ l Inhibidor deRNasas
 - 0.5 μ l Oligo dT
 - 0.6 μ l DTT
 - 0.5 μ l transcriptasa reversa SuperScript.
- Se le agregan 20 μ l a cada muestra y se incuba a 37°C durante 2 horas.

**Enzima transcriptasa reversa, SuperScript™ II Rnase H⁻ (200 U/μl)
(Invitrogen)**

- Buffer de almacenamiento
- 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 - 100 mM NaCl
 - 0.1 mM EDTA
 - 0.01%(v/v) NP-40
 - 50% (v/v) glicerol

Anti-Digoxigenina-AP dilución 1:200 (Roche)

Fragmento Fab (fragment antigen binding) de un anticuerpo generado en oveja, conjugado a una fosfatasa alcalina (AP) 150 U (200 μl)

- 343 μl H₂O
- 40 μl Tris 1M pH 7.5
- 14.8 μl NaCl 4M
- 2 μl Anti-dig

Se adicionan 40 μl aproximadamente a cada tejido y se incuba durante 2 horas

**Substrato para la fosfatasa alcalina
(Zimed BCIP/NBT KIT para Histoquímica)**

Contenido:

- Un vial de buffer concentrado para substrato 20X, 6 ml
- Un vial de BCIP (5-bromo-4cloro – indol fosfatidil)concentrado 20X, 6ml
- Un vial deNBT (Nitro blue of tetrazolium) concentrado 20X, 6 ml

PREPARACIÓN: En 1 ml de agua bidestilada, se le agrega una gota del vial 1 y 3, mezclando bien y después se le agrega una gota del vial 2. Verificar cada 2 min al microscopio hasta observar la señal de la reacción.

Medio de montaje

El medio de montaje histológico es de 100 ml (Permout Fisher Chemical).

Solución para recuperación de citratos

Esta solución se prepara con ácido cítrico 0.1 M ,agregando 0.9 μl, mas 4.1 de citrato de sodio 0.1 M y 45 μl de agua ultrapura para un volumen final de 50 ml.

Solución de peróxido de hidrógeno

Para preparar 50 ml se agregan 5 ml de peróxido al 30% mas 45 de metanol absoluto.

HISTOMOUSE tm-SP KIT (Zimed lab-SA System)

- 1.-BEAT tm Solución bloqueadora A : para eliminar el fondo inespecífico.
- 2.-BEAT tm Solución bloqueadora B
- 3.-Anticuerpo secundario biotinilado 1C: sirve como un puente entre el anticuerpo primario y el conjugado de estreptavidina peroxidasa.
- 4.-Enzima conjugada (estreptavidina peroxidasa), se une al residuo de biotina unido al anticuerpo primario.
- 5.-Substrato: Se agrega una gota del reactivo 3A mas 3B y 3C en 1 ml de agua destilada.
- 6.-Hematoxilina
- 7.-Solución de montaje.

***in situ* Cell Death Detection Kit, AP (Roche, USA) TUNEL**

Solución enzimática: Contenido: Transferasa terminal deoxinucleotidil de timo de ternera en buffer.

-10X conc.

-5 X 50 μ l

Solución de marcaje: Contenido

-Mezcla de nucleótidos: dUTT, dUTC, dUTA, dUTG en buffer

-1X conc.

-5 X 550 μ l