

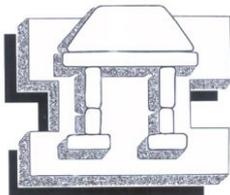


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**CARACTERIZACIÓN DEL DNA GENÓMICO DE
RETINOBLASTOMAS PRIMARIOS Y
DETERMINACIÓN POR REACCIÓN DE
POLIMERASA EN CADENA (PCR), DEL DNA
DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
DOLORES LEON GARCIA



DIRECTOR DE TESIS: DRA. M. VERONICA PONCE CASTAÑEDA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis Padres José y Natalia con admiración y respeto, por creer siempre en mí, por brindarme su apoyo, su confianza y por su amor incondicional... GRACIAS.

A mis hermanos Juan, Timo, Regina, Adela, Vero, Fernando y Adrianita, por todos los momentos compartidos, por crecer juntos y por apoyarme siempre en las buenas y en las malas, los quiero mucho.

A todos mis sobrinos y sobrinas: Elizabeth, Mariana, Ana Karen, Liliana, David, Isabel, José Eduardo, Alejandro, Luis Roberto, Dianita, Marco Antonio, Monserrath, Alejandrito... Y por todos los que faltan, los quiero un... buen.

A mis amigas:

A mi Querida Claudia por ser mi apoyo incondicional cuando más lo necesite, por todas las alegrías que siempre me distes y por todo lo que aún significas para mí.

Raquel, Isabel y Laura (Las chicas superpoderosas) por todos los gratos momentos que tuvimos juntas, por su cariño y apoyo.

A mí tocaya Lolita Téllez, por que siempre... siempre confiaste en mí.

A Paty Mancilla, Alma Delia, Mónica, Tania, Maura Alejandra, Mony Buendía, Angy, Olivia, Vero, Flor y Eloísa (donde quiera que estés). A todas ellas por su amistad, por ser un ejemplo de vida y por ser siempre buenas conmigo.

A todas y cada una de las personitas, que desafortunadamente tienen esta enfermedad, a todas ellas mis respeto y mis mejores deseos por su lucha constante por la vida.

Y por ultimo sin ser menos importante a mi queridísima Adriana, por la amistad que hemos compartido todos estos años, por el cariño que nos une, pero sobre todo tu confianza y apoyo... gracias.

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo de tesis, se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP), del Hospital de Pediatría CMNSXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

DE FORMA MUY ESPECIAL.

A la Dra. M. Verónica Ponce Castañeda por permitirme participar en este proyecto, por sus constantes indicaciones, que lograron llevar a término este trabajo... gracias.

A la M en C. Adriana Hernández Angeles, por su apoyo en el laboratorio y por su gran experiencia, que forma parte importante de este trabajo... nuevamente gracias.

A la Dra. Manuela Orjuela, por su participación y apoyo en el proyecto de Retinoblastoma.

A MIS SINODALES. Dr. Diego Arenas Aranda, Dr. Sergio Vaca Pacheco, Dr. Elías Piedra Ibarra, Dra. Verónica Ponce Castañeda y al M en C. Ramón V. Moreno Torres, quienes revisaron y participaron con sus críticas y sugerencias en el presente trabajo.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE LABORARIO.

Por que todos ellos de alguna manera, en algún momento, me apoyaron:

A la Dra. Martha E. Ruíz Tachiquín por su confianza y sus sugerencias, por ser siempre una gran persona.

A Karina Fernández Méndez por el gran apoyo que me brindo de forma incondicional, por su confianza en mí y su amistad... gracias.

A Pilar Eguía Aguilar por su disposición a aclarar mis dudas y por su amistad.

A Hilda Valdez Salazar por su apoyo en el laboratorio.

Así, también agradezco a todos aquellos que sin desearlo he omitido.

Índice

	Página
Resumen	VI
1 Introducción	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Retinoblastoma	2
1.3 Manifestaciones clínicas	3
1.4 Etiología y estudios moleculares del RB	4
1.5 Proteína Rb	5
1.6 Diagnóstico y Tratamiento	6
2 Antecedentes	8
Justificación	9
2.1 Virus del papiloma humano	9
3 Objetivos Generales	11
4 Objetivos Particulares	11
5 Material y Métodos	11
5.1 Tejidos tumorales	12
5.2 Extracción de DNA de retinoblastomas congelados	13
5.3 Análisis espectrofotométrico de las muestras de DNA	14
5.4 Análisis electroforético de las muestras de DNA	14
5.5 Amplificación con iniciadores para Beta globina PCO4 y GH20	14
5.6 Amplificación con iniciadores Manos MY09 y MY11	15

5.7	Amplificación con iniciadores GP5+ y GP6+	16
5.8	Amplificación con iniciadores LC1 y LC2	17
5.9	Secuenciación de fragmentos amplificados por PCR	
	Clonados molecularmente	17
	a) Purificación del fragmentos amplificados con el Kit	
	QIAEX II de QIAGEN	17
	b) Clonación con el vector pGEM Kit pGEM®-T Easy Vector de	
	Promega	17
	c) Protocolo de Transformación con células competentes DH5α	18
	d) Minipreparaciones de DNA plasmidico	18
	e) Digestión enzimática de plásmidos	18
6	Resultados	19
6.1	Extracción de DNA genómico	19
6.2	Determinación de la concentración y la calidad de cada muestra	
	de DNA por criterios espectrofotométricos y electroforéticos	20
6.3	Reacción en cadena de la polimerasa utilizando los iniciadores	
	de Beta globina,PCO4 y GH20, Manos MY09 y MY11,	
	GP5+ y GP6+ y LC1, LC2.	
	Grupo I	24
	Grupo II	25
	Grupo III	26
6.4	Tumores HPV positivos	28
6.5	Clonación de muestras positivas por Manos a status HPV	29
6.6	Secuenciación de fragmentos clonados	31
7	Discusión	34
8	Conclusión	35
9	Bibliografía	36

Resumen

Los retinoblastomas (Rb) son tumores intraoculares malignos que se producen en niños pequeños, durante la infancia temprana. Existen dos tipos de retinoblastoma: la forma “familiar” o hereditaria que depende claramente de la transmisión de un gen de padres a hijos y constituyen aproximadamente el 40% de los casos, y la forma “esporádica” ó unilateral que constituye el 60 % de los casos. Sin embargo, alrededor del 15% de los pacientes con retinoblastoma unilateral tienen el tipo hereditario. Uno de los principales síntomas de esta enfermedad es la leucocoria que se caracteriza por presentar una pupila blanca en uno o ambos ojos, también es conocido como reflejo ojo de gato, más del 75% de los niños con retinoblastoma acuden a consulta médica por presentar este síntoma.

La enucleación que es la extirpación quirúrgica del globo ocular afectado, constituye el tratamiento más común para el paciente y aunque drástico, incrementa sus probabilidades de curación y sobrevivencia.

Los antecedentes inmediatos al presente trabajo, se derivaron de un estudio epidemiológico de casos y controles, teniendo como objetivo principal explorar las exposiciones ambientales durante el período gestacional y perinatal en pacientes afectados por retinoblastoma. En ese trabajo se identificaron factores de riesgo asociados al retinoblastoma y a la pobreza materna durante el embarazo, varios de estos factores se sobrelapan con los factores de riesgo asociados al cáncer cérvico uterino generado por el Virus del Papiloma Humano (VPH). Esta observación condujo a la búsqueda de DNA de este virus en un grupo de retinoblastomas, encontrándose estas secuencias por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) en DNA de tejido tumoral en un 36 % de los 50 casos estudiados inicialmente. El presente trabajo constituye la ampliación y la continuación de esa investigación en otra población pediátrica hospitalaria.

Se realizó la extracción de DNA de 102 retinoblastomas primarios congelados y obtenidos post enucleación, como parte del tratamiento que estos niños recibieron en el hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS, o en el Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez de la Secretaría de Salud en la ciudad de México.

Debido a que la identificación del DNA del virus está basada en una reacción de amplificación enzimática, se tomaron las siguientes medidas para evitar la contaminación del DNA entre los tumores o con DNA proveniente de otras fuentes: todo el material quirúrgico para la disección y obtención del tejido tumoral, así como los contenedores para transportar las piezas quirúrgicas, se trataron con una solución de hipoclorito al 5% y posteriormente con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 5N. Para un manejo óptimo de las muestras se dividieron en tres: grupo I, grupo II y grupo III. Las reacciones enzimáticas se limitaron a la prueba de 6 tumores por turno en el termociclador.

El DNA tumoral, de controles positivos y negativos fueron los últimos reactivos añadidos a los tubos de reacción de PCR. Se emplearon puntas desechables con filtros para evitar el acarreo molecular por aerosol entre tubos.

A través un análisis espectrofotométrico y electroforético se determinó la cantidad de DNA extraído por cada muestra y se observó la integridad de las muestras en geles de agarosa al 0.8 %. Para probar que el DNA extraído puede ser amplificado por PCR se utilizaron los iniciadores de PC04 y GH20 que amplifican una región del gene β -globina. Para detectar el DNA del virus del papiloma humano, se emplearon tres pares de iniciadores: MY09 y MY11 (Manos), GPs (GP5+ Y GP6+) y LCs (L1C1 y L2C2) de una región conservada del gene L1 del genoma de HPV. De un total de 102 muestras, fue posible detectar por PCR en un 65% de las muestras el fragmento del tamaño esperado, mientras que el 30% de las muestras son negativas y un 4.8 % fueron muestras no informativas.

Para identificar el tipo de virus de papiloma humano que fue amplificado, un grupo limitado de fragmentos amplificados se clonaron molecularmente, y se secuenciaron. Las secuencias obtenidas son atípicas, se trata de secuencias humanas flanqueadas por pequeñas secuencias virales principalmente correspondientes principalmente al hvp 18 de alto riesgo.

1. Introducción y antecedentes

1.1 Cáncer.

El cáncer es la segunda causa de muerte en los adultos en el mundo occidental y es la principal causa de muerte por enfermedad en niños de 1 a 14 años (De Vita, 2000). El cáncer engloba un conjunto de enfermedades malignas (Friend, 1987) y puede originarse a partir de cualquier tipo de célula de los diferentes tejidos del organismo. Sus principales características son: crecimiento descontrolado de células anormales, que invaden y destruyen los tejidos vecinos y que generan metástasis, es decir la capacidad de crecer y diseminarse a otras partes del cuerpo (Murray, 2001). El cáncer es una enfermedad clonal donde todas las células de un tumor surgen de una sola célula en la que los mecanismos que regulan la proliferación celular se han dañado (De Vita, 2000).

Casi todos los cánceres forman masas de tejido que reciben el nombre de tumores, pero no todos los tumores son cancerosos o malignos; la mayor parte son benignos, es decir no ponen en peligro la vida. Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento localizado y suelen estar separados de los tejidos vecinos por una cápsula, tienen un crecimiento lento y una estructura semejante al tejido del que proceden.

La característica principal de los tumores malignos es su capacidad de diseminación fuera del lugar de origen. La invasión de los tejidos vecinos puede producirse por extensión o infiltración, o a distancia produciendo crecimientos secundarios conocidos como metástasis. Existen numerosos tipos de cánceres, entre los que destacan 4 grupos principales. Primeramente los **sarcomas**, que proceden del tejido conjuntivo presente en los huesos, cartílagos, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Un segundo tipo son los **carcinomas**, que surgen en los tejidos epiteliales como la piel o las mucosas que tapizan las cavidades y órganos corporales como el sistema respiratorio o digestivo, o en los tejidos glandulares de la mama y la próstata. En el tercer subtipo se encuentran las **leucemias** y los **linfomas**, que incluyen los cánceres que se originan en los tejidos formadores de las células

sanguíneas y un cuarto grupo en donde se agrupan los **tumores del sistema nervioso** (De Vita, 2000; Pizzo, 2002).

El cáncer es, en esencia, un proceso genético, y en adultos es el resultado de la acumulación durante la vida de cambios genéticos (mutaciones) en las células que lo forman. Es por esto que la mayoría de los casos de cáncer ocurren en adultos mayores (Menéndez, 2002). Estas mutaciones modifican los genes promotores y supresores del crecimiento y diferenciación celular. Las mutaciones se pueden producir por azar durante la síntesis de DNA y la replicación celular, así como consecuencia de la exposición a carcinógenos ambientales (mutágenos químicos como rayos ultravioleta, radiación ionizante o virus oncogénicos) o se pueden heredar como mutaciones de líneas germinales, como es el caso de varios tumores malignos de la infancia, o ciertos tumores que ocurren consistentemente en ciertas familias (Klein & Klein, 1985).

La predisposición del cáncer hereditario se atribuye a mutaciones de las células germinales en genes supresores de tumores. Este concepto se derivó del estudio del retinoblastoma y de la identificación del gen de susceptibilidad al retinoblastoma (Klein, 1987).

1.2 Retinoblastoma

Los retinoblastomas (Rb) son tumores intraoculares malignos que se producen durante la infancia temprana (Weinberg, 1988; Brena, 1992; Pizzo, 2002; Aerts, 2006). Existen dos tipos de retinoblastoma y se consideran manifestaciones distintas de la misma enfermedad. La forma “familiar” o hereditaria depende claramente de la transmisión de un gen de padres a hijos y constituyen aproximadamente el 40% de los casos (Weinberg, 1988; Brena, 1992; Pizzo, 2002). En los pacientes que padecen la forma familiar del retinoblastoma, se producen tumores múltiples comúnmente en ambos ojos, se diagnostica generalmente en niños y niñas menores de dos años e incluso los tumores están presentes al momento del nacimiento. En ocasiones estos niños vienen de familias, en las que el retinoblastoma se segrega como rasgo autosómico dominante, es decir tienen un progenitor afectado, aunque es común que estos niños no tengan padres afectados por la enfermedad, y en

esos casos se considera que los eventos mutacionales ocurrieron *de novo* en los pacientes afectados. Esta forma de la enfermedad ha sido considerada como modelo de estudio de la predisposición genética a padecer cáncer, ya que el riesgo de tener un hijo(a) afectado por retinoblastoma en una persona afectada por la forma bilateral del retinoblastoma es del 50% (Weinberg, 1988; De Vita, 2000, Murray, 2001). Además las personas afectadas por esta forma del retinoblastoma tienen un riesgo aumentado de desarrollar otros tipos de tumores malignos como sarcomas, melanomas, cáncer de cerebro y cavidades nasales (Fletcher, 2004; Mantela, 2005; Sage, 2005).

En contraste, la forma “esporádica” ó unilateral constituye el 60 % de los casos, y aproximadamente el 15 % de los pacientes con retinoblastoma unilateral tienen el tipo hereditario. El retinoblastoma unilateral esporádico se produce en un solo ojo y la edad al momento del diagnóstico es entre los tres y seis años. Estos niños no tienen un riesgo aumentado de desarrollar otros tumores malignos (Pizzo, 2002), y si llegan a la vida adulta y procrean, el riesgo que sus hijos desarrollen retinoblastoma es casi igual al de la población general.

El retinoblastoma se origina en los retinoblastos que son los precursores de las células de la retina, la capa fotosensible situada en la parte posterior del ojo. Debido a que estos retinoblastos son los precursores de la retina y desaparecen normalmente alrededor de los 7 años, es probable que los retinoblastomas se desarrollen a partir de eventos moleculares ocurridos en los retinoblastos. Cuando los retinoblastos se han diferenciado y se han transformado en células especializadas de la retina, cesan sus divisiones, no se detectan más y se piensa que por esto dejan de constituir el blanco celular para la formación de tumores. Todos estos eventos de diferenciación y maduración de la retina ocurren alrededor de los 7 años, edad a partir de la cual deja de ocurrir el retinoblastoma (Klein, 1987; Weinberg, 1988).

1.3 Manifestaciones clínicas.

Más del 75% de los niños con retinoblastoma acuden a consulta médica por la presencia del reflejo llamado ojo de gato que se caracteriza por presentar una pupila blanca en uno o ambos ojos, este síntoma se conoce como leucocoria. El estrabismo, la disminución de la agudeza visual, fotofobia y

cefalea son síntomas iniciales menos frecuentes (Brantley, 2001; Pizzo, 2002; Aerts, 2006). En imágenes tomográficas se observan calcificaciones y aumento en la densidad de tejidos blandos a nivel orbitario (Brena, 1992).

1.4 Etiología y estudios moleculares del Rb

En 1971, Alfred C. Knudson, propuso una explicación genética, basándose principalmente en las características clínicas y epidemiológicas del retinoblastoma, como la edad al momento del diagnóstico, número de tumores, tendencia a desarrollar otros tumores malignos etc. Con estos datos elaboró la hipótesis de los dos impactos genéticos y que ha sido muy útil para comprender el papel que los genes supresores de tumores tienen en el desarrollo de los tumores malignos (Knudson, 1971). Su hipótesis explica que los niños con retinoblastoma hereditario, han heredado un “primer impacto” genético transmitido germinalmente, es decir han heredado un alelo mutado y por lo tanto esta mutación se encuentra en todas las células del cuerpo, incluidas las células de la retina. Knudson propuso que el gen mutado confiere a estos pacientes la predisposición a desarrollar el retinoblastoma y posteriormente otros tumores malignos. Su hipótesis propone que este gen procede de un progenitor afectado por la enfermedad o de algún accidente genético, ocurrido durante la formación del espermatozoide o del óvulo en los progenitores. Su hipótesis propone también la existencia de un “segundo impacto” genético, que se produce posteriormente como una mutación somática, es decir localmente en los retinoblastos, que ya portaban la mutación adquirida congénitamente. Knudson concluyó y propuso que las células de los retinoblastomas no portan un gen mutante, sino dos por lo menos (Weinberg, 1988; De Vita, 2000, Murray, 2001; Menéndez, 2002; Pizzo, 2002).

En 1978, Yunis y Ramsey en un estudio citogenético de células derivadas de la forma bilateral del retinoblastoma, identificaron que el brazo largo q del cromosoma 13 muestra con frecuencia una pérdida total o parcial. Propusieron que esta falta de material genético podría provocar la pérdida de uno o varios genes en ese locus y por tanto la pérdida de una función celular crucial. De estas observaciones se derivó el término gen supresor de tumores (Weinberg, 1988; Pizzo, 2002), y así el gen de susceptibilidad al retinoblastoma

originalmente propuesto por Knudson, dio origen al concepto de gen supresor de tumores (Klein, 1987).

El aislamiento e identificación por clonación molecular del gen de susceptibilidad al retinoblastoma se publicó en 1983. Con técnicas clásicas de clonación se aisló un fragmento de DNA complementario (cDNA) de 4,7 Kb a partir de células retinianas. Este cDNA corresponde al gen RB1 que se encuentra en el cromosoma 13 la banda q 14.2 (Friend, 1987; Nelson, 1997; Fletcher, 2004; Knudsen, 2006), consta de 27 exones y codifica una fosfoproteína nuclear (pRB) con una movilidad relativa (Mr) de 105 kD. El análisis molecular de este gene en varias líneas celulares y en el DNA de pacientes afectados por retinoblastoma bilateral, confirmó la hipótesis del “doble impacto” de Knudson. Con herramientas moleculares, ha sido posible comprobar que en el DNA de varios retinoblastomas, existe pérdida de uno de los alelos del gene RB1, fenómeno conocido como pérdida de heterocigocidad, y que el alelo correspondiente restante, se encuentra inactivado por mutaciones puntuales (Brantley, 2001; Rodríguez, 2005; Knudsen, 2006).

1.5 Proteína RB (pRb)

La clonación del gen RB permitió estudiar la función biológica de este componente genético. Ahora se sabe, que la proteína pRb codificada por el gen RB1 desempeña una función importante en la regulación del ciclo celular. Esta proteína tiene la capacidad de unirse e interactuar con una variedad de proteínas celulares y esta función es determinada por su estado de fosforilación (Brantley, 2001; Sage, 2006; Vietri, 2006). Existe evidencia bioquímica de que la forma no fosforilada de pRb es responsable de la interrupción de la proliferación celular (Rodríguez, 2005; De Gregory, 2006; Donovan, 2006; Williams, 2006). Cuando pRb se encuentra hipofosforilada tiene alta afinidad por factores de transcripción maestros como la familia E2F/DP. Los complejos proteicos Rb-E2F inhiben la transcripción de los genes requeridos para atravesar el punto G1/S del ciclo celular (Nelson, 1997; Brantley, 2001; Aerts, 2006, Donovan, 2006). Su función inhibitoria se anula cuando pRb sufre fosforilación mediada por los complejos CDK-ciclina. La proteína pRb permanece fosforilada durante las fases S, G2 y M y la remoción

de estos fosfatos es efectuada por un complejo de fosfatasas después de completarse la mitosis. Esta desfosforilación restituye pRb a su estado de alta afinidad por los factores de transcripción mencionados y relacionados con la detención de la proliferación celular (Lodish, 2002, Collins, 2005; Donovan, 2006; Fojier, 2006, Williams, 2006). La proteína pRb también modula la actividad transcripcional de otras proteínas reguladoras, como son las enzimas que modifican la cromatina contribuyendo con su compleja participación en la proliferación de células eucariontes (Kleiner mam, 2005; De Gregory, 2006; Sage, 2006). La proteína pRb constituye un nodo regulatorio donde confluyen y se integran señales intra y extracelulares relacionadas con la proliferación y con la diferenciación de la célula. El descubrimiento de este gen y sus funciones biológicas han permitido identificar muchas otras proteínas que interaccionan con la proteína pRb, y ha permitido definir la ruta de señalamiento conocida como la ruta Rb. Esta ruta de señalización, tiene gran relevancia ya que existen alteraciones en diversos componentes de la ruta en prácticamente todos los tumores malignos de adultos (Weinberg, 1988; De Vita, 2000; Brantley, 2001; Pizzo, 2002). El impacto y la importancia que el estudio del retinoblastoma ha tenido, abarca tanto campos médicos como de la biología ya que su estudio ha aportado avances importantes en el campo de la genética, de la oncología pediátrica y de la oncología de adultos, así como en el campo de la proliferación y antiproliferación celular. Los estudios derivados de este tumor, han aportado información importante sobre las bases moleculares del fenómeno del cáncer en general.

1.6 Diagnóstico y tratamiento.

Hasta la mitad del siglo XIX, la aparición del retinoblastoma anunciaba el curso irremediable de una enfermedad fatal. El cerebro sufría una rápida invasión tumoral y el niño moría. Cuando en 1850 Hermann von Helmholtz inventó el oftalmoscopio, con el cuál se podía observar el interior del globo ocular y detectar el tumor mucho antes de que se expandiese e invadiera los tejidos adyacentes (Weinberg, 1988), se pudo implementar un diagnóstico más oportuno y junto con los avances anestésicos, se posibilitó la curación por extracción quirúrgica (enucleación) del globo ocular afectado.

Las indicaciones para la enucleación de un ojo afectado por retinoblastoma se establecen cuando: no existe posibilidad de preservar una visión útil si el tumor es destruido con quimioterapia, si existe glaucoma doloroso con pérdida de la visión, cuando el tumor ocupa completamente el globo ocular, o ha dañado la retina, si hay invasión del nervio óptico o si existen metástasis (Martin, 2001).

La evidencia microscópica de extensión tumoral al nervio óptico y sobre el límite quirúrgico de esta estructura anatómica, es indicativo que el tumor se ha expandido fuera del ojo e indica la necesidad de aplicar radioterapia y/o quimioterapia suplementarias. La crioterapia y fotocoagulación con laser pueden emplearse en tumores pequeños o tumores que aparecen después de la radioterapia (Brena, 1992; Pizzo, 2002). Los estudios histopatológicos de estadios iniciales muestran que cuando no hay invasión al nervio óptico, la supervivencia puede ser de 100%, y esto puede salvar la vida de muchos niños. Si hay invasión a la lámina cribosa la supervivencia disminuye a 85-90 %, sin embargo, cuando la invasión se extiende más allá de ésta desciende hasta el 40%. El pronóstico es reservado cuando existe invasión a la órbita, SNC o metástasis al momento del diagnóstico (Brena, 1992).

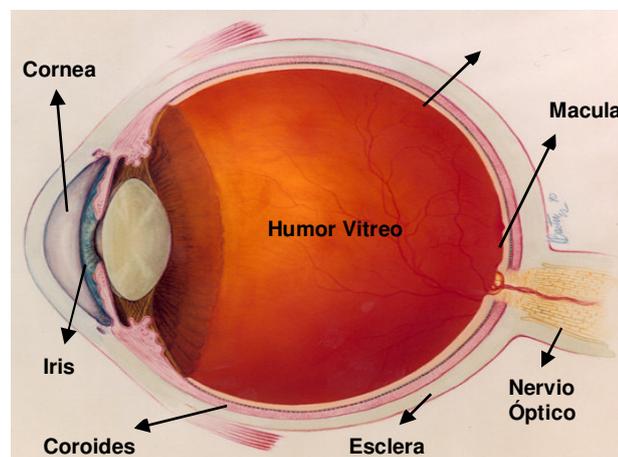


Figura 1.- Esquema del ojo humano.

2 Antecedentes

Aunque los factores de riesgo que se conocen, corresponden a la forma bilateral o hereditaria del retinoblastoma, las causas o factores de riesgo para la forma unilateral son poco entendidos. Los hallazgos o alteraciones moleculares como la pérdida de heterocigosidad o mutaciones identificables que se han reportado, no siempre se encuentran en las formas unilaterales. Por otra parte la incidencia del retinoblastoma, particularmente la forma unilateral, no está distribuida uniformemente en los distintos países y es más alta en países menos favorecidos económicamente, lo que sugiere que pueden existir agentes ambientales que estén involucrados en el desarrollo de este tumor.

Los antecedentes inmediatos al presente trabajo, se derivan de un estudio piloto epidemiológico de casos y controles, que se realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Pediatría (INP) y la Universidad de Columbia en Estados Unidos. Los estudios de casos y controles permiten definir factores riesgo y el objetivo principal de ese estudio fue explorar las exposiciones ambientales durante el período gestacional y perinatal en pacientes afectados por retinoblastoma y atendidos en el INP.

En ese estudio, se identificaron algunos factores asociados al retinoblastoma, y relacionados con la pobreza materna durante el embarazo incluyendo: falta de cuidado prenatal, parto en casa, bajo nivel de educación materna y disminución en la ingesta de alimentos ricos en ácido fólico en relación a las madres controles, haber padecido infecciones genitales y no emplear métodos anticonceptivos de barrera como los condones.

Debido a que algunos de estos factores encontrados se sobrelapan con los factores de riesgo asociado al cáncer cérvico uterino, se consideró que este sobrelape podría indicar un probable involucramiento del Virus del Papiloma Humano (VPH). Para probar esto, se buscaron secuencias de DNA de este virus en tejido tumoral usando PCR e hibridación tipo Southernblot. Se encontraron las secuencias de VPH en un 36 % de los 50 casos estudiados y estos hallazgos fueron publicados (Orjuela y Ponce, 2000).

El presente trabajo constituye la ampliación y la continuación de esa investigación.

Justificación

Probar la posibilidad de hacer extensivos estos hallazgos moleculares en tejidos tumorales en otra población hospitalaria.

2.1 Virus del papiloma humano

Los papilomavirus se encuentran en muchas especies de vertebrados, desde las aves hasta el hombre, son muy específicos de cada especie e inducen tumores epiteliales y fibroepiteliales de células escamosas en sus hospederos naturales. Estos virus tienen un genoma circular de DNA con aproximadamente 8000 pares de bases, y las partículas del virión tienen una cápside de 55nm (De Vita, 2000). Se han descrito más de 77 tipos diferentes de VPH. En humanos, se clasifican como virus de bajo o de alto riesgo. Los de bajo riesgo se han encontrado en lesiones benignas como verrugas vulgares, y los de alto riesgo se asocian a lesiones ano-genitales malignas (Collins, 2005; Farhardi, 2005).

El genoma del VPH se divide en dos regiones: una región temprana E (del inglés "Early") que codifica las proteínas del virus implicadas en la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación celular; y una región tardía L (del inglés "Late") que codifica las proteínas de la cápside viral. Los genes situados en la región temprana se designan como E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y los genes situados en la región tardía se designan L1 y L2.

ORF	Funciones de los genes de HPV 16
L1	Proteína L1, proteína principal de la cápside
L2	Proteína L2, proteína secundaria de la cápside
E1	Iniciación de la replicación del DNA vírico, helicasa, ATPasa
E2	Proteína reguladora de la transcripción, papel auxiliar en la replicación del DNA vírico; se une a E1
E4	Proteína tardía; altera las citoqueratinas
E5	Proteína transformadora de membrana; interactúa con los receptores del factor de crecimiento (BPV1)
E6	Proteína transformadora de VPH; regula la degradación de p53; activa a la telomerasa
E7	Proteína transformadora de VPH; se une a la proteína pRb

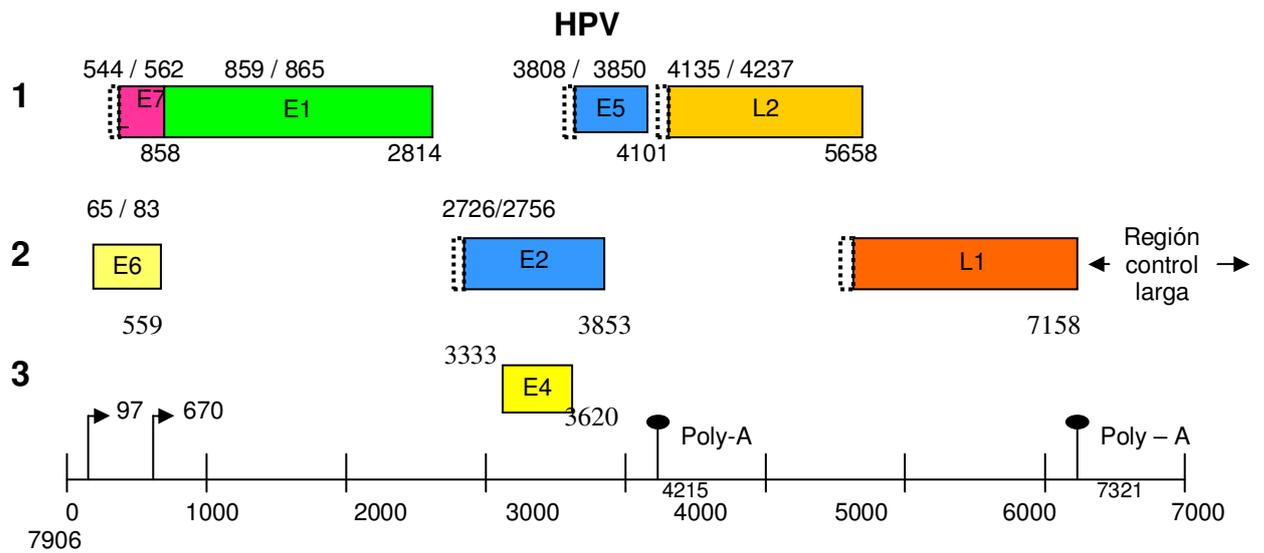


Figura 2.- Genoma del Virus del papiloma humano y los genes que lo conforman.

Actualmente se utiliza la secuencia de DNA de una región del gene L1 para identificar por reacción de polimerasa en cadena la presencia del DNA del virus (Jacobs, 1995; Jacobs, 1997; Rodríguez, 2005).

Para detectar el DNA del virus del papiloma humano, se emplearon tres pares de iniciadores en una región conservada del gene L1 que amplifican los segmentos mostrados en la figura 3.

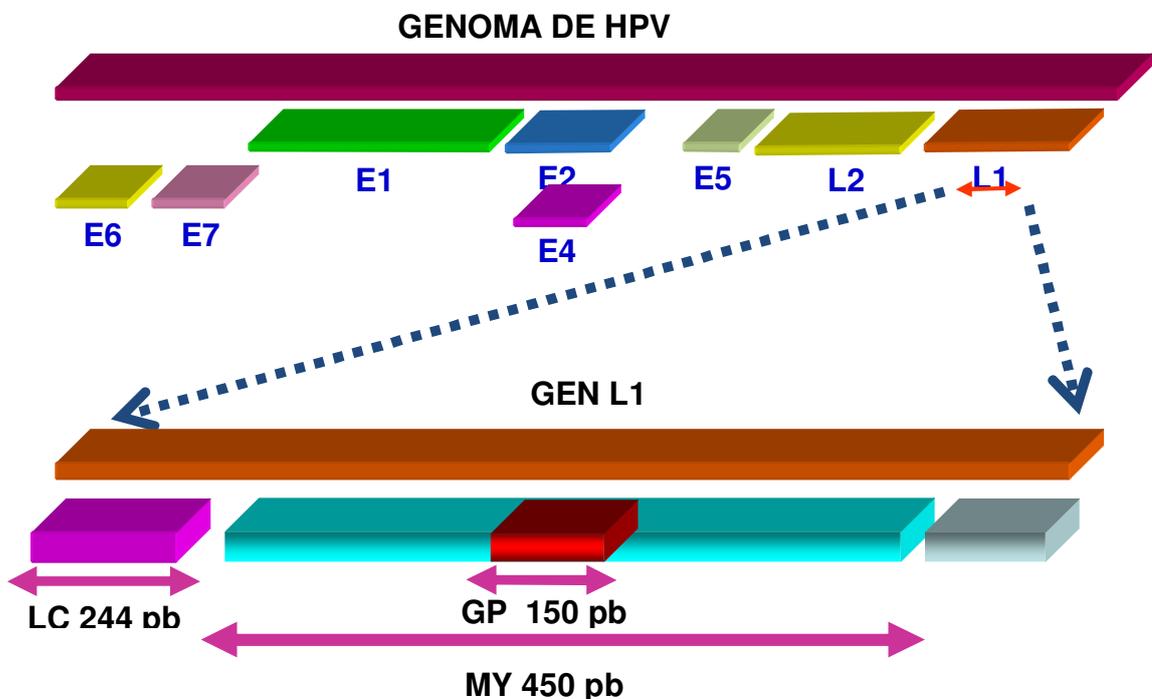


Figura 3. Región conservada del gen L1, y los productos amplificados de cada iniciador.

3 Objetivos Generales.

- 3.1 Purificar DNA genómico a partir de 102 muestras de retinoblastomas primarios congelados.
- 3.2 Purificar DNA genómico a partir de leucocitos periféricos correspondientes a cada paciente y de sus padres.
- 3.3 Determinar por la Reacción de Polimerasa en cadena usando los iniciadores de Manos MY09 y MY11, si está presente el DNA del virus de papiloma humano en los tejidos tumorales.

4 Objetivos Particulares.

- 4.1 Determinar concentración y calidad de cada muestra de DNA por criterios espectrofotométricos.
- 4.2 Llevar a cabo la reacción de Polimerasa en Cadena en cada muestra de tejido tumoral.
- 4.3 Secuenciar fragmentos amplificados, para determinar el tipo de virus involucrado.

5 Material y Métodos.

5.1 Tejidos tumorales.

Los tejidos tumorales provinieron de pacientes diagnosticados con retinoblastoma enucleados quirúrgicamente como parte de su tratamiento y que fueron atendidos en los siguientes hospitales:

El hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI del IMSS y el

Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez.

Con la finalidad de evitar la contaminación de los tumores quirúrgicos con DNA de otros agentes biológicos se tomaron medidas de contención como:

El material quirúrgico empleado durante la disección, se trató con una solución de detergente (dextran) más una solución de hipoclorito al 5%, posteriormente se mantuvo en NaOH 5N por al menos 20 minutos: la pieza quirúrgica se transportó desde el quirófano en un contenedor de vidrio estéril, hasta el laboratorio de patología, donde el especialista realizó un corte sagital en el globo ocular para acceder al tumor. Empleando una espátula de acero estéril y dependiendo del tamaño del tumor, se toma una porción del tumor que se dividió en dos. Una parte se almaceno en un tubo de criopreservación y otra se mantuvo en una solución estéril de PBS para cultivo celular Figura 4.

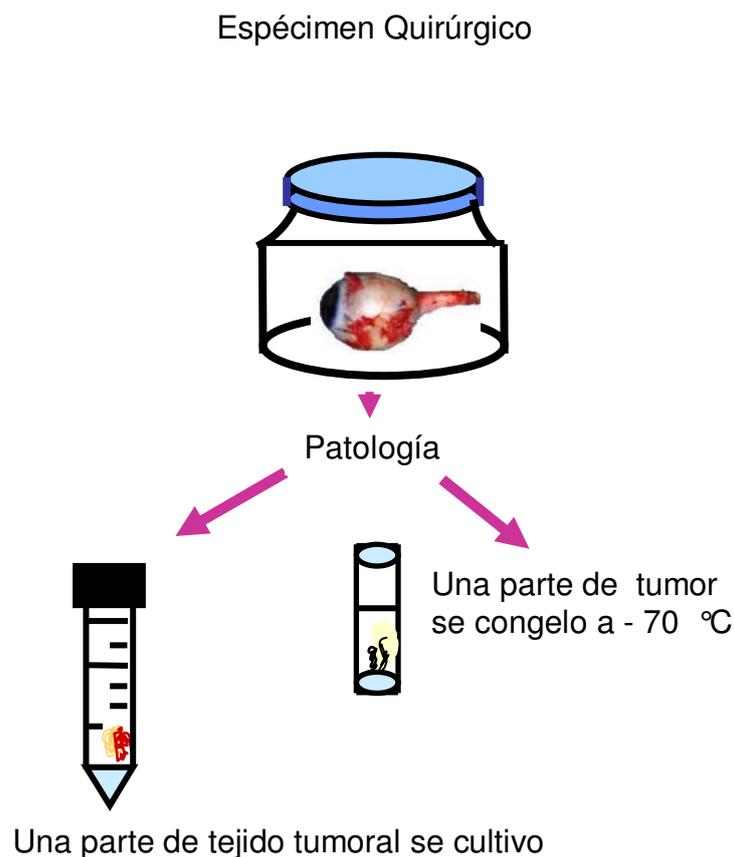


Figura 4. Obtención y manejo de la muestra biológica antes de la extracción de DNA.

5.2 Extracción de DNA de tejido tumoral.

A partir de los tumores congelados, se utilizó un método de extracción no orgánico, basado en proteólisis con proteínasa K y lisis alcalina suave, seguido de una precipitación por saturación de sal y etanol absoluto (Figura 5). Se descongelaron las muestras y se resuspendió el tejido tumoral con 3 ml de amortiguador Tris HCl 10 mM, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, añadiendo SDS a una concentración final del 2.5%; agregamos Proteínasa K a una concentración final de 20 mg/ml y dejamos incubando toda la noche a 37 °C. Continuando la extracción agregamos 1 ml de agente precipitante y mezclamos invirtiendo el tubo; separamos el material precipitado centrifugando a 2000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, recuperamos el sobrenadante en un tubo nuevo y precipitamos el DNA agregando dos volúmenes de etanol absoluto, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente; decantamos y la pastilla se lava con 5 ml de etanol al 75%, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, decantamos y dejamos secar brevemente la pastilla y la solubilizamos en 200 μ l de amortiguador Tris 10 Mm, EDTA 1 mM. Una alícuota se separo para hacer un análisis espectrofotométrico de absorbancia, y otra alícuota para un análisis electroforético en gel de agarosa.

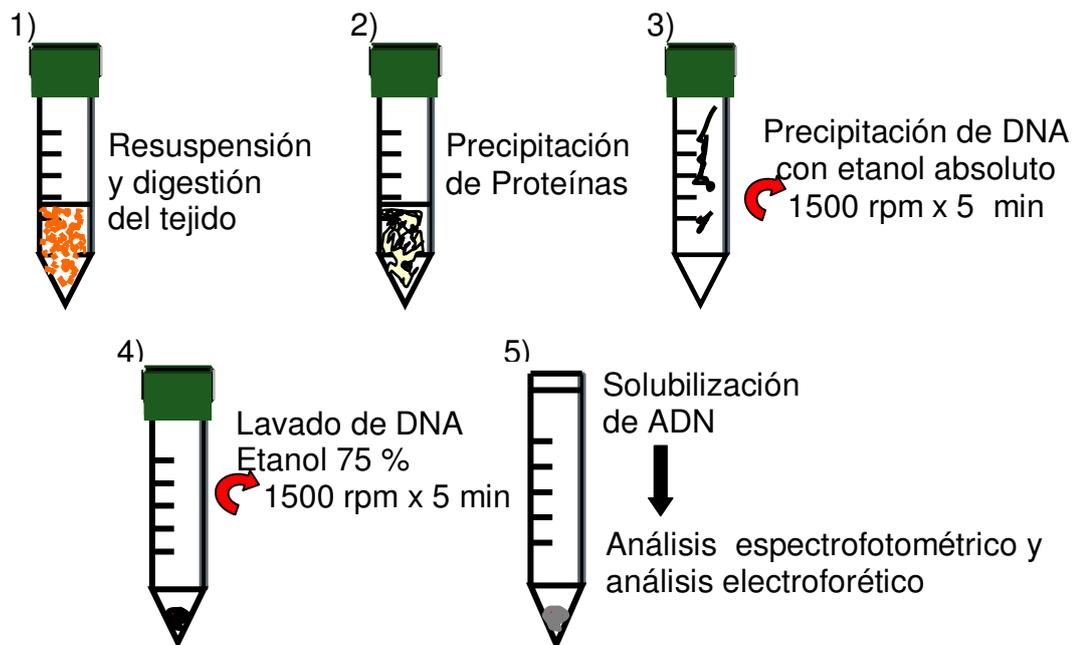


Figura 5. Extracción de DNA a partir de tejido congelado.

5.3 Análisis espectrofotométrico del DNA.

Se preparo una dilución 1:250 del DNA solubilizado, la muestra se leyó a una longitud de onda 260 y de 280 nm y se determino la concentración de DNA en microgramos por mililitro, en base a la siguiente fórmula:

$$\frac{(A_{260}) (\text{Factor de dilución})}{20} = \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

20

5.4 Análisis electroforético de las muestras de DNA.

Una alícuota de cada muestra de DNA se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1%, a 60 V y los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio. Se registraron las imágenes con un sistema de fotodocumentación digital.

5.5 Amplificación con iniciadores para Betaglobina, PCO4 y GH20

Para verificar la presencia de DNA adecuado para amplificar por PCR blancos virales de HPV y discriminar aquellas muestras falsas negativas, primeramente se llevaron a cabo reacciones con los iniciadores PCO4 y GH20 para amplificar una región del gene Betaglobina, que es considerado un gene de mantenimiento doméstico (Bauer, 1991; Evans, 2005).

Se usaron dos mezclas maestras por separado, la mezcla maestra I (MMI) de desoxinucleótidos (dNTP'S 200µM), 1mM de cada uno de los iniciadores (oligonucleótidos) específicos, 2 a 2.5mM de iones de MgCl₂ y H₂O mq; la mezcla maestra II (MMII) con DNA de tejido tumoral a una concentración de 500 ng, 0.2 U de Taq polimerasa y solución amortiguadora de reacción (Buffer 1x), se combinaron ambas mezclas teniendo un volumen final de 25 µl de reacción de PCR. Estas condiciones fueron las mismas para los tres pares de iniciadores que se utilizaron en este trabajo. Únicamente las condiciones de amplificación para cada par de iniciadores fueron diferentes.

* El volumen de DNA genómico dependió de la concentración del stock y en algunos casos se realizaron alícuotas de 100 ng/ µl.

Las condiciones de amplificación para los iniciadores de betaglobina que se emplearon fueron las siguientes:

Desnaturalización	
94 °C	2.30 minutos
40 ciclos	
94 °C	40 segundos
55 °C	2 minutos
72 °C	1.30 minutos
Polimerización final.	
72 °C	7 minutos
En espera 4 °C	
Tamaño del producto amplificado: 268 pares de bases (pb)	

5.6 Amplificación con iniciadores de Manos MY09 y MY11

Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes

Desnaturalización	
94 °C	2.30 minutos
40 ciclos	
94 °C	40 segundos
55 °C	2 minutos
72 °C	1.30 minutos
Polimerización final.	
72 °C	7 minutos
En espera 4 °C	
Producto amplificado 450 pb	

5.7 Amplificación con iniciadores GP5+ y GP6+

Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes:

Desnaturalización	
94 °C	2.30 minutos
40 ciclos	
94 °C	50 segundos
40 °C	1.15 minutos
72 °C	45 segundos
Polimerización final.	
72 °C	10 minutos
En espera 4 °C	
Producto amplificado: 150 pb	

5.8 Amplificación con iniciadores LC1 y LC2

Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes:

Desnaturalización	
94 °C	2.30 minutos
40 ciclos	
94 °C	40 segundos
48 °C	45 segundos
72 °C	45 segundos
Polimerización final.	
72 °C	7 minutos
En espera 4 °C	
Producto amplificado: 244 pb	

Iniciadores específicos	Secuencias	Producto amplificado
Betaglogina (PC04,GH20)	PC04 5' caa ctt cat cca cgt tca cc 3'	268 pb
	GH20 5' gaa gag cca agg aca ggt ac 3'	
Manos (MY09, MY11)	MY09 5'cgt ccm arr gga wac tga tc 3´	450 pb
	MY11 5'gcm cag ggw cat aay aat gg 3	

GP'S (GP5+, GP6+)	GP5+ 5' ttt gtt act gtg gta gat acy ac 3' GP6+ 5' gaa aaa taa act gta aat cat aytc 3'	150 pb
LC'S (LC1 y LC2)	L1C1 5' cgt aaa cgt ktw ccm tat ttt ttt 3' L2C2 5' yac ccy aaa tac tct rta ttg 3'	244 pb

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de DNA de hpv por PCR.

5.9 Para identificar el tipo de virus de papiloma humano identificado en un subgrupo de tumores, fue necesario clonar el fragmento amplificado para secuenciarlos.

A continuación se explica la estrategia general empleada para clonar los fragmentos amplificados por PCR.

a) Purificación del fragmento de DNA amplificado.

Se empleó el Kit QIAEX II de QIAGEN, que se basa en el empleo de partículas de sílica en gel en la presencia de sal en alta concentración, para unir DNA y purificarlo a partir de geles de agarosa.

Primeramente se corto la banda de interés, se pesó y se agregó el equivalente a tres volúmenes del buffer QX1 que solubiliza la agarosa, se añadió 10 µl de resina (partículas de sílica), y se incubo a 50°C por 10 min, resuspendimos la muestra cada 2 min. Centrifugamos 13 000 rpm por 30 seg y desechamos el sobrenadante. Lavamos la muestra por tres ocasiones, agregando buffer PE. Después del tercer lavado, dejamos secar la pastilla entre 10 y 15 minutos a temperatura ambiente. Eluyimos el DNA agregando 15 µl de buffer Low TE (1mM TrisHCl pH7, 0.05mM EDTA), centrifugando por 30 seg. Recuperamos el sobrenadante que contiene el DNA y se tomaron 2 µl de muestra para su análisis y cuantificación en un gel de agarosa, empleando marcadores de masa molecular.

b) Los fragmentos recuperados se clonaron en el vector pGEM, usando el Kit pGEM® - T Easy Vector de Promega, medio de selección LB con ampicilina 25 µg/ ml, y células competentes DH5α.

Con los fragmentos amplificados y recuperados de los geles de agarosa, se prepararon reacciones de ligación para cada muestra a clonar, usando:

5 μ l Buffer de ligación rápida 2x, T4 DNA ligasa, agregamos 1 μ l del vector pGEM easy vector (50 ng), adicionamos 3 μ l de producto de PCR (DNA purificado que fue positivo a Manos), y agregamos 1 μ l de enzima ligasa; dejamos incubar 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente para propagar el fragmento ligado al vector, utilizamos 2 μ l de la reacción de ligación para transformar células competentes DH5 α , usando el siguiente protocolo.

c) Protocolo de transformación.

Incubamos 50 μ l de células competentes DH5 α , con 2 μ l de la reacción de ligación por 20 min en hielo. Se sometieron a un choque térmico a 42 °C por 45 seg. y se pasaron a hielo por 2 min, agregamos 950 μ l de medio LB y se incubaron 1.5 horas con agitación a 150 rpm a 37° C. Se centrifugo a 3300 rpm por 10 min, decantamos y resuspendimos la pastilla en 300 μ l de medio LB. Se inoculan 50 y 100 μ l en medio selectivo con ampicilina por una noche a 37° C. Se analizaron las colonias recombinante con minipreparaciones de DNA.

d) Minipreparaciones de DNA.

Se inocularon 2 ml de medio LB líquido con antibióticos, con una colonia individual, dejamos incubar toda la noche con agitación a 37° C. Centrifugamos las bacterias y la pastilla se resuspendió con 200 μ l de 50mM Tris pH7.5, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ ml de RNAsa. Añadimos 200 μ l de 0.2 M NaOH, 1% SDS y 200 μ l de 1.3 M Acetato de Potasio pH 5.2 Invertimos el tubo lentamente y centrifugamos a 14000 rpm durante 15 minutos, recuperamos el sobrenadante y precipitamos con 500 μ l de isopropanol, centrifugamos y decantamos, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol 75%, dejamos secar y el DNA se solubiliza en 40 μ l de 1mM Tris HCl pH 7, 0.05mM EDTA.

e) Digestión Enzimatica con EcoR1.

Con el DNA obtenido se realizó una digestión enzimática que comprobó que el vector tenia el fragmento de interés; realizamos dos digestiones enzimáticas por muestra una con enzima EcoR1 y otra sin enzima, ambas con solución amortiguadora de reacción (Buffer 10x), H₂O y DNA de las minipreparaciones. Las dos muestras se corrieron en geles de agarosa con marcadores de peso molecular.

RESULTADOS

6.1 Se procesaron 102 muestras de Retinoblastomas primarios congelados, de acuerdo al protocolo de extracción mencionado en material y métodos, a continuación se muestra el análisis espectrofotométrico del DNA obtenido.

6.2 Se determinó la concentración y la calidad de cada muestra de DNA por criterios espectrofotométricos y electroforéticos. Las muestras se dividieron en 3 grupos para su procesamiento, grupo I, grupo II y grupo III. Las lecturas se llevaron a cabo empleando una dilución de 1:250 usando un espectrofotómetro Jenway modelo Genova.

Cuadro 1. Lecturas de absorbancia y concentración de las muestras del Grupo I.

# Muestra	Λ 260 nm	Λ 280 nm	Λ 260 nm/ Λ 280 nm	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1	0.171	0.1	1.7	1.76
2	0.02	0.012	1.6	0.4
3	0.037	0.025	1.48	0.74
4	0.09	0.052	1.75	1.82
5	0.188	0.108	1.7	3.7
6	0.081	0.051	1.7	1.76
7	0.027	0.015	1.8	0.54
8	0.135	0.076	1.7	2.7
9	0.076	0.048	1.5	1.52
10	0.154	0.092	1.6	3.08
11	0.234	0.135	1.7	4.58
12	0.11	0.064	1.7	2.2
13	0.134	0.077	1.7	2.68
14	0.001	0.005	2	0.1
15	0.126	0.077	1.5	1.51
16	0.08	0.049	1.5	1
17	0.046	0.025	1.6	1.15
18	0.032	0.021	1.8	0.925
19	0.008	0.005	1.6	0.2
20	0.042	0.023	1.6	1.05

21	0.059	0.036	1.6	1.47
22	0.062	0.038	1.6	1.5
23	0.148	0.094	1.5	3.7
24	0.103	0.063	1.6	2.5
25	0.084	0.052	1.6	2.1
26	0.049	0.052	2.1	1.3
27	0.052	0.023	2.4	1.4
28	0.028	0.021	3.1	0.9
29	0.064	0.009	2	1.8
30	0.06	0.031	1.9	1.7
31	0.029	0.031	2.9	0.9
32	0.087	0.01	2	2.3
33	0.065	0.043	2.2	1.8
34	0.065	0.029	1.4	0.9
35	0.106	0.046	1.4	1.8
36	0.061	0.071	1.3	0.9
37	0.103	0.068	1.5	1.4
38	0.085	0.051	1.65	2.1
39	0.062	0.037	1.66	1.5
40	0.103	0.062	1.66	2.5
41	0.072	0.042	1.69	1.8
42	0.022	0.012	1.79	0.5
43	0.018	0.011	1.61	0.45
44	0.076	0.045	1.7	1.9
45	0.147	0.095	1.55	3.6
46	0.117	0.07	1.66	2.9
47	0.098	0.058	1.68	2.4
48	0.066	0.038	1.72	1.6
49	0.112	0.066	1.69	2.8
50	0.013	0.006	2	0.3
51	0.03	0.018	1.72	0.75
52	0.016	0.011	1.52	0.4
53	0.031	0.018	1.7	0.7
54	0.052	0.033	1.58	1.3
55	0.05	0.03	1.65	1.2
56	0.079	0.048	1.64	1.9
57	0.083	0.049	1.72	2

Cuadro 2. Lecturas de absorbancia y concentración de las muestras del Grupo II.

# Muestra	Λ 260 nm	Λ 280 nm	Λ 260 nm/ λ 280 nm	Concentración ng/ μ l
1	0.032	0.01	3.2	0.4
2	.0.147	0.08	1.8	1.8
3	0.099	0.054	1.8	1.2
4	0.077	0.039	1.9	0.9
5	0.171	0.096	1.7	2.1
6	0.165	0.095	1.7	2
7	0.11	0.066	1.6	1.3
8	0.183	0.096	1.9	2.2
9	0.061	0.028	2.1	0.7
10	0.035	0.013	2.6	0.4
11	0.114	0.058	1.9	1.4
12	0.047	0.019	2.4	0.58
13	0.039	0.017	2.2	0.48
14	0.061	0.03	2	0.7
15	0.272	0.149	1.8	3.4
16	0.132	0.068	1.9	1.6
17	0.115	0.06	1.9	1.4
18	0.068	0.036	1.8	0.8
19	0.113	0.058	1.9	1.4
20	0.116	0.067	1.7	1.4
21	0.078	0.043	1.8	0.9
22	0.136	0.073	1.8	1.7
23	0.087	0.045	1.9	1
24	0.029	0.011	2.6	0.3
25	0.055	0.024	2.2	0.68
26	0.068	0.034	1.9	0.8
27	0.078	0.043	1.8	0.9

Cuadro 3. Lecturas de absorbancia y concentración de las muestras del Grupo III.

# Muestra	Λ 260 nm	Λ 280 nm	Λ 260 nm/ Λ 280 nm	Concentración ng/ μ l
1	0.338	0.198	1.71	4.2
2	0.248	0.152	1.64	3.1
3	0.122	0.072	1.7	1.5
4	0.22	0.152	1.4	2.7
5	0.007	0.004	2	0.08
6	0.243	0.146	1.6	3
7	0.79	0.053	1.48	1.2
8	0.074	0.044	1.7	0.9
9	0.203	0.119	1.7	2.5
10	0.167	0.095	1.7	2
11	0.478	0.267	1.7	5
12	0.467	0.279	1.6	8
13	0.008	0.002	4.7	0.1
14	0.48	0.272	1.7	6
15	0.215	0.146	1.47	2.6
16	0.369	0.208	1.7	4.6
17	0.199	0.112	1.7	2.4
18	0.047	0.025	1.8	0.58
19	0.378	0.226	1.67	4.7

Análisis electroforético del DNA. Una vez solubilizado el DNA, se tomaron 4 μ l de cada muestra para someterlas a electroforesis en geles de agarosa.

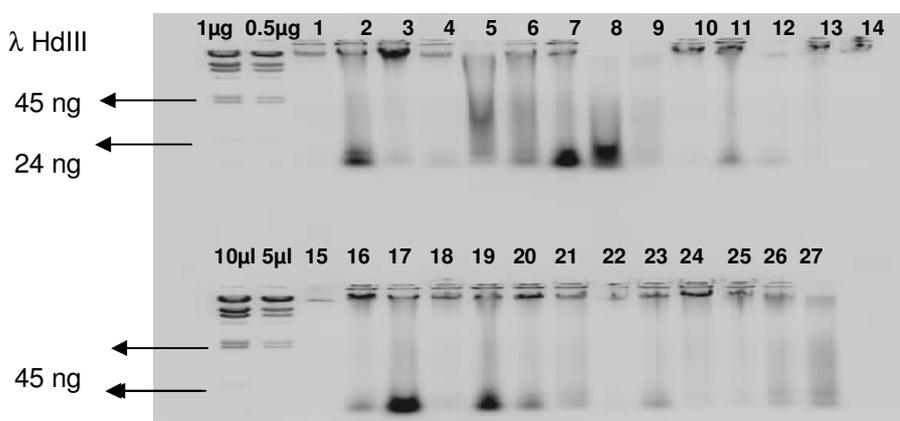


Figura 6: Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, las flechas indican la masa en ng de la quinta banda obtenida por digestión del genoma del virus λ con la enzima Hd III y empleada como marcador de masa.

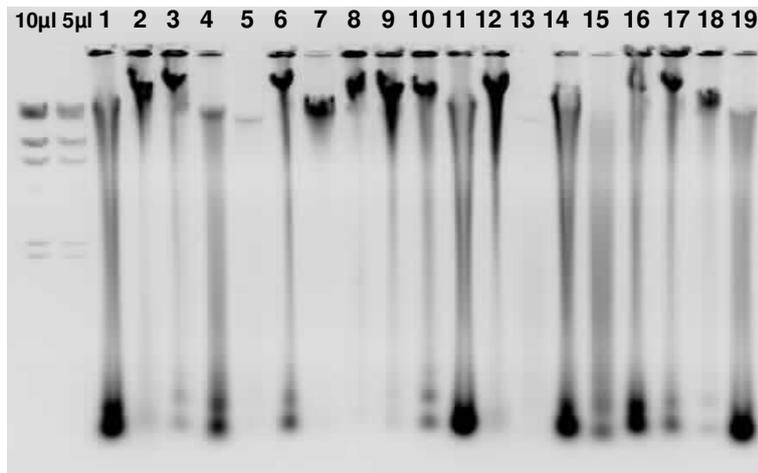


Figura 7: Muestras de DNA genómico extraídos del grupo III de los retinoblastomas primarios estudiados. El barrido observado corresponde a RNA co-purificado con el DNA, las muestras fueron posteriormente tratadas con RNAsa.

6.3 Reacción en cadena de la polimerasa utilizando los iniciadores de Betaglobina PCO4 y GH20, Manos MY09 y MY11, GP5+ y GP6+ y LC1, LC2.

Para determinar si las muestras de DNA son amplificables enzimáticamente, se llevó a cabo la reacción de PCR para amplificar un fragmento del gene de Betaglobina de 268 pb empleando los iniciadores PCO4 y GH20. Para detectar el DNA del virus de papiloma humano se emplearon los iniciadores de Manos MY09 y MY11, GP5+ y GP6+ y LC1, LC2 como se indica en la figura 8.

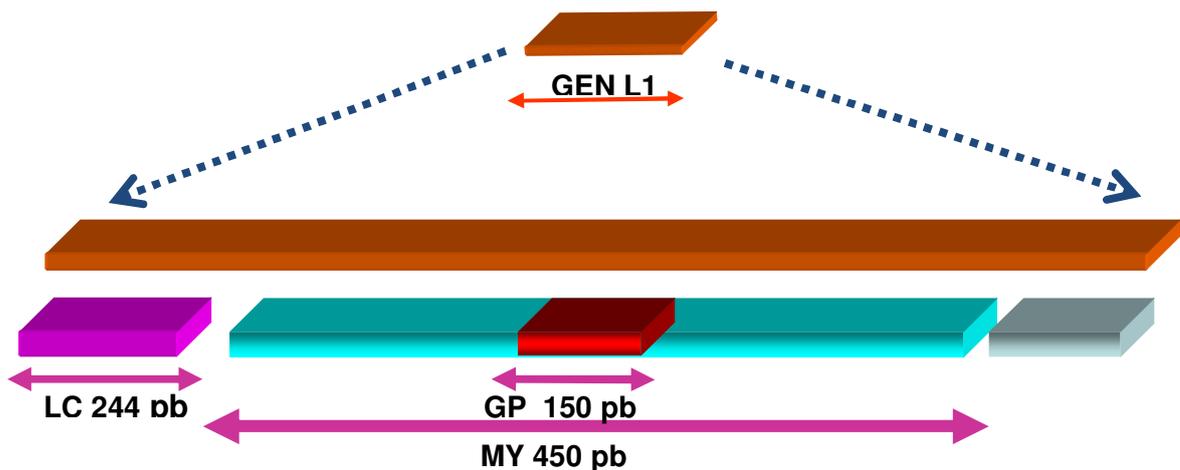


Figura 8. Esquema de la localización de los tres pares de iniciadores utilizados para amplificar la región del gen L1 altamente conservada del genoma de hpv, los iniciadores MY, los iniciadores GP y los iniciadores LC.

Detección de DNA del virus del papiloma humano por PCR, en las muestras de retinoblastomas primarios congelados del **grupo I**.

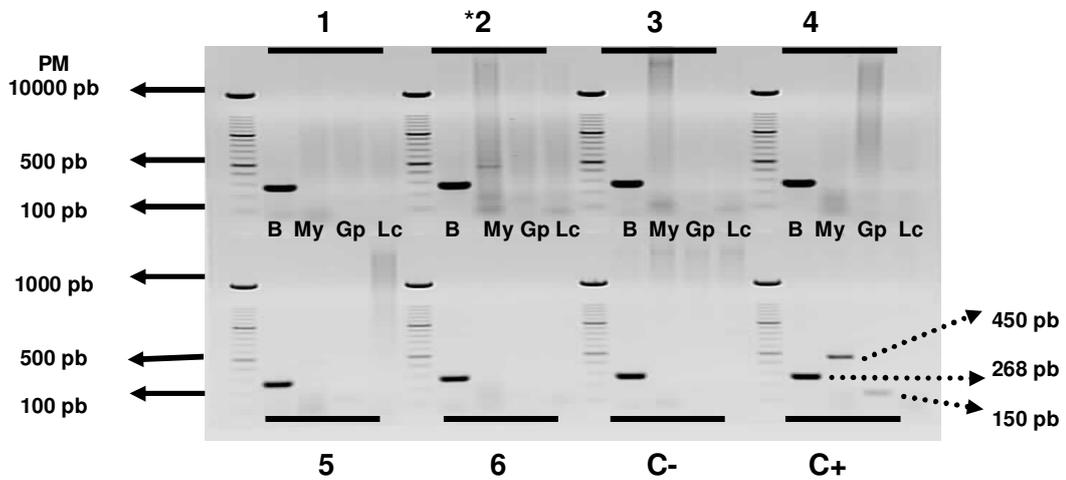


Figura 9: Ejemplos de productos de amplificación. β = Betaglobina, My = fragmento Manos, Gp = fragmento GP, y Lc = fragmento LC, como control negativo (C-) se utilizó DNA de leucocitos y como control positivo (C+) DNA de células Hela. La muestra 2 marcada con * es considerada positiva por amplificar un fragmento de 450 pb que correspondiente al de Manos.

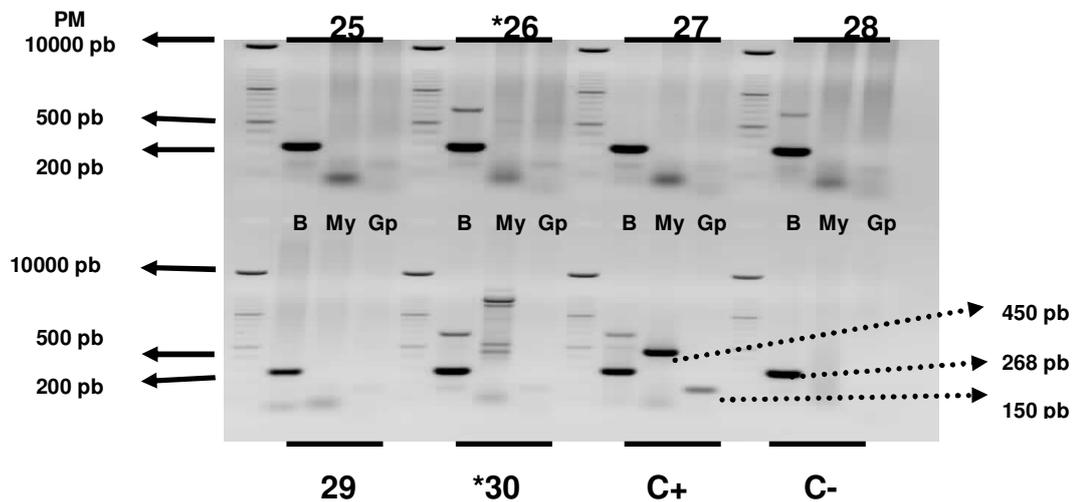


Figura 10. Productos de amplificación en donde las muestras * 26 y * 30 son positivas. Como parte de una estrategia para probar la posibilidad del acarreo de reactivos entre los tubos, durante la preparación de las muestras, se invirtió el orden de los controles, Las flechas punteadas señalan los fragmentos amplificados de los controles.

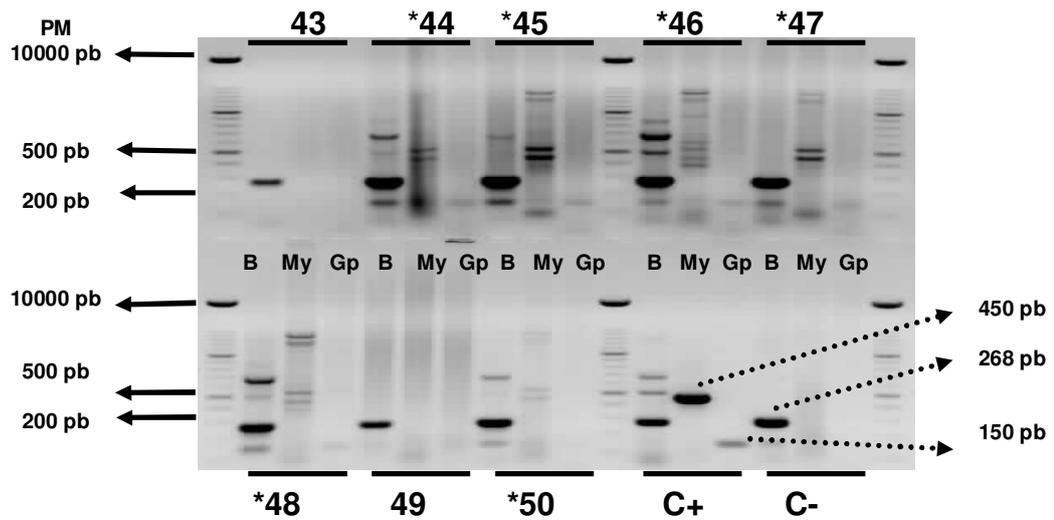


Figura 11. Muestras *44, *45, *46, *47, *48 y *50 son positivas.

Detección de DNA del virus del papiloma humano por PCR, en las muestras de retinoblastomas primarios congelados del **grupo II**.

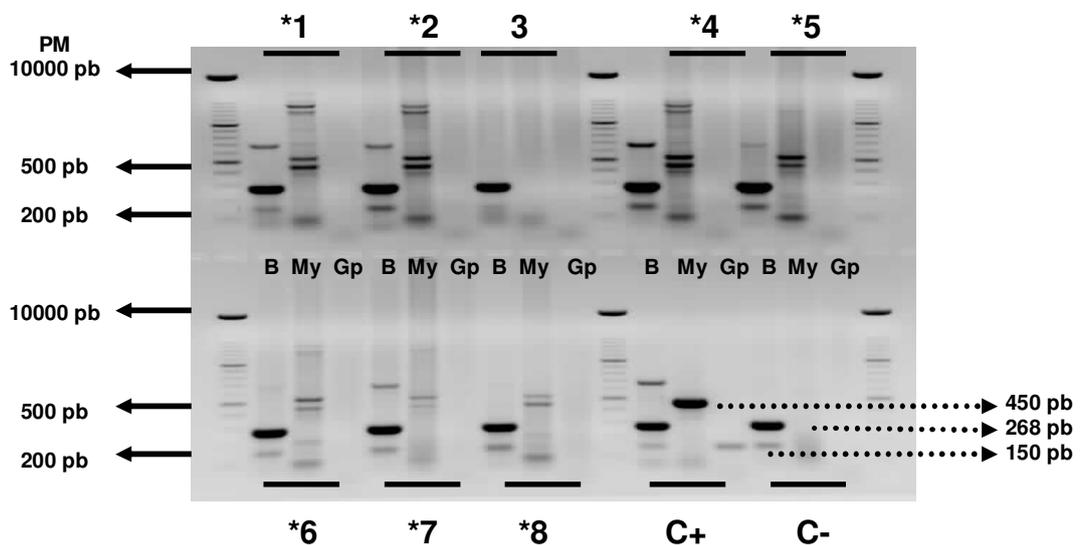


Figura 12. Ejemplos de los productos de amplificación. Las muestras marcadas con * son positivas.

Detección de DNA del virus del papiloma humano por PCR, en las muestras de retinoblastomas primarios congelados **del grupo III**.

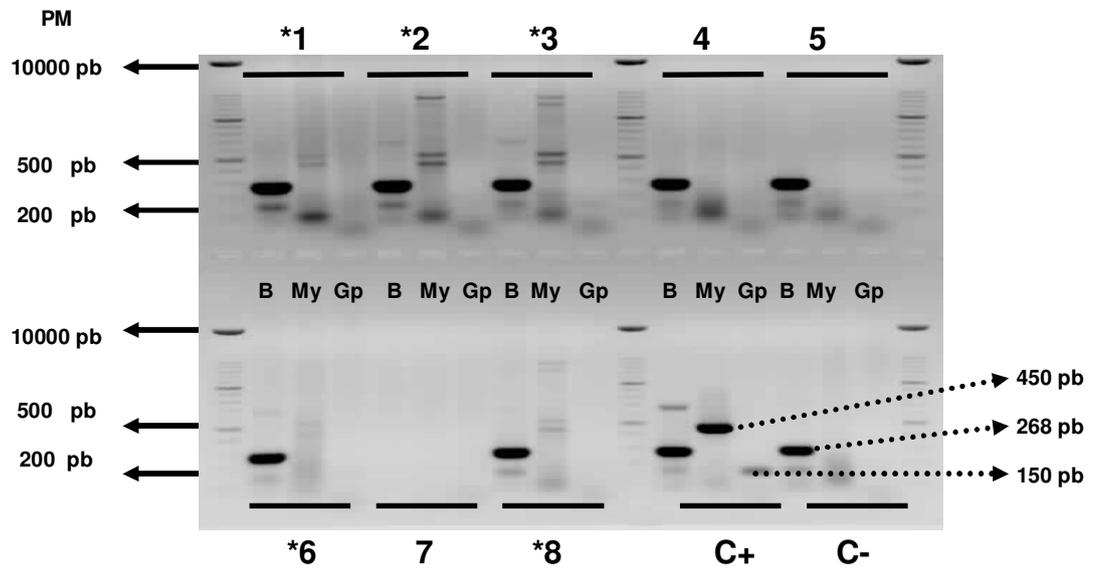


Figura 13. Ejemplos de los productos de amplificación de este grupo. La muestra 7 se considera no informativa por no amplificar Beta globina.

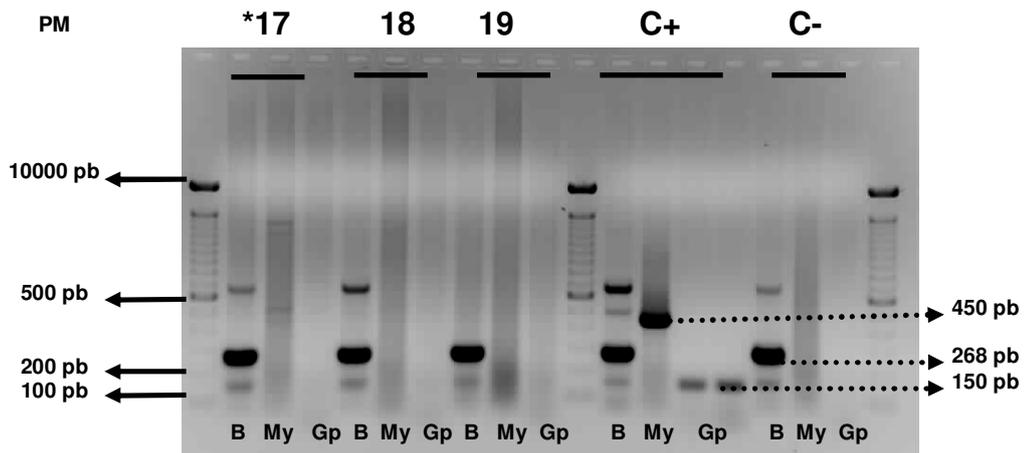


Figura 14. Productos de PCR de las muestras 17- 19, donde la muestra 17 es positiva a Manos, como C+ se utilizo DNA de Hela y C- DNA de placenta humana I. Las flechas punteadas señalan los productos amplificados.

Con la finalidad de probar las muestras en las que no se obtuvieron productos de amplificación viral, se decidió utilizar un nuevo par de iniciadores LC1 y LC2 y GPs.

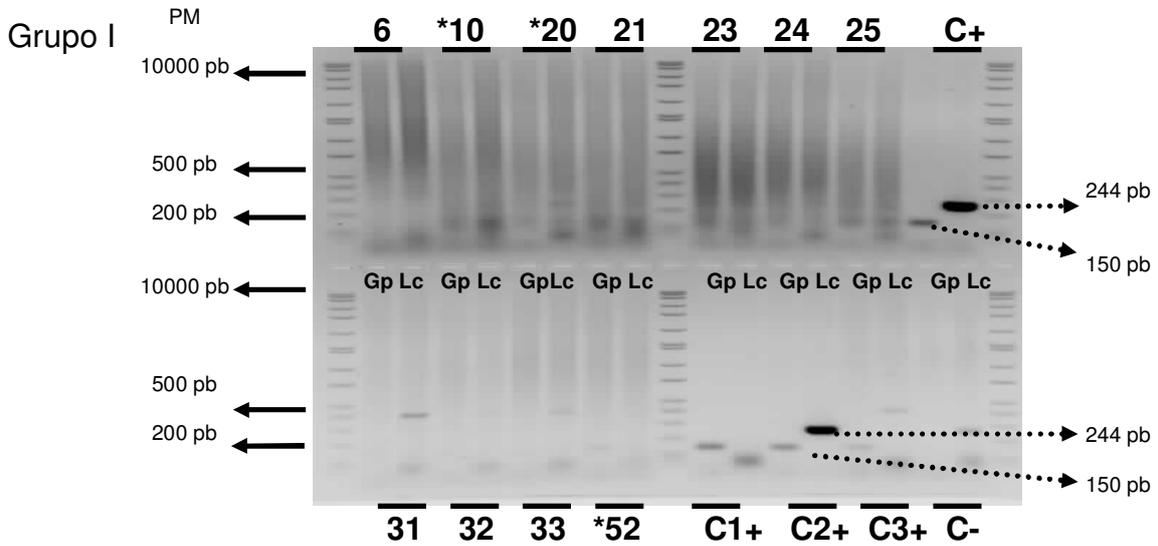


Figura 15. Productos de amplificación empleando nuevo grupo de iniciadores LC y GPs de las muestras del grupo I en donde no fue posible detectar productos de origen viral. Las muestras *10 y *52 son positivas por presentar la banda correspondiente a los iniciadores GPs, la muestra *20 es positiva por presentar la banda correspondiente a los iniciadores LCs.

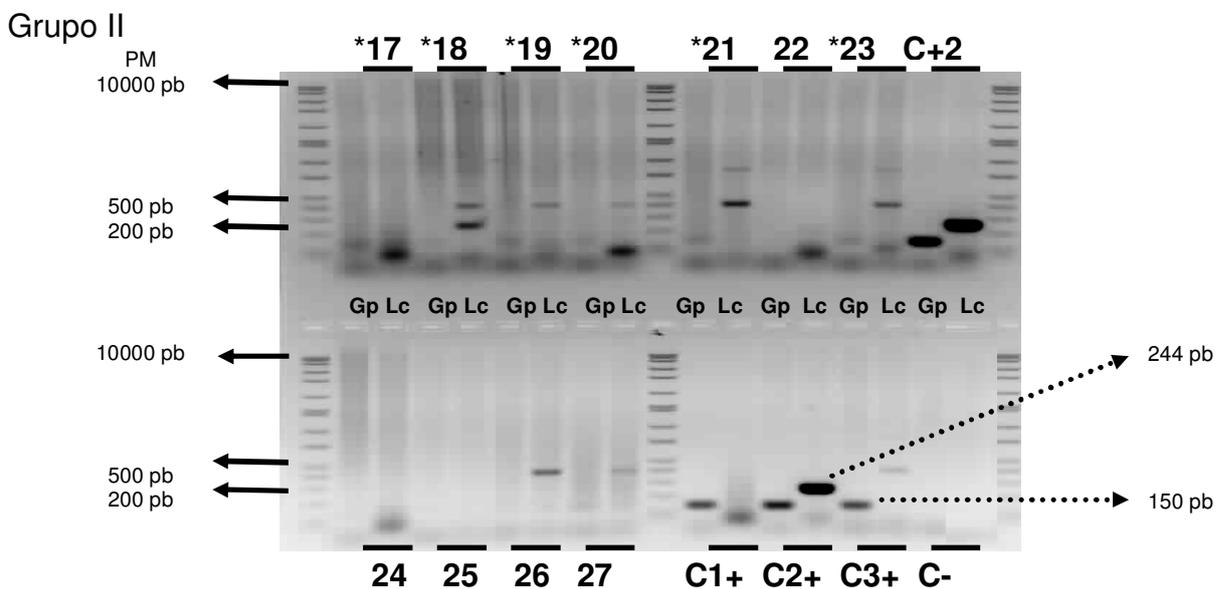


Figura 16. Productos de amplificación empleando nuevo grupo de iniciadores LC y GPs de las muestras del grupo II en donde no fue posible detectar productos de origen viral. Las muestras *17, *19, *20, *21, *23 y *27 son positivas con los iniciadores GPs y solamente la muestra *18 es positiva con los iniciadores LC.

El grupo II con 27 muestras de las cuales el 70 % (19 muestras) fueron positivas a status HPV, el 29 % (8 muestras) fueron negativas y el grupo III con 19 muestras de las cuales el 69 % (13 muestras) fueron positivas por PCR a status HPV, el 26 % (5 muestras) fueron negativas y un 5% (1 muestra) no es informativa. En total se procesaron 102 muestras de las cuales 65 % son positivas por PCR a status HPV, 30% son negativas a HPV y el 4.8 % no son informativas.

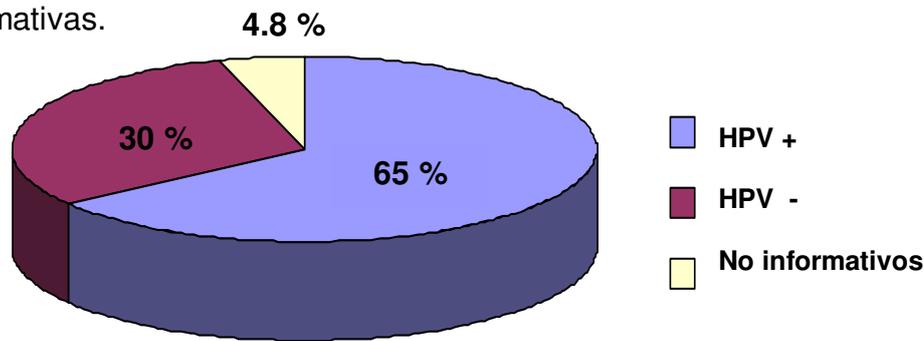


Figura 18. Distribución total de las muestras de retinoblastomas primarios congelados, en la detección de DNA del virus del papiloma humano por PCR.

6.5 Clonación de 7 fragmentos amplificados con iniciadores de Manos.

Para identificar el tipo de virus de papiloma humano al que pertenece el DNA amplificado con los iniciadores de Manos de 7 muestras, se clonaron molecularmente, y se secuenciaron.

- a) Como estrategia empleada se cortó la banda de 450 pb del producto amplificado por los iniciadores de Manos en la PCR empleando el Kit QIAEX II de QIAGEN para la extracción y purificación de DNA a partir de geles de agarosa.

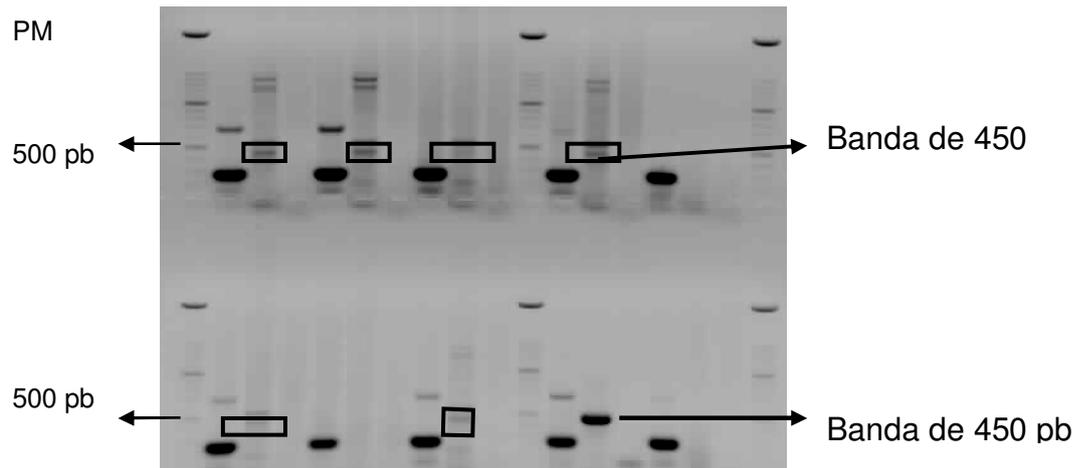


Figura 19. Los rectángulos indican las bandas del producto amplificado de aproximadamente 450 pb con los iniciador de Manos, extraídas del gel de agarosa empleando el kit QIAEXII.

- b) Los productos recuperados del gel se ligaron al vector pGEM, y se introdujeron en células competentes *E.coli* DH5α en medio de selección LB con antibiótico (ampicilina 25 µg/ ml).
- c) Se obtuvieron colonias de bacterias que incorporaron el vector y se purificó DNA del plásmido recombinante correspondiente.
- d) Se obtuvieron minipreparaciones de DNA, comprobando la integridad y cantidad de los plásmidos en un análisis electroforético.



Figura 20. DNA plasmídico, probablemente superembobinado a partir de minipreparaciones de colonias recombinantes.

e) Digestión Enzimática con EcoR1 de DNA plasmídico. Los fragmentos clonados están flanqueados por dos sitios EcoRI únicos, por lo que se empleó esta enzima para liberar el inserto clonado contenido en el plásmido.

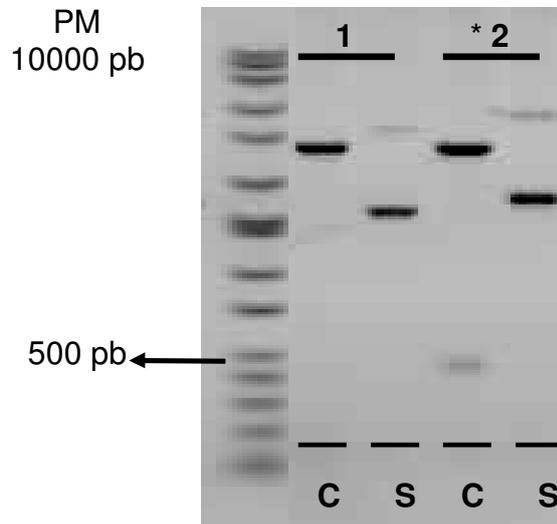


Figura 21: Digestión enzimática de dos plásmidos con EcoR1. **C** = con enzima y **S** = sin enzima. La digestión del plásmido * 2 liberó un fragmento del tamaño esperado, aproximadamente 450 pb.

Los fragmentos de DNA de origen viral amplificados y clonados se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Empleando el texto de las secuencias obtenidas, se identificaron los sitios de reconocimiento de la enzima EcoRI que flanquean los insertos clonados. Las secuencias centrales entre los dos sitios EcoRI (Figura 22) se analizaron usando el programa BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi>), para comparar la similitud de esta secuencias contra las secuencias de hpv.

>p16a_T7 (F74)

CAATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCGT
 CCCAAAGGAAACTGATCTGACCCAAGCAGAAGACATTGCTGGGTGGGTTGGATGGGATG
 AAATTGTGGAAGGTCTCATAAGGGTAAGAATGAGACTCGGTATACTAGCTTGCTATGGCT
 GTTGTAAAAATTGCCATTA ACTCAGTGGCTTAAAACAACAAAAGTTGATTACCTTAAACTT
 CTGGAAGTCAGAAGGTAGAAATGAGTCTCACTGGGCTAAGATCAAGGTGTTGGCCAGAC
 GGTGTTCTTTCTGGAGACTGTAGGTGAGAACCATTTTCTGATCTTTTCCAGCTTTTTAGA
 GGCTGCCCTTATTCTTGGCTCACGACCCTCTTCCAGCTTCAAACCAGCAAGGGCTGGT

TGAGTCTTCTTTACATCCCTATACTATCACACTTTCTTCTGCCTCCCTCTTTCACITTTAAA
 GACCATTGTTATGTCCCTGTGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGAC

Figura 22. Secuencia obtenida de un plásmido representativo, en gris se señalan los sitios EcoRI que flanquean el inserto clonado.

La comparación de estas secuencias mostró similitud con diversos virus de papiloma incluyendo hpv 18 y 58 considerados de alto riesgo pero solamente en pequeños segmentos entre 35 y 50 pb en los flancos de la secuencias, lo cual constituye solo el 5 % del DNA clonado. En la figura 23 estas secuencias corresponden a las barras de color azul.

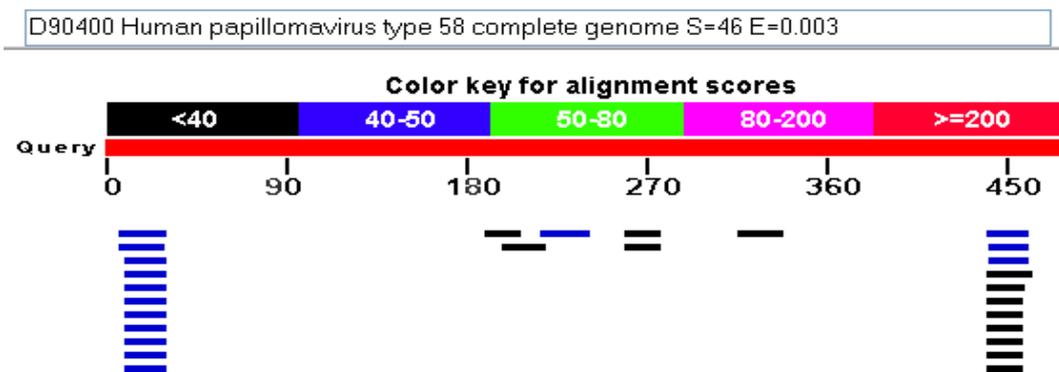
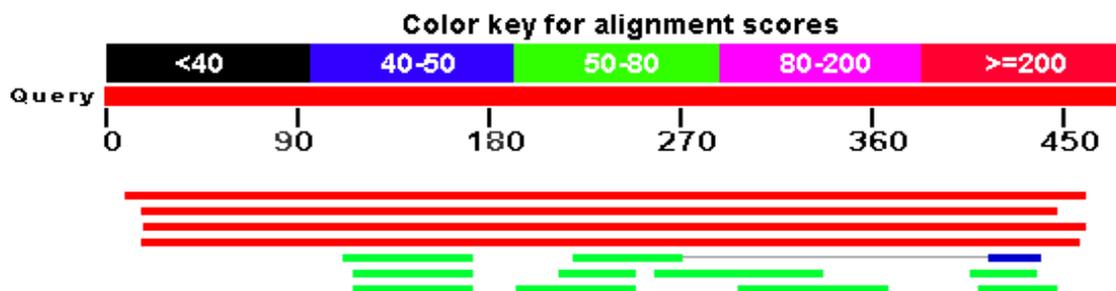


Figura 23. Un análisis más detallado mostró que las secuencias de origen viral que flanquean el fragmento clonado, son secuencias palindrómicas pequeñas.

La comparación posterior de las secuencias internas contra diversas bases de datos reveló que esta región corresponde a DNA humano con una homología del 100%. Esta comparación demostró que la mayoría de las secuencias clonada y secuenciadas corresponde a DNA de origen humano (Figura 25).



En la figura 25 estas secuencias con homología a secuencias humanas corresponden a las barras de color rojo.

Las secuencias humanas identificadas, permitieron ubicarlas dentro del genoma humano completo y se encuentran en los siguientes cromosomas (Figura 26).

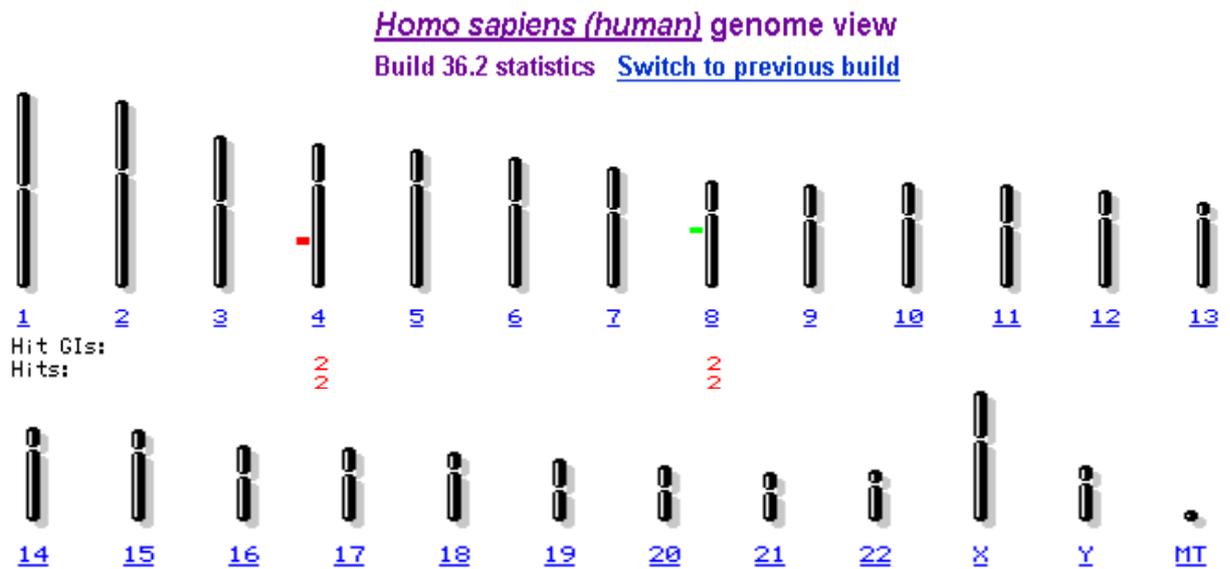


Figura 26.- Las secuencias clonadas y secuenciadas corresponden a DNA de origen humano y se encuentran en los Cromosomas 4 y 8.

7 Discusión de los Resultados

Para la detección del DNA de HPV se utilizan 2 pares de iniciadores los de Manos (My09, My11) y los iniciadores generales (GP5+, GP6+), que amplifican fragmentos de aproximadamente 450 y 150 pb respectivamente, de la región del gen L1. Esta región está altamente conservada en el genoma de HPV, lo que incrementa la identificación de un amplio espectro de genotipos de HPV y por lo tanto permite la determinación del status HPV (Schiffman, 1991; Jacobs, 1995; Kalsen, 1996; Jacobs, 1997; Qu, 1997; Evans 2005; Ortiz, 2006).

El par de iniciadores de Manos (My09, My11) son sintetizados con varios nucleótidos degenerados por cada hebra y por esta razón se incrementa la capacidad de amplificar un amplio rango de tipos de HPV (Manos, 1989).

En nuestros resultados se puede observar que la mayoría de nuestras muestras, amplificaron una banda doble, una de ellas de aproximadamente 450 pb, el mismo tamaño amplificado en nuestro control positivo (DNA Hela), de esta manera se determinaron como positivas, todas aquellas muestras que amplificaron un producto del tamaño esperado, como se observa en cada una de las figuras 9 – 14. En estos mismos geles se observa claramente aquellas muestras que no amplificaron con los iniciadores de Manos por lo tanto las consideramos como muestras HPV negativas.

El uso de un nuevo par de iniciadores LC1 y LC2, permitió la identificación de HPV en algunas muestras de los tres grupos, que no amplificaron productos con los iniciadores de Manos, tal y como se observa en las figuras 15-17.

El porcentaje final de los tumores con retinoblastoma positivos a hpv, es del 65% lo que implica un incremento en comparación con el 36% de casos positivos del estudio piloto que antecede a este trabajo.

Los resultados de la clonación molecular y secuenciación de los productos amplificados con los iniciadores de Manos, inesperadamente muestran que las secuencias amplificadas corresponden principalmente a secuencias genómicas humanas de los cromosomas 3, 4 y 8, flanqueadas por secuencias palindrómicas virales de hpv de alto riesgo 18 o 58. Aunque el número de

fragmentos amplificados es limitado y se planea una estrategia de clonación molecular exhaustiva, es difícil explicar el significado de estos hallazgos. Sin embargo es posible especular que probablemente se trate de sitios de integración del virus en el DNA genómico humano.

Conclusión.

Nuestros resultados demuestran que el método no orgánico de extracción de DNA genómico empleado, permite obtener DNA a partir de tejido congelado de buena calidad y en buena concentración. El DNA obtenido es susceptible de ser amplificado en la gran mayoría de los casos, y fue posible amplificar fragmentos relacionados con HPV en el 65 % de los casos analizados. La clonación molecular de un número limitado de fragmentos amplificados, inesperadamente mostró que no se trata de secuencias virales típicas sino de una fusión de secuencias genómicas humanas correspondientes a locus en los cromosomas 3, 4 y 8 flanqueadas por secuencias virales, probablemente derivadas de los iniciadores de Manos.

Bibliografía.

1. - Aerts I., L. Lumbroso & M. Gauthier (2006) Retinoblastoma Review Orphanet journal of Rare Diseases.1,31. <http://www.ORJD.com/content/1/1/31>
2. - Albert D. M & A. Polans (2003) Ocular Oncology. Ed. MerceL Dekker, New York Basel. USA.pp.47-48, 50-54,129-135.
3. - Arroyo. M. E., J. F. Pérez., L.M. González & S. A. Cuevas (2006). Retinoblastoma en gemelas monocigotas resultado de un evento postcigótico. Rev. Mex. Oftalmol, 80, 41-43.
4. - Bauer H.M., Y. Ting., C.E. Greer., J. C. Chambers., C.J. Tashiro., J. Chimera., A. Reingold & M. M. Manos (1991) Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. JAMA 265:472-477.
5. - Brantley M. A. & W. J Harbour (2001) The Molecular Biology of Retinoblastoma. Ocular immunology and inflammation. 9, 1-8.
- 6.- Brena L. M 1992. Afección a coroides y bilateralidad como factor de riesgo para recaídas en pacientes con Retinoblastoma. Tesis UNAM, IMSS. CMN Hospital de Pediatría. México.pp. 3-5.
7. - Collins A.S., T. Nakahara ., A. Do & P.T. Lambert (2005) Interaction with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. Journal of Virology. 79, 1769-1780.
8. - De Gregory J. (2006) Surprising Dependency for Retinoblastoma Protein in Ras- Mediated Tumorigenesis. Molecular and Cellular Biology. 26, 1165- 1169.

- 9.- De Vita. V.T., S. Hellman & S.A. Rosenberg (2000) Principios y Practica de Oncología Quinta Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. pp: 285, 2084-2085.
10. - Donovan S., B. Schweers., R. Martins., D. Johnson & M.A. Dyer (2006) Compensation by tumour suppressor genes during retinal development in mice and humans. BMC Biology. 4,14. <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/4/14>
11. - Echeverria I., V. Loyola & S. Hernández (2002) La proteína del retinoblastoma en las plantas. Revista de la Sociedad Quimica de Mèxico. 46, 17-22.
12. - Evans M., F. Adamson., S.C. Simmons & C. Kumarasen (2005) Touchdown General Primers (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the service detection of Human Papillomavirus. BMC Clinical Pathology.5,10. <http://www.biomedcentral.com/1471-6890/5/10>
- 13.- Farhardi M., Z. Tahmasebi., S. Merat., F. Kamangar., D. Nasrollahzadeh & R. Malekzadeh (2005) Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of esophagus in a high-risk population. World.J. Gastroenterol.11, 1200- 1203.
14. - Fletcher O., D. Easton., K. Anderson., C.Gilham., M. Jay & J. Peto (2004) Lifetime Risks of Common Cancers among Retinoblastoma Survivors. J. Natl. Cancer Inst. 96, 357-363.
15. - Fojer F & H. Te Riele (2006) Restriction beyond the restriction point: mitogen requirement for G2 passage. Cell Division.1,8. <http://www.celldiv.com/content/1/1/8>
16. - Friend, S., J. Horowitz., W.X. Gerber., E. Bogenmann., F. Li & R. Weinberg, (1987) Deletions of a DNA sequence in retinoblastoma and mesenchymal tumors: organization of the sequences and its encoded

protein. Proceedings of the National Academy of Sciences. 84, 9059-9063.

17. - Jacobs M., A. Roda., A. Van Den., P. Snijders., C. Meijer & M. Walboomers (1995) Group-Specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 901-905.
18. - Jacobs M., P. Snijders., A. Van Den Brule., T. Helmerhorst., C. Meijer & M. Walboomers (1997) General primer GP5+/GP6+-Mediated PCR-Enzyme Immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *Journal of clinical microbiology*. 35, 791-795.
19. - Kalsen F., M. Kalantari., A. Jenkins., E. Pettersen., G. Kristensen., R. Holm., B. Johansson & B. Hagmar (1996) Use of Multiple PCR primers sets for optimal detection of Human Papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 2095-2100.
20. - Klein G. & E. Klein (1985) Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature*, 315.190-195.
21. - Klein G. (1987) The Approaching Era of the Tumor Suppressor Genes. *Science* 238, 1539-1544.
22. - Kleinerham R S., M. Tucker., R. Tarone., D. Abramson., J. Seddon & M. Stovall., F. Li., D. Fraumeni (2005) Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: An Extended follow-up. *Journal of Clinical Oncology*. 23, 2272-2279.
23. - Knudsen E. S. & K. E. Knudsen (2006) Retinoblastoma Tumor Suppressor: Where cancer meets the cell cycle. *Exp. Biol.Med.* 231, 1271-1281.

24. - Knudson. A. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proceedings of the National Academy of Sciences.68, 820-823.
25. - Lodish. B (2002) Biología celular y Molecular. Cuarta Edición Editorial. Medica Panamericana. México. D.F. pp 527 - 528.
- 26.- Lomanto L., O. Ortiz., C. Bretón, A. Gómez & V. Mesa (2003) El ciclo celular. MEDUNAB.6, 21-29.
27. - Manos. M.M., Y. Ting., D.K. Wright., A. J. Lewis & T. R. Broker (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cell, 7, 209-214.
- 28.- Mantela J., Z. Jiang., J. Ylikoski., B. Fritsch., E. Zacksenhaus & U. Pirvola (2005) The retinoblastoma gene pathway regulates the post mitotic state of hair cells of the mouse inner ear. Development. 132, 2377-2388.
- 29.- Martin N., M.D. Coll., J. García., J. Sánchez., E. Triviño., M. Guitart & J. Gil (2001) Retinoblastoma. Annals d' Oftalmología. 9, 74-92.
30. - Menéndez. I., M. Puig & N. Ruisánchez (2002) El retinoblastoma: Paradigma del cáncer hereditario. Rev. Cubana Med; 41, 35-38.
Monaco Anthony P. (1994) Isolation of genes from cloned DNA. Current Opinion in Genetics and Development. 4. 360-365.
31. - Murray.R. K. & D.K. Granner (2001) Bioquímica de Harper. Decimaquinta edición. Editorial Manual Moderno, México, D.F., pp: 915-917.

32. - Nelson Dirdre A., N.A. Krucher. & J.W. Ludlow (1997) High Molecular Weight Protein phosphatase type 1 Dephosphorylates the Retinoblastoma protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 272, 4528-4535.
33. - Orjuela, M., M.V. Ponce., C. Ridaura., D. Abramson., W. Gerald & C. Cordon (2000) Presence of Human Papilloma Virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. *Clin. Cancer Res*. 6, 4010- 4016.
- 34.- Ortiz M., M. Torres., L. Muñoz., E. Fernández., J. Canals., A.I. Carbonero., E. Aguilar., J. Ballesteros., J. del Amo & A. García (2006) Oncogenic Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution and HPV 16 variants in two Spanish population groups with Different Levels of HPV infection Risk. *Journal of Clinical Microbiology*. 44, 1428-1434.
35. - Peralta O., M. Bahena., C.E. Díaz & V. Madrid (1997) Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud pública de México*, 39,451-462.
36. - Pizzo. P.A & D.G. Poplack (2002) *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Fourth Edition. Ed. Lippincott Williams and Wilkings, pp: 825-845.
37. - Qu W., G. Jiang., Y. Cruz., C. J. Chang., Y. F. Ho., R.S. Klein & R. D. Burk (1997) PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primers Systems. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 1304-1310.
38. - Rodríguez M., M. Del Prado & M. Salcedo (2005) Perspectivas en la genómica del retinoblastoma: Implicaciones del gen supresor de tumor RB1. *Revista de Investigación Clínica*. 5, 572-581.

39. - Sage C., M. Huang., M. Vollrath., C.M. Brown., P.W. Hinds., D.P. Corey., D. Vetter D.E & Z. Chen Z (2006) Essential role of retinoblastoma protein in mammalian hair cell development and hearing. PNAS.103, 7345-7350.
40. - Schiffman. M. H., H. M. Bauer., A. T. Lorinz., M. M. Manos., J. C. Byrne., A. G. Glass., D. M. Cadell & P. M. Howley (1991) Comparasion of Southern Blot Hybridization and Polymerasa Chain Reaction methods for the Detection of Human papillomavirus DNA. Journal of Clinical Microbiology, 29.573-577.
41. - Stillers C. & Parkin D (1996) Geographic and ethnic variations in the incident of childhood cancer. British Medical Bulletin, 52, 682- 703.
42. - Ting. Y & M. M. Manos (1990) Detection and typing of genital human papillomaviruses PCR protocols: A guide to methods and applications. Ed. Innis et al. Academic Press, Inc., San Diego CA. USA.pp.356-367
43. - Ureta J., M. Aranga., S. Ohlgisser & G. Barbosa (2005) Retinoblastoma. Rev. Colomb. Cancerol, 9, 60-61.
44. - Vietri M., M. Bianchi., J.W. Ludlow., S. Mittnach & E. Villa (2006) Direct interaction between the catalytic subunit of Protein Phosphatase 1 and pRb. Cancer Cell International. 6.
45. - Weinberg R. A. (1984) Base Molecular del cáncer. Investigación y Ciencia.88. 48-59
46. - Weinberg R. A. (1988) En busca del antioncogén. Investigación y Ciencia. 146. 28-36.

47. - Williams J.P & T. Stewart (2006) The Retinoblastoma Protein is required for Ras- Induced Oncogenic Transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 1170-1182.

48. - Zeynel A. Karcioğlu. (2004) *Orbital Tumors. Diagnosis and Treatment.* Editor. Springer, New Orleans. USA. pp. 41-45.

Glosario

Carcinógenos. Cualquier agente físico, biológico ó químico capaz de producir cáncer cuando las células u organismos se exponen a ellos.

Carcinoma. Tumor maligno derivado de células epiteliales.

Cebador (iniciador, primer, oligonucleótido). Corta secuencia de ácido nucléico que contiene un grupo hidroxilo en el extremo 3', que forma pares de bases con una hebra patrón complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos, con la finalidad de copiar la hebra patrón.

Célula germinativa. Cualquier célula precursora capaz de dar origen a gametos.

Célula Hela. Línea de células epiteliales derivada de un carcinoma humano, que crecen con facilidad en medios de cultivo y contiene entre 20 y 40 copias del Virus de Papiloma Humano 18.

Célula somática. Cualquier célula animal o vegetal diferente de la célula germinativa o sus precursores.

Ciclo celular. Secuencia ordenada de procesos en los cuales una célula duplica sus cromosomas. La mayoría de los ciclos celulares eucariontes se pueden dividir en 4 fases: la fase G1 antes de la síntesis de DNA, la fase S cuando se replica el DNA, fase G2 después de la síntesis de DNA y fase M cuando tiene lugar la mitosis dando origen a dos células hijas.

Alelo. Una de dos o más formas alternativas de un gen localizado en el sitio correspondiente (locus) sobre cromosomas homólogos,

DNA. (Ácido desoxirribonucleico). Largo polímero lineal compuesto por cuatro tipos de nucleótidos de desoxirribosa que contiene la información genética.

El DNA es una hélice doble compuesta por dos hebras antiparalelas unidas por enlaces de hidrógeno entre bases púricas y pirimídicas.

DNA genómico. Todas las secuencias de DNA que componen el genoma de una célula u organismo.

Electroforesis. Cualquiera de varias técnicas para la separación de macromoléculas, basadas en la migración dentro de un gel u otro medio sometido a un fuerte campo eléctrico.

Exón. Segmentos de un gen que llega al citoplasma como parte de una molécula de RNAm, RNAr, o RNAt.

Gen. Unidad física y funcional de la herencia que transporta información de una generación a la próxima.

Gen supresor de tumor. Cualquier gen cuya proteína codificada inhibe en forma directa o indirecta la progresión a través del ciclo celular; y sobre el cual una mutación puede inducir pérdida de su función.

Intrón. Parte de un transcrito primario (o el DNA que lo codifica) que se elimina por empalme durante el procesamiento de RNA y no se incluye en los RNAm, RNAr, RNAt funcionales maduros.

Leucemia. Cáncer de los glóbulos blancos de la sangre y sus precursores.

Maligno. Se refiere a un tumor o células tumorales capaces de invadir el tejido normal circundante o sembrar metástasis, o ambas cosas.

Metástasis. Diseminación de células tumorales desde el sitio de origen, y la formación de zonas de proliferación secundaria.

Mutación. Una modificación hereditaria permanente de la secuencia de nucleótidos de un cromosoma, suele producir un cambio o la pérdida de la función normal del producto genético.

Oncogen. Gen cuyo producto interviene en la transformación de células en un cultivo o en la inducción de cáncer en animales. La mayoría de los oncogenes son formas mutantes de genes normales (protooncogenes) que participan del control de la proliferación o la división de la célula. En contraste con los genes supresores de tumores, la adquisición de una mutación en un oncogen, implica la adquisición de nuevas funciones.

Tumor Benigno. Masa de tejido que contiene células muy semejantes a las normales. Los tumores benignos permanecen delimitados en el tejido que les dio origen.