

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TEMPRANA DEL VPH-18
IN VITRO Y EN RATONES TRANSGÉNICOS:
EL PAPEL DE LAS HORMONAS ESTEROIDES**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIÓL. NÉSTOR GABRIEL MORALES PEZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TEMPRANA DEL VPH-18
IN VITRO Y EN RATONES TRANSGÉNICOS:
EL PAPEL DE LAS HORMONAS ESTEROIDES**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA

BIÓL. NÉSTOR GABRIEL MORALES PEZA

Tutor: Dr. Alejandro García Carrancá

Comité Tutorial: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dr. Vicente Madrid Marina

Jurado para examen de grado:

Presidente: Dra. Carmen Gómez Eichelmann
Vocal: Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Vocal: Dr. Patricio Gariglio Vidal
Vocal: Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Secretario: Dr. Alejandro García Carrancá

El trabajo experimental de esta tesis fue desarrollado principalmente en el laboratorio del Dr. Alejandro García Carrancá del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y en el Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) en Heidelberg, Alemania, bajo la asesoría y supervisión del Dr. Ángel Cid Arregui.

Durante los estudios de posgrado se contó con el apoyo de becas-crédito por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), registros no. 82471 (maestría) y 89917 (doctorado); así como una beca complementaria de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) (doctorado). Sin estos apoyos hubiera sido materialmente imposible cumplir con el desarrollo del proyecto de investigación y el resto de las actividades académicas. También se recibió ayuda del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP), para la adquisición de materiales de consumo y la asistencia a un congreso internacional.

In memoriam

A mi mamá

Mater Admirabilis

Porque lograste lo que otros sólo soñaron.
Fuiste la persona más importante en muchas etapas de mi vida
y mucho de lo que soy, es por ti.
Siempre recordaré tu amabilidad y carácter, el cual
espero haber heredado de ti.
Tú pensabas mucho en mí, ahora, yo pensaré mucho en ti.

*No volverán tus ojos a mirarme
ni tus oídos escucharán mi canto
(...) adiós, para siempre adiós
La barca de oro, dominio público.*

*If you ever find a moment
spare a thought for me
(...) There will never be a day
when I won't think of you
Think of me, Charles Hart*

A Irma:

Si un deseo me fuera cumplido que sea el volver a tener un mismo tiempo y espacio después de esta vida para compartirlo contigo. Porque fue algo maravilloso que entre todo el mundo y en todos los tiempos, hayamos coincidido y haya existido un nosotros, un aquí y un ahora. Pues después de tantos años, te amo más que al principio.

Porque eres mucho más que el dulce ideal que yo soñé, convertido en realidad, y no pude haber tenido mejor compañera que tú, pues eres una mujer verdaderamente excepcional y extraordinaria.

Por tu inmenso apoyo y por todo lo que has soportado a mi lado sin quejarte, gracias. A ti solamente debo explicaciones de lo que hago y lo que no. Gracias también por pensar que yo era el indicado para ti.

Para que tu diario sacrificio no haya sido en vano.
*Vayamos siempre *pari passu*.*

A mi hijo, a quien mucho amo:

Hacer un doctorado es nada comparado con la responsabilidad de ser padre.

Si eres el mejor hijo del mundo que un padre pudo tener, ojalá yo hubiera sido el mejor padre del mundo para ti.

Por favor, sigue enseñándome como siempre lo haces.

Y recuerda que lo importante no es cuantas veces hayas caído, sino cuantas veces te hayas levantado. Sé que lograrás lo que te propongas, pues tienes raíces fuertes.

Es decir, a toda mi familia, que es lo mejor que tengo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro García Carrancá, por haberme invitado a colaborar en su laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas y por todos los buenos y malos momentos que compartimos en este tiempo.

Muy especialmente al Dr. Ángel Cid Arregui, por todo el gran apoyo y la amistad desinteresada que me ha ofrecido y porque el conocerlo fue una de las mejores cosas que me han pasado en la vida.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y al Dr. Vicente Madrid Marina, quienes fueron parte de mi Comité Tutorial. Gracias por ayudarme en los momentos difíciles.

A los Dres. Carmen Gómez Eichelmann, Enrique Pedernera Astegiano, Patricio Gariglio Vidal y Leticia Rocha Zavaleta, quienes integraron el jurado de esta tesis, por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Manuel Ramos Kuri, por ser mi mejor amigo durante toda esta travesía. Si todos los católicos fueran así, el mundo sería diferente.

A la Dra. Marcela Lizano Soberón, por haber sido tan buena amiga siempre.

A mis innumerables compañeros de laboratorio –que no enlisto pues sin duda olvidaría a más de uno– y particularmente a Miriam, quien ha tenido que lidiar con todos nosotros.

A los integrantes del laboratorio de Marco Cerbón: Ana, Adriana y Nacho, por tenderme la mano cuando la necesité.

A la Dra. Cristina Fernández Mejía, por la corta pero productiva estancia en su laboratorio, así como a los demás miembros de su equipo: Gaby, Vicente y Guillermo.

A mis amigos de la Coordinadora de Estudiantes de Posgrado, por ser tan buenos soldados: Ricardo (Dino), Mario, Ale (la Jefa), Mariana (la otra Jefa), Gina, Toño (Astroño), Enrique (Quique), Fernando, Antígona, Oscar, Héctor (Tech), Ricardo (Caldo), Selene, Luis (la Coordi), Clelia (Cle). Porque compartimos un sueño...que no fue. Y porque los sigo queriendo y recuerdo frecuentemente nuestras andanzas.

A Miguel Páez (Mike), por sacarme tantas veces de apuros; a Jesús Ramírez (Chucho), Santiago Martínez, Rafael Camacho, Jesús Chimal, Saúl Cano, Laura Camarena, Sebastián Poggio, Bertha Espinoza, Edgar Kröttsch, Abraham Landa, Emilio Rojas, Julio César Carrero y a mis demás compañeros del Instituto de Investigaciones Biomédicas, y que ahora no recuerdo (perdón), por todos los agradables momentos que compartimos.

Al Dr. Fernando Bastarrachea, por la gran sencillez que lo caracteriza a pesar de ser un gran científico.

Con mucho cariño al Dr. Lino Díaz de León (R.I.P.), porque siempre apoyó a los alumnos del programa de Investigación Biomédica Básica desde su puesto, en vez de ponerles obstáculos, y por la abierta amistad que siempre nos brindó a todos. Un ejemplo a seguir por otros funcionarios. También al personal de la coordinación de enseñanza: Blanca, Lucy y al Sr. Pérez de la Mora, así como a la actual auxiliar del doctorado, Azucena.

Al Dr. Jesús Reynaga antes, durante y después de la adecuación del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por la gran disposición de siempre.

Al Dr. Juan Pedro Laclette, por las difíciles luchas que compartimos, primero como coordinador del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y luego como director del Instituto de Investigaciones Biomédicas. También al Dr. Carlos Larralde por su apoyo cuando fungí como representante de alumnos, así como al Dr. René Drucker Colín.

A la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera, por el gran sentido de responsabilidad que mostró en el cuidado y manejo de los ratones transgénicos.

A la Dra. Blanca Ruiz, por su constante interés en que me titulara.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, y en especial al Lic. Erasto Brito y a Lucy.

A Eva y a Bety, por atender las cuestiones secretariales del departamento de Biología Molecular.

Un reconocimiento al personal administrativo, incluido el de mantenimiento, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por la labor desarrollada día a día y que es casi siempre tan poco apreciada.

A todos mis buenos profesores, que confiaron en mí. No sé que dirían si me vieran ahora.

No puedo ni quiero soslayar la innegable importancia de los animales de laboratorio. Porque dan su vida y son sacrificados, a veces no estoy seguro si por una buena causa, en pro de la ciencia biomédica.

Al pueblo de México, porque estoy consciente de fue quien pagó toda mi educación, y a mi país, que en este año celebra centenarios de cuando su gente se decidió, por fin, a cambiar su destino.

A ti lector, que por alguna razón (la que sea) abriste esta tesis. Espero no desilusionarte y que encuentres lo que buscas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por segunda vez. Porque me doy cuenta que lo más importante que me enseñó fue el espíritu crítico y a buscar y entender lo que no sé –aprender a aprender–. Y esto es invaluable.

No sabes que noticia tan importante es ésta. No tienes idea.
Palabras de mi padre el día en que recibí la aceptación a la UNAM

PRÓLOGO

Desde sus albores la humanidad ha sido obligada por la naturaleza a convivir con factores externos, como enfermedades y virus, e internos, como sus propias hormonas. Aprender a sobrellevarlos ha sido parte de su existencia.

N.M.P.

“No podía ser uno un buen científico sin comprender que, en contraste con la concepción popular sostenida por los periódicos y por las madres de los científicos, buen número de ellos no sólo son obtusos y de mentalidad estrecha, sino que algunos son simplemente estúpidos”.

James D. Watson, *La doble hélice*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
GENERALIDADES	5
El papel de las hormonas sexuales femeninas en CaCU	5
Anticonceptivos hormonales	5
Partos múltiples	6
VIRUS DEL PAPILOMA	7
VPH DE ALTO RIESGO	8
E6 y E7	9
EL VPH TIPO 18 (VPH-18)	10
LA REGIÓN REGULADORA	
DE LA TRANSCRIPCIÓN TEMPRANA EN VPH-18	13
LOS RATONES TRANSGÉNICOS CON LA LCR DEL VPH-18	17
HORMONAS ESTEROIDES Y RETINOIDES	
Y EFECTO EN LA TRANSCRIPCIÓN DEL VPH-18 <i>IN VITRO</i>	18
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
GENERALES	23
PARTICULARES	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
PLÁSMIDOS	24
Construcciones para la expresión de β -galactosidasa	24
Plásmidos de expresión del receptor de glucocorticoides	24
PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES	24
TRANSFORMACIÓN	25
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	25
Minipreparación	25
Maxipreparación	25
Extracción y precipitación de DNA	26
Purificación del DNA en gradientes de cloruro de cesio	26
CULTIVOS CELULARES	26
TRANSFECCIONES	27
Transfección por el método de fosfato de calcio	27
Electroporación	27
COSECHA Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES	27

ENSAYO CON ONPG	28
ENSAYO CAT	28
MUTACIÓN DEL GRE EN LA REGIÓN REGULADORA DEL VPH-18	28
RATONES TRANSGÉNICOS CON LA LCR DEL VPH-18	28
MANEJO Y TRATAMIENTO DE LOS RATONES	29
TAMIZACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS	29
Obtención de DNA a partir de la cola del ratón	29
Desnaturalización del DNA genómico de ratón	30
Transferencia del DNA genómico al papel de nitrocelulosa	30
Prehibridación, hibridación y lavados	30
Marcaje de la sonda de DNA	30
DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL TRANSGÉN	30
<i>NORTHERN BLOT</i>	31
Extracción, purificación y análisis de RNA	31
RESULTADOS	32
PRIMERA PARTE	
EL SISTEMA DE CÉLULAS EN CULTIVO	32
El GRE en la región de control transcripcional del VPH-18	32
La mutación en el GRE eliminó la inducción por parte de dexametasona y resultó en un decremento de la transcripción basal del VPH-18	35
El GR siguió activando aun con 1 sitio AP1 mutado en la región reguladora del VPH-18 y aumentó la respuesta con hbrm	35
ARTÍCULO 1	
A single element mediates glucocorticoid hormone response of HPV18 with no functional interactions with AP1 or hbrm	40
SEGUNDA PARTE	
EL SISTEMA DE RATONES TRANSGÉNICOS	41
Las engañosas secuencias TRE y YY1 en la LCR del VPH-18	42
Plásmidos con la LCR del VPH-16 y con mutaciones en los sitios de unión al factor AP1 dentro de la región reguladora del VPH-18	43
Las pruebas con retinoides en ratones transgénicos con la LCR de VPH-18- <i>lacZ</i>	45
La regulación hormonal de la LCR del VPH-18 en ratones transgénicos <i>lacZ</i> ..	48
La concentración de hormonas femeninas endógenas correlaciona con la actividad viral durante el embarazo	48
La actividad del VPH-18 es máxima posterior al pico hormonal en el ciclo estral	48
La eficiente transcripción está restringida a capas diferenciadas del epitelio	48
La importancia de las hormonas ováricas	49
La administración del 17 β -estradiol (E ₂) es suficiente para recuperar la transcripción del VPH-18	49
ARTÍCULO 2	
<i>In vivo</i> tissue-specific regulation of the human papillomavirus type 18 early promoter by estrogen, progesterone, and their antagonists	51

DISCUSIÓN	52
El GRE: mecanismo molecular	52
No hay un evidente <i>cross-coupling</i> en nuestro sistema	53
El posible papel de glucocorticoides <i>in vivo</i>	53
La secuencia TRE en células en cultivo	54
La secuencia YY1 en ratones transgénicos	54
Las construcciones de la serie pLCR β gal	55
Los ensayos con retinoides	55
Las ratonas VPH-18–hormonas	56
Implicaciones de partos y del uso de anticonceptivos en el marco de los resultados	56
Argumentos a favor del efecto de E ₂ en la activación del VPH-18	57
Posibles vías de activación del E ₂	58
Implicaciones biológicas e interpretaciones de los resultados	60
El posible papel de las hormonas esteroides sexuales <i>in vivo</i>	63
Perspectivas clínicas	64
Consideraciones finales	65
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	68
APÉNDICE 1	
TRANSGENIC MOUSE STRATEGIES IN VIRUS RESEARCH	86
APÉNDICE 2	
PROTOCOLS FOR THE MANUAL AND AUTOMATIC MICROINJECTION OF SOMATIC CELLS IN CULTURE AND FOR THE ANALYSIS OF MICROINJECTED CELLS	87
APÉNDICE 3	
MEDIOS Y SOLUCIONES	88
GLOSARIO	93

LISTA DE FIGURAS Y TABLA

Figura 1. Organización genómica del VPH-18	12
Figura 2. Representación esquemática de la LCR del VPH-18	14-15
Figura 3. Estructura química de los principales compuestos mencionados en la tesis	20-21
Figura 4. Molécula de TPA	27
Figura 5. Molécula de ONPG	28
Figura 6. Expresión de la región de control transcripcional del VPH-18 en células C33	33
Figura 7. Secuencias GRE auténticas y potenciales	34
Figura 8. El receptor de glucocorticoides activa la transcripción viral	36
Figura 9. La región reguladora del VPH-18 no es activada por dexametasona cuando el GRE se encuentra mutado	37
Figura 10. La mutación del GRE reduce la actividad basal de la región reguladora transcripcional del VPH-18 en células HeLa	38
Figura 11. Sitios de unión a factores de transcripción identificados en la LCR del VPH-18	39
Figura 12. Selección de ratones transgénicos por <i>slot blot</i>	41
Figura 13. Sitios de unión de AP1 y YY1 en la LCR del VPH-18	43
Figura 14. Construcciones con las regiones de control de VPH-16 o VPH-18 clonadas en el vector de expresión de β -galactosidasa	44
Figura 15. Efecto de retinoides sobre la transcripción del transgén	47
Figura 16. Modelos hipotéticos de algunas de las posibles vías de activación del receptor de estrógenos sobre el VPH-18	59
Figura 17. Esquema general de la actividad transcripcional del VPH-18 en el tejido genital	61
Tabla 1. Relación de los tratamientos inyectados con retinoides en ratones transgénicos	46

ABREVIATURAS

A, C, G, T	(nucleótido de) adenina, citosina, guanina, timina
aa	aminoácidos
AP1	activator protein-1
ATP	adenosina-5'-trifosfato
Bis-MSB	p-bis-(o-methylstyryl)-benzene
BPV-1	bovine papillomavirus type 1
CaCU	cáncer cérvico-uterino o de cuello del útero
CAT	chloramphenicol acetyltransferase
cDNA	complementary DNA
CDP	CCAAT displacement protein (humana; homeoproteína Cut en <i>Drosophila</i>) (antes PSM-BP, papillomavirus silencing motif binding protein)
C/EBP β	CCAAT/enhancer-binding protein β (en ratón; o liver-enriched transcriptional activator protein [LAP, en rata], NF-IL6 [nuclear factor for interleukin-6 expression, homólogo humano], IL-6DBP [D-binding protein], AGP/EBP [α_1 -acid glycoprotein gene, por su unión a éste], CRP2 [C/EBP-related protein 2] y NF-M [nuclear factor-myeloid])
c-fos	cellular [gene of] FBJ (Finkel-Biskis-Jinkins)-murine osteosarcoma virus
c-jun	cellular “ju-nana” (17 en japonés, aludiendo a ASV17 [avian sarcoma virus 17])
Cys	cisteína
dCTP	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
DEPC	diethyl pyrocarbonate
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMPA	depot-medroxyprogesterone acetate
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	desoxirribonucleósido-5'-trifosfato
D.O.	densidad(es) óptica(s)
DTT	dithiothreitol
E	temprano (Early)
E ₂	17 β -estradiol
E2F	E2 promoter binding factor
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
e. g.	<i>exempli gratia</i> (“por ejemplo”)
ELT	EDTA-lysozyme-triton
Epoc-1	epidermal octamer-binding factor-1 (murino; la contraparte de rata es llamada Skn-1a)
ER	receptor activado de estrógenos
ERE	elemento de respuesta a estrógenos
et al.	<i>et alii</i> (“y otros”)

etc.	etcétera
EtOH	etanol
Fig(s).	Figura(s) de publicaciones
FSH y LH	hormona estimulante del folículo y hormona luteinizante
FT	factor de transcripción
g	gramo(s)
gr.	griego
GR	receptor de glucocorticoides activado
GRE(s)	elemento(s) de respuesta a glucocorticoides
GREm	elemento de respuesta a glucocorticoides modificado
GRm	receptor de glucocorticoides mutante o inactivo
GTC	guanidinium thiocyanate
h	hora(s)
hbrm	human brahma (homólogo de brm en <i>Drosophila</i> y de SNF2/SWI2 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
HeBS	HEPES-buffered saline
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HPV-18	human papillomavirus type 18
HRE	elemento(s) de respuesta a hormona
HTLV-1	human T-cell lymphotropic virus type 1
ICI 164 384	Imperial Chemical Industries 164 384
<i>i. e.</i>	<i>id est</i> (“esto es”)
i.p.	intraperitonealmente
k	kilo (10 ³)
kb	kilobases o 10 ³ bases
kg	kilogramo
KRF-1	keratinocyte-specific factor
L	tardío(a) (Late)
LANL	Los Alamos National Laboratory
lat.	latín
LB	Luria-Bertani
LBR	loading buffer-RNA
LCR(s)	región(es) larga(s) de control (long control region; también llamada upstream regulatory region [URR] o noncoding region [ncr])
LIP	liver-enriched [transcriptional] inhibitory protein (es la isoforma dominante negativa truncada de C/EBP β)
LTR	long terminal repeat
μg, μl, μm, μM	microgramo(s), microlitro(s), micrómetros, micromolar
M	molar
M1, M2	mutación 1, mutación 2 (en elemento de unión a YY1)
mA	miliamperios
MAE	MOPS-acetate-EDTA
mg	miligramos
min	minuto(s)

ml	mililitro(s)
mM	milimolar
MMTV	mouse mammary tumor virus
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
mRNA(s)	messenger ribonucleic acid(s)
N	cualquier nucleótido
<i>N</i>	(concentración) normal
NF-I	nuclear factor I (también llamado CTF, CCAAT-binding transcription factor)
ng	nanogramos
NIC I	neoplasia intraepitelial cervical grado 1
nm	nanómetros
nt	nucleótido(s)
Oct-1	octamer [binding] factor-1 (también conocido como OTF-1 [octamer transcription factor], NFIII [nuclear factor III], OBP100 y NF-A1)
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl β -D-galactopyranoside
<i>ori</i>	origen (de replicación)
p53	protein 53 (kilodaltons)
P ₁₀₅	promotor 105
pb	pares de bases
PBS	phosphate buffered saline
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polyethylene glycol
p. ej.	por ejemplo
pg	picogramos
PPO	2,5-diphenyloxazole
pRb	protein retinoblastoma
PRE	elemento de respuesta a progesterona
PV	papillomavirus
R	radical
RA	ácido retinoico
RARs	receptores de ácido retinoico
RNA(s)	ribonucleic acid(s)
rpm	revoluciones por minuto
rRNAs	ribosomal RNAs
RU-486	Roussel Uclaf 38 486
RXR	receptores X de retinoides
SDS	sodium dodecyl sulfate
seg	segundos
Ser	serina
Sp1	specific protein 1
SSC	saline-sodium citrate buffer
SV40	simian virus 40
TAE	Tris-acetate-EDTA

TBE	Tris-borate-EDTA
TBP	TATA-binding protein
TD	Tris-Dulbecco
TE	Tris-EDTA
TESS	Tris-EDTA-sodium chloride-SDS
<i>tk</i>	thymidine kinase
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol 13-acetate
TRE	TPA-responsive element
TS	Tris-sucrose
UV	ultravioleta
v	volumen (volúmenes)
V	voltios
<i>v. gr.</i>	<i>verbi gratia</i> (“por ejemplo”)
VP	virus del papiloma
VPH	virus del papiloma humano
VPH-16	virus del papiloma humano tipo 16
VPH-18	virus del papiloma humano tipo 18
WHO	World Health Organization
wt o WT	wild-type
YY1	Yin Yang 1 (alias NF-E1 [nuclear factor that binds to the immunoglobulin enhancer heavy-chain μ E1 site; humano], δ /UCRBP [upstream conserved region-binding protein en ratón], CF1 [common factor 1])

RESUMEN

Natura nusquam magis est tota quam in minimis
“En ningún lugar se encuentra la naturaleza en su totalidad tanto como en sus más pequeñas criaturas”.
Plinio el Viejo

Se ha establecido que la infección persistente por virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, entre los que se encuentra el tipo 18 (VPH-18), es la causa central en la patogénesis del cáncer de cuello del útero (CaCU).

Sin embargo, también se ha determinado que la participación de otros factores, endógenos y exógenos, es necesaria. Estudios epidemiológicos han señalado al uso prolongado de anticonceptivos orales y a un alto número de partos como cofactores de riesgo en el desarrollo del CaCU, sugiriendo que niveles circulatorios elevados de hormonas esteroides pueden incrementar la carcinogénesis a través del VPH.

La expresión temprana viral, que incluye a los oncogenes E6 y E7, es dirigida por la región larga de control (LCR), la cual contiene elementos que reconocen diversos factores de transcripción.

En esta tesis se muestra la función de las hormonas esteroides sobre el control de la LCR del VPH-18. En primer lugar, la regulación de esta región fue probada en ratonas transgénicas, un contexto fisiológico y sistémico, para analizar el efecto de hormonas, tanto endógenas como exógenas, en el órgano genital, el cual es sensible a esteroides. El estradiol mostró ser la hormona clave en la activación de la transcripción *in vivo* y ésta fue inhibida por antagonistas hormonales.

También se demostró que sólo una secuencia cercana al promotor en la LCR, a la cual se une el receptor de glucocorticoides, es responsable de la activación directa de la expresión temprana por esta hormona *in vitro*. Una mutación puntual que elimina la unión del

receptor de glucocorticoides anuló la respuesta mediada por éste en una construcción transfectada y redujo la actividad basal. Al parecer, los glucocorticoides endógenos solos no tienen mayor importancia en la activación transcripcional del VPH-18 *in vivo*.

Los resultados apoyan fuertemente el papel de las hormonas esteroides en la regulación transcripcional de E6 y E7 en mujeres con infecciones de VPH de alto riesgo, y por consiguiente, en el desarrollo del cáncer cervical. Esto también ayudaría a explicar la asociación de riesgo observada entre factores hormonales con el CaCU y pone en evidencia la estrecha relación entre el estado fisiológico de la mujer y la actividad del virus. Por otro lado, los antiestrógenos podrían resultar útiles en el tratamiento de lesiones premalignas o CaCU al reducir la expresión de las oncoproteínas virales.

SUMMARY

“En la naturaleza, el papel de lo infinitamente pequeño es infinitamente grande”.
Frase atribuida a Louis Pasteur

It is well-established that persisting infection with high-risk human papillomaviruses (HPV), such as the type 18 (HVP-18), is the main cause involved in the pathogenesis of cancer of the uterine cervix.

Nevertheless, participation of other factors, endogenous and exogenous, is also necessary. Epidemiological surveys point to long-term use of oral contraceptives and high parity as risk cofactors for cervical cancer, suggesting that risen levels of circulating steroid hormones increase carcinogenesis through the HPV.

Early viral gene expression, including E6 and E7 oncogenes, is directed by the long control region (LCR), which contains a number of transcription factor binding sites.

The present dissertation shows the role of steroid hormones on the HPV-18 LCR. First, regulation of this region was assessed in female transgenic mice, a physiological and systemic model, in order to analyze the effect of endogenous and exogenous hormones in the genital tract, target of steroids. Estradiol proved to be the key hormone for transcriptional activation *in vivo* and its stimulation was inhibited by hormone antagonists.

Moreover, it was also demonstrated that a single sequence proximal to the promoter within the LCR is bound by the glucocorticoid receptor and induces response of the early expression to this hormone *in vitro*. A point mutation preventing glucocorticoid receptor binding rendered a transfected construction defective in *trans*-activation and decreased the basal activity. Endogenous glucocorticoids alone do not appear to influence HPV-18 transcription *in vivo*.

Results strongly support the role of steroid hormones in transcriptional regulation of E6 and E7 among women bearing high-risk HPV, and hence, for the development of neoplasm of cervix. Accordingly, it may also account for the reported relationship of hormonal risk factors to carcinoma of the cervix, and links virus activity to female physiological status. Finally, anti-estrogens might be considered as possible drugs useful to reduce expression of viral oncoproteins in premalignant and malignant cervix uteri lesions.

INTRODUCCIÓN

“Grande fue la sabiduría de los primeros hombres, vieron todo cuanto en el mundo había y acabaron por saberlo todo. No les pareció bien a los Creadores ver que los hombres sabían tanto. El Corazón del Cielo les echó vaho de su boca en los ojos, por lo que pudieron ver únicamente lo que está cerca”.
El *Popol Vuh* de los mayas quichés

GENERALIDADES

El cáncer ocupa el tercer lugar como causa de muerte a nivel mundial, sólo después de las enfermedades cardiovasculares y las infeccioso-parasitarias (WHO, 2000, 2008).

En los países en vías de desarrollo el riesgo de cáncer continuará incrementándose durante los próximos años (WHO, 2001).

De una larga lista, el cáncer cérvico-uterino (CaCU, también llamado cervical, de cuello del útero o de la matriz y tal vez incorrectamente del cérvix) es el segundo cáncer más común de mujeres en el mundo (WHO, 2000, 2008), siendo su incidencia casi cuatro veces mayor en los países en desarrollo respecto de los países industrializados (WHO, 2001).

En México las neoplasias son la tercera causa de defunción y de éstas el CaCU ha sido la principal causa de mortalidad por tumor maligno entre las mujeres (WHO, 2006).

Desde hace tiempo se sabe que la epidemiología del cáncer genital muestra una indudable correlación con la actividad sexual, sugiriendo que en el desarrollo del CaCU está involucrado un agente infeccioso transmitido sexualmente (revisado en Rotkin, 1973).

Actualmente se considera que un porcentaje significativo de cánceres humanos está relacionado con infecciones virales tales como la de Epstein-Barr, de la hepatitis B, del HTLV-1 y del papiloma humano (zur Hausen, 1986). En el último caso, se ha encontrado que más del 99% de los casos de cáncer cervical contienen DNA de virus del papiloma humano (VPH), indicando que es un factor necesario para el desarrollo de esta neoplasia (Walboomers et al., 1999).

Por otro lado, ha llegado a ser claro que algunos de los factores de riesgo en el comportamiento sexual, como múltiples parejas sexuales a lo largo de la vida del hombre y de la mujer, sólo reflejan la probabilidad de exposición al VPH (Ley et al., 1991; revisado en Castellsagué et al., 2003). Factores no virales, presentes en el ambiente y el hospedero, son requeridos en adición para el desarrollo de estos tumores, ya que las infecciones benignas progresan a carcinomas con relativa infrecuencia y generalmente después de una larga latencia. Éstos incluyen factores hormonales y tabaquismo (revisado en Vessey, 1986).

El papel de las hormonas sexuales femeninas en CaCU

Anticonceptivos hormonales

La sospecha de que el uso de anticonceptivos esteroides esté asociado con CaCU ha sido confirmada en muchos estudios epidemiológicos (Smith et al., 2003; International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2007).

Una de las primeras investigaciones indicó que las píldoras anticonceptivas promueven la progresión de displasias cervicales a carcinoma *in situ* (Stern et al., 1977).

Reportes de caso-control y de seguimiento han mostrado la tendencia entre el uso de anticonceptivos orales con lesiones preinvasivas de alto grado (Peritz et al., 1977; Harris et al., 1980; Vessey et al., 1983; Beral et al., 1988; Negrini et al., 1990; Brisson et al., 1994) e invasivas (Peritz et al., 1977; Vessey et al., 1983; La Vecchia et al., 1986; Ebeling et al., 1987; Beral et al., 1988; Brinton et al., 1990; WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives, 1993; Thomas et al., 1996; Castellsagué et al., 2006) del cuello del útero. Los análisis muestran que el efecto más importante ha sido la duración de toma de la hormona exógena, de manera más evidente después del 5º año de uso (Harris et al., 1980; Vessey et al., 1983; Beral et al., 1988; Negrini et al., 1990; WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives, 1993; Castellsagué et al., 2006). Un reporte ha sugerido que píldoras con estrógeno de potencia alta presentan un riesgo mayor que las de potencia baja (Brinton et al., 1986).

El factor hormonal pareció confirmarse cuando se observó el exceso de riesgo también en consumidoras de anticonceptivos inyectables (Herrero et al., 1990).

Algunos estudios tomaron en cuenta los patrones sexuales y encontraron que la asociación positiva persistía para las usuarias de píldoras (Harris et al., 1980; Brinton et al., 1986; Herrero et al., 1990; Negrini et al., 1990; Castellsagué et al., 2006).

Sin embargo, no se había demostrado la existencia de los efectos de estos anticonceptivos restringiendo el análisis a mujeres con VPH. Al principio no se encontró evidencia de un efecto sinérgico del anticonceptivo oral y la infección de VPH, sino que cada factor pareció ejercerlo independientemente (Brinton et al., 1990; Negrini et al., 1990). Más recientemente se halló que el riesgo de carcinoma cervical *in situ* al usar anticonceptivos orales por 5 años o más tiene un incremento del doble y por 10 años o más fue de cuatro veces con respecto a mujeres también positivas a VPH (Brinton et al., 1990; Moreno et al., 2002).

Partos múltiples

La incidencia de CaCU comienza con la edad del inicio de la etapa sexual, así como con los cambios hormonales propios de esta etapa (WHO, 2008).

Por décadas se había sospechado que el alto número de embarazos debía de estar asociado con un mayor riesgo de CaCU (revisado en Smith, 1931). Posteriormente la paridad se ha revelado como un factor reproductivo de riesgo, independiente de la correlación asumida con el comportamiento sexual (particularmente la edad del primer coito) (Brinton et al., 1987, 1989; Parazzini et al., 1989; Castellsagué et al., 2006).

Otras evidencias epidemiológicas han producido datos compatibles con la hipótesis de que la multiparidad también tiene un papel en el desarrollo de lesiones premalignas (Beral et al., 1988; Schiffman et al., 1993).

Los resultados en estudios de caso-control han confirmado que el riesgo de cáncer cervical se incrementa por más de dos veces en mujeres que tuvieron cuatro nacimientos o más, comparados con las que tuvieron uno o ninguno (Brinton et al., 1987, 1989; Parazzini et al., 1989, 1998).

En algunos reportes no se tomó en cuenta el posible efecto del VPH de manera adecuada, al no realizar la estratificación en el número de embarazos debido a tener una relativamente pequeña población (Krüger-Kjær et al., 1998; Kjellberg et al., 2000).

Finalmente, en un extenso análisis al respecto, en mujeres positivas a VPH se observó un aumento del riesgo de carcinoma de cuello uterino en relación directa con el número de

embarazos a término, llegando hasta casi el cuádruple cuando alcanzaban ≥ 7 , comparado con las que nunca habían dado a luz (Muñoz et al., 2002).

Además, el efecto combinado de un alto número de alumbramientos y el uso de anticonceptivos orales fue sinérgico (Brinton et al., 1989; Muñoz et al., 2002).

VIRUS DEL PAPILOMA

Los virus del papiloma (VP) han sido clasificados como el único género de la familia *Papillomaviridae* (anteriormente formaban parte del desaparecido grupo de los papovavirus, junto con el SV40 y el poliomavirus), la cual comprende a miembros que infectan a aves y una amplia gama de especies de mamíferos, incluyendo al hombre (de Villiers et al., 2004; National Center for Biotechnology Information, 2009).

Son virus pequeños, sin envoltura, que se caracterizan por tener una cápside icosaédrica que mide 55 nm de diámetro, formada sólo de proteínas y compuesta por 72 capsómeros. En su interior existe una molécula de DNA circular superhelicoidal de doble cadena, asociada con histonas en forma de nucleosomas, que tiene un peso molecular aproximado de 5×10^6 daltons (Favre et al., 1977).

Inducen tumores epiteliales o fibroepiteliales de la piel o mucosa de vertebrados que son generalmente benignos en sus huéspedes naturales, con un crecimiento limitado, y su ciclo viral está ligado al programa de diferenciación de la célula epitelial. Ciertos VP animales tienen la habilidad de transformar células de roedores en cultivo e inducir tumores en huéspedes heterólogos (revisado en Spalholz y Howley, 1989).

El DNA de los VP tiene alrededor de 8 kb y muestra una organización genómica conservada entre todos sus miembros. Exhiben 8-10 genes y todos los transcritos provienen de una cadena. El genoma ha sido dividido funcionalmente en 2 regiones codificadoras separadas por un segmento no codificador. La región codificadora temprana o transformante contiene los genes E1 a E8, los cuales son requeridos en la replicación viral extracromosomal (E1-E2), la regulación transcripcional (E2), la transformación celular (E5, E6, E7), y es la región cuyo RNA se expresa desde las células de la parte inferior del epitelio estratificado, las cuales están poco diferenciadas. Y la región tardía, que contiene los 2 genes estructurales para la cápside, L1 y L2. Su expresión, así como el ensamblaje de las partículas víricas, ocurre eficientemente sólo en las capas terminalmente más diferenciadas del epitelio. Además, está la región reguladora de la transcripción, situada entre el fin de L1 y antes de E6, la cual es blanco de diferentes factores celulares y virales. Se le ha nombrado región no codificadora, región reguladora *upstream* o región larga de control (revisado en Spalholz y Howley, 1989). Su localización y tamaño (ocupa del 7 al 11% del genoma) están bien conservados entre los VP, aunque las secuencias son muy divergentes y los motivos aparecen arreglados en varias combinaciones, específicas para cada genoma. Los elementos comunes a todos los VP son: los sitios de poliadenilación para los RNAs tardíos en el extremo 5' de la región larga de control; los sitios de unión a la proteína E2, que varían en posición y número de 4 en los VP humano genitales a 10 en el BPV-1; un sitio de unión a la proteína E1; y la caja TATA en el promotor temprano (O'Connor et al., 1995).

VPH DE ALTO RIESGO

Los VPH constituyen un grupo con más de 100 tipos distintos completamente descritos y varios subtipos (National Center for Biotechnology Information, 2009), así como distintas variantes, todos clasificados en base a su secuencia (de Villiers et al., 2004).

Todos los VPH son estrictamente epiteliotrópicos e infectan la piel o la mucosa anogenital y bucofaringea, no diseminándose sistémicamente. Los epitelios susceptibles difieren entre los VPH, dando lugar a síntomas clínicos distintos (*v. gr.* las verrugas de la piel) dependiendo del tipo viral infectivo (revisado en de Villiers, 1989).

Se ha encontrado DNA viral presente en algunos cánceres orales y, más importante, ciertos miembros que infectan el tracto anogenital están asociados con lesiones preneoplásicas y carcinomas en vagina, vulva, pene, ano y principalmente CaCU. Se calcula que el DNA de VPH se halla en aproximadamente 10% de todos los cánceres humanos (revisado en zur Hausen y de Villiers, 1994).

Los tipos genitales pueden ser subdivididos en VPH de “alto riesgo” o carcinógenos y de “bajo riesgo”, sobre la base de la propensión de una lesión a progresar o no al estado maligno. Los considerados de alto riesgo, por encontrarse frecuentemente en los casos de CaCU, son principalmente los VPH tipos 16 y 18, y en menor medida los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Otros, como los VPH 6 y 11 son raramente detectados en lesiones malignas y se les halla principalmente en tumoraciones benignas como verrugas genitales (condiloma acuminado), por lo que son considerados VPH de bajo riesgo (Muñoz et al., 2003). La progresión maligna ocurre generalmente después de un largo período de latencia de años o décadas entre la infección primaria y el surgimiento del cáncer (zur Hausen, 1991).

La etiología del carcinoma cervical-uterino indica que los virus de alto riesgo juegan un papel causal en su desarrollo. Esta conclusión surgió de numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* que han mostrado su participación en la patogénesis de neoplasias cervicales. A continuación, algunas evidencias: 1) Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de DNA de estos VPH se encontró en el 99.7% de las muestras de biopsias de cáncer cervical invasivo de diferentes partes del mundo. Los VPH tipos 16 y 18 son los que se hallan en mayor proporción (Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999). 2) La demostración de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 en los tumores cancerosos cervicales (Schwarz et al., 1985). 3) La identificación de propiedades de inmortalización y transformación por estos genes (revisado en McDougall, 1994). 4) El hecho que líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales humanos (*v. gr.* HeLa, SiHa, CaSki, C-4I, MS751) contienen VPH de alto riesgo transcripcionalmente activos (Yee et al., 1985). 5) El requerimiento de la expresión de E6 y E7 para mantener el fenotipo transformado de las líneas de carcinoma cervical (ver más adelante). 6) La interacción de las oncoproteínas virales con proteínas celulares reguladoras del crecimiento (revisado en zur Hausen, 2000). 7) Los estudios epidemiológicos señalan a las infecciones con estos VPH como el principal factor de riesgo para el desarrollo del CaCU y sus lesiones precursoras, las neoplasias intraepiteliales cervicales (Bosch et al., 1992; Schiffman et al., 1993).

La expresión y replicación viral son mantenidas a niveles bajos en las células basales desdiferenciadas incrementándose junto con la diferenciación celular hospedera (Crum et al., 1988; Nuovo et al., 1991).

E6 y E7

Las funciones de las proteínas individuales de los VPH son conocidas (revisado en Scheffner et al., 1994). En los últimos años, las propiedades de las oncoproteínas del subgrupo de virus de alto riesgo han sido intensamente estudiadas y dan algunas pistas para el mecanismo molecular de la carcinogénesis celular inducido por el VPH. Los VPH de alto riesgo codifican al menos para tres proteínas con cualidades de inmortalización y transformación: E5, E6 y E7. El gen E5 frecuentemente se pierde durante el proceso de integración en líneas celulares de carcinoma cervical (Schwarz et al., 1985) por lo que su producto obviamente no es necesario para mantener el fenotipo maligno.

La identificación del potencial de inmortalización y transformación por parte de los oncogenes E6 y E7, expresados desde promotores autólogos o heterólogos, ha sido una contribución definitiva al apoyo de la patogénesis del cáncer cervical. Estas características fueron observadas primero con la transfección de los genomas completos de VPH tipos 16 o 18 en queratinocitos y fibroblastos humanos primarios (Pirisi et al., 1987; Kaur y McDougall, 1988; Schlegel et al., 1988) y en líneas establecidas de roedor (Bedell et al., 1987), mientras que los de VPH no asociados con carcinomas cervicales fueron incapaces de hacerlo (Woodworth et al., 1989). Posteriormente se encontró que ambas actividades dependían de los dos genes virales tempranos E6 y E7 (Bedell et al., 1989; Watanabe et al., 1989).

En queratinocitos genitales humanos primarios se mostró que los oncogenes E6 y E7 son requeridos en combinación para inmortalizar eficientemente estas células (Hawley-Nelson et al., 1989; Münger et al., 1989a; Hudson et al., 1990; Sedman et al., 1991).

Los genes E6 y E7 son selectivamente retenidos intactos y consistentemente expresados en líneas celulares positivas a VPH provenientes de carcinomas cervicales, pero no así otros genes virales (Schwarz y Schneider-Gädicke, 1986; Schwarz et al., 1986).

Su expresión es un requerimiento no sólo para la iniciación sino para el mantenimiento del estado transformado y maligno de las células que contienen DNA de VPH de alto riesgo *in vitro* e *in vivo*. En líneas celulares cervicales, con la represión de la expresión de E6-E7 las células cesan de crecer y con la reintroducción de los mismos genes activos se recupera el fenotipo transformado (von Knebel Doeberitz et al., 1988, 1994). En ratones desnudos, construcciones de E6-E7 antisentido también interfieren con el crecimiento de tumores que expresan estos genes (von Knebel Doeberitz et al., 1992; Tan y Ting, 1995).

Sin embargo, los genes E6 y E7 no son suficientes para convertir células al estado inmortalizado o maligno. La fusión de células de carcinoma cervical positivas a VPH (HeLa) con células humanas normales resultó en híbridos no malignos cuando se inocularon en ratones atímicos, reduciéndose drásticamente los niveles de expresión de E6-E7 (Bosch et al., 1990). Otras clonas híbridas con origen en diferentes líneas celulares cambiaron hacia características de senescencia o no tumorales, con transcripción aún de E6-E7 (Seagon y Dürst, 1994). Las células humanas inmortalizadas por E6-E7 *in vitro* no originan tumores en los primeros pasajes, aunque cultivadas por largo tiempo pueden producir clonas malignas (Hurlin et al., 1991; Pecoraro et al., 1991).

Así, estos estudios muestran que aunque obviamente necesaria, la presencia de los oncogenes E6-E7 es insuficiente para el crecimiento maligno, lo que apunta a una regulación intracelular e intercelular de la expresión genética del VPH (revisado en zur Hausen, 1999, 2000). Esto explicaría porque el CaCU se desarrolla de neoplasias intraepiteliales cervicales que contienen tipos de VPH de alto riesgo después de un período

de latencia de años o décadas y el que no todas las mujeres que se encuentran infectadas con el virus lo desarrollan, sino sólo un pequeño número (~ 1-5%).

Se ha propuesto que E6 y E7 han evolucionado por duplicaciones de una unidad de 33 aminoácidos, que incluye un dominio Cys-X-X-Cys, característica típica de proteínas de unión a DNA (Cole y Danos, 1987). Ambos son *trans*-activadores transcripcionales (Phelps et al., 1988; Desaintes et al., 1992), aunque no se han encontrado elementos de respuesta homólogos en VPH.

Las oncoproteínas E6 y E7 alteran los mecanismos normales de control de crecimiento celular. E6 y E7 de VPH tipos 16 y 18 se unen con al menos una veintena de proteínas celulares (revisado en zur Hausen, 2000). De particular atención es la unión de E6 con p53 (Werness et al., 1990) y de E7 con la forma no fosforilada de pRb (Dyson et al., 1989), que correlaciona con el comportamiento clínico, pues las proteínas correspondientes de los VPH de bajo riesgo parecen no unirlos o al menos no con la misma afinidad (Münger et al., 1989b). La interacción de E6 con p53 da como resultado la degradación de la última a través del sistema de proteólisis dependiente de ubiquitina (Scheffner et al., 1990). Dado que una de las funciones de p53 es el control de la transición G₁/S y el bloqueo de este punto después de un daño al DNA, su degradación por E6 se considera como una de las principales causas para la acumulación de eventos mutagénicos y posiblemente para el subsecuente desarrollo de aneuploidías, que son consecuencias comunes en células que contienen VPH de alto riesgo (White et al., 1994; Havre et al., 1995). La unión de E7 a pRb provoca la degradación de esta proteína celular (Boyer et al., 1996) liberando al grupo de factores E2F que permiten la expresión de genes para la fase S. E7 rompe la transición G₁/S (Martin et al., 1998), induce mutaciones en el DNA hospedero (Hashida y Yasumoto, 1991) y aumenta la mutagénesis por carcinógenos químicos (Liu et al., 1997).

Los elementos reguladores de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 se encuentran localizados en la región de control transcripcional.

EL VPH TIPO 18 (VPH-18)

El VPH-18 junto con el tipo 16 (VPH-16) han sido los tipos más intensamente caracterizados por su alta frecuencia en biopsias de CaCU y sus oncogenes virales.

El DNA del VPH-18 se aisló por primera vez de una biopsia de carcinoma cervical proveniente de una paciente de Brasil (prototipo) y se encontró también en otras de África y Alemania, así como en células KB (Boshart et al., 1984). Posteriormente la secuencia completa del virus fue determinada por Cole y Danos (1987). Se encuentra activo en las líneas celulares derivadas de cáncer cervical HeLa, MS751, SW756, C-4I y C-4II (Schwarz et al., 1985; Yee et al., 1985). La expresión genética viral está principalmente confinada a los oncogenes E6 y E7 (Schwarz et al., 1986).

El DNA transfectado de VPH-18 es capaz de inmortalizar queratinocitos humanos (Kaur y McDougall, 1988; Schlegel et al., 1988; Woodworth et al., 1989) y de transformar fibroblastos establecidos de roedor (Watanabe y Yoshiike, 1988), estando transcripcionalmente activo en las células.

El VPH-18 se encuentra diseminado en todo el mundo (Bosch et al., 1995) y su DNA se ha presentado no sólo en biopsias de CaCU sino en carcinomas anales, de la vulva, pene, cavidad oral, lengua, laringe, faringe y esófago (revisado en zur Hausen y de Villiers, 1994 y en LANL, 1996). Generalmente su frecuencia en cáncer cervical se haya por debajo de VPH-16 en tumores escamosos (con un 12%), pero en cambio su presencia parece

predominar en otros tipos histológicos de neoplasias cervicouterinas como adenocarcinomas (en 56% de estos casos), tumores adenoescamosos (en 39% de éstos) y carcinomas neuroendócrinos de células pequeñas (en 78%), todos los cuales tienen un pronóstico particularmente pobre (Stoler et al., 1991; Bosch et al., 1995).

El estudio comparativo de los VPH-18 y VPH-16 sugiere que el primero tiene el potencial oncogénico más alto o que la infección por VPH-18 puede progresar a la malignidad más rápidamente. Esta propuesta está basada al medir la frecuencia de ambos en carcinomas cervicales y compararlas con su detección en lesiones precancerosas (Arends et al., 1993). También el DNA de VPH-18 es más eficiente en inmortalizar células epiteliales en cultivo (Schlegel et al., 1988; Romanczuk et al., 1991).

El DNA circular de doble cadena del VPH-18 mide 7 857 pb (LANL, 1996), casi 50 pb más corto que VPH-16 y 33; está organizado en 8 genes localizados en la misma cadena, de los cuales 6 son tempranos (E) y 2 tardíos (L), y la región intermedia, reguladora de la transcripción, que contiene también el origen de la replicación viral (Figuras 1 y 2). Características compartidas con otros VP son la presencia y posición de los genes E6, E7, E1 (que entre VP es el más largo), E2, L2, L1 (la región de máxima homología) y que E4 se encuentra dentro de E2 (Cole y Danos, 1987). La conservación de elementos responsivos en *cis*, a pesar de la diversidad en su organización, en la región larga de control de diferentes VPH sugiere que son tan indispensables para su biología que no han podido sufrir cambios evolutivos (O'Connor et al., 1995).

El DNA del VPH-18 se encuentra consistentemente integrado en el genoma de líneas celulares provenientes de neoplasias cervicales (Schwarz et al., 1985; Yee et al., 1985), de queratinocitos humanos inmortalizados (Barbosa y Schlegel, 1989) y de carcinomas cervicales, mientras que en muestras normales y de neoplasias intraepiteliales cervicales está en forma de episoma (Cullen et al., 1991). Este episoma se rompe en la región de los genes E1/E2 para la integración (Schwarz et al., 1985). Consecuentemente, la replicación viral es inhabilitada y el patrón de transcripción es cualitativa y cuantitativamente modificado. No se ha observado especificidad para la localización intracromosómica.

La expresión genética en lesiones de bajo grado es principalmente de la región E4-E5 mientras que la de E6-E7 es en los estratos medio y superior, con la región tardía restringida a los estratos superiores terminalmente diferenciados. En lesiones de alto grado, carcinomas y adenocarcinomas aumenta la expresión de E6, E7 y E1 con ausencia de E2, E4, E5 y prácticamente sin transcritos tardíos (Stoler et al., 1992).

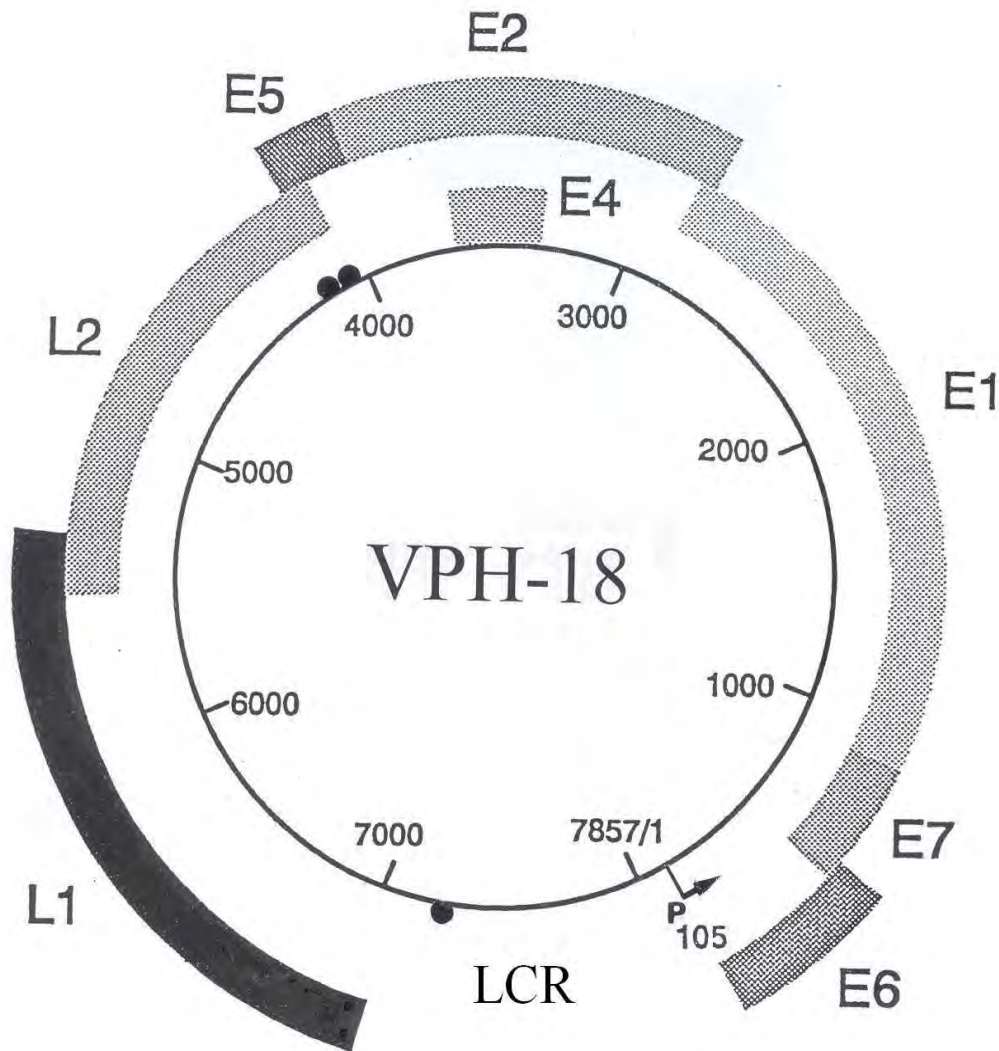


Figura 1. Organización genómica del VPH-18.

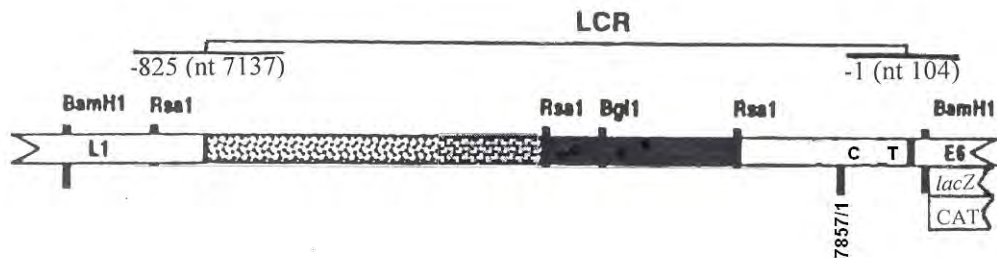
El mapa genético del virus ha sido deducido de la secuencia de DNA. Los genes se dividen en tardíos (L), los cuales codifican para las dos proteínas estructurales, y los tempranos (E), entre los que están los oncogenes E6 y E7. E1 y E2 participan en la replicación viral y el segundo en la represión de la transcripción. También se muestra la región no codificadora localizada a 5' y 3' de las regiones temprana y tardía, respectivamente, denominada región larga de control (LCR). La transcripción es unidireccional con los genes localizados en una sola cadena de DNA. El promotor P_{105} y la orientación transcripcional se indican con la flecha. Los niveles de cada gen corresponden a las tres diferentes fases de traducción en que se leen. Así E4 está en un marco diferente a E7 y E1 y éstos a E6, E2 y E5. Se observa el traslape entre E6 y E7, E1 y E2, L2 y L1 y la inclusión de E4 en E2. Los sitios de poliadenilación temprano y tardío están representados por puntos al final de cada región codificadora. En el estado integrado los transcritos virales tempranos E6, E7 y E1 terminan en las secuencias celulares adyacentes. (Figura modificada de zur Hausen y de Villiers, 1994).

LA REGIÓN REGULADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN TEMPRANA EN VPH-18

La región que controla el inicio transcripcional, también llamada región larga de control (LCR), región reguladora *upstream* o región no codificadora, se extiende entre el codón de terminación de L1 y el codón de iniciación de E6 (Figuras 1 y 2). Esta porción genómica es responsable de la transcripción de todos los genes tempranos. Su secuencia fue establecida por Dartmann antes que la del resto del virus (Thierry et al., 1987b). La transcripción comienza desde el promotor P₁₀₅, nombrado por el número de nt en el cual los mRNAs son iniciados, en el primer codón de E6.

La región de regulación tiene actividad en varias líneas celulares humanas y de otros mamíferos, aunque mucho menos que la LTR del virus del sarcoma de Rous (Thierry et al., 1987b; Gius et al., 1988; Hoppe-Seyler y Butz, 1992; Cid et al., 1993). Conduce la transcripción de los oncogenes E6 y E7, inmortalizando y transformando células *in vitro* (Bedell et al., 1989; Hudson et al., 1990). Es activa en ausencia de proteínas virales de VPH-18 y el antígeno T de SV40 estimula su transcripción, mientras que E1A de adenovirus tipo 5 la reprime (Thierry et al., 1987b). La mitad 3' *Bgl* I-*Bam*H I tiene sólo alrededor de una quinta parte de la actividad de la región completa (Thierry et al., 1987a; Ovseiovich et al., 1994).

La región reguladora en VPH-18 mide 825 pb (10.5% del genoma viral) y puede ser convenientemente dividida por digestión con *Rsa* I en 3 fragmentos funcionales (Gius et al., 1988) (Figura 2). El primer segmento 5' de 373 nt (posiciones 7137 a 7509) y función desconocida comprende casi la mitad de la LCR; es rico en timinas, contiene un elemento de unión para la proteína viral E2 (a 500 nt de P₁₀₅), la terminación de la transcripción así como la señal de poliadenilación para los transcritos de la región L y no tiene actividad *per se* en presencia o ausencia de E2 (Cole y Danos, 1987; Garcia-Carranca et al., 1988). Contribuye con alrededor del 20% del total de la actividad de la LCR (Hoppe-Seyler et al., 1991). Esta subregión es activada por E6 (Gius et al., 1988); tiene un motivo de reconocimiento a NF-I sin probar funcionalmente (Gloss et al., 1989) y uno para YY1 sin función importante (Bauknecht et al., 1995). El fragmento central *Rsa* I-*Rsa* I de 230 nt (7510 a 7739) está centrado a casi 300 pb de la caja TATA y sólo aparece completo entre VP genitales (Cole y Danos, 1987). Este potenciador (*enhancer*) transcripcional constitutivo, que depende únicamente de la interacción con factores celulares, es activo en transfecciones en varios tipos de células establecidas que incluyen fibroblastos de roedor (NIH 3T3) y adrenales humanas (SW13), teniendo preferencia por células epiteliales humanas (HeLa, SCC-13) y funciona con promotores heterólogos (Thierry et al., 1987a; Garcia-Carranca et al., 1988; Gius et al., 1988; Mack y Laimins, 1991). Contiene un sitio de unión a YY1 que es inactivo en la LCR completa (Bauknecht et al., 1995). Plásmidos cotransfectados que expresan al receptor β de ácido retinoico, así como a Oct-1 o a la proteína p53, reprimieron a la región reguladora a través de esta subregión (Hoppe-Seyler et al., 1991; Bartsch et al., 1992; Desaintes et al., 1995). Este segmento podría determinar el tropismo epitelial observado para los VPH. El último fragmento, de 222 nt (7740 a 104), contiene al promotor temprano en su término 3' y no tiene actividad transcripcional intrínseca (1% del total), sin importar la presencia de numerosos sitios de unión para factores transcripcionales celulares (Thierry et al., 1987a; Garcia-Carranca et al., 1988; Bauknecht et al., 1992), aunque activa la transcripción en presencia de E2 si se coloca 5' de un promotor heterólogo (Garcia-Carranca et al., 1988; Bernard et al., 1989). Es el segmento mejor conservado entre todos los VPH (LANL, 1996). Contiene 3 secuencias específicas de



Fragmento

Distal	Enhancer	Promotor
Sp1 7316-7321 (GCGCCC)	NF-I 7513-7527 (CTGGCACTATTGCAA) 7569-7586 (un par de TTGGC)	AP1 7792-7798 (TGAATAA)
YY1 7441-7449 (CTCCATTTT)	AP1 7608-7614 (TTAGTCA)	Epoc-1/skn-1a 7803-7821 (TGCATACATAGTTTATGCA)
E2 7458-7469 (ACCGATTTCGGT)	YY1 7610-7618 (AGTCATTTT)	E2 7822-7833 (ACCGAAATAGGT)
NF-I 7475-7479 (TTGGC)	Oct-1 7644-7651 (GCTTGCAT)	YY1 7847-12 (CTATACTTTTCATTAA-TACTTTT)
	KRF-1 7647-7669 (TGCATAACTATATCC-ACTCCCTA)	CDP/Cut 7855-18 (TTCATTAATACTTTTAAACAAT)
	C/EBP β -YY1 y LIP (región <i>switch</i>) 7710-7718 (TACTTAAG)	Sp1 35-40 (GGGAGT)
	Oct-1 7721-7728 (AATTGCAT)/NF-I 7731-7735 (TTGGC)	E2 42-53 y 58-69 (ACCGAAAACGGT)
		TBP 71-79 (TATATAAAA)

Figura 2. Representación esquemática de la LCR del VPH-18.

Se indican los sitios de restricción con *Bam*H I, *Rsa* I y *Bgl* I. La LCR está contenida dentro de un fragmento *Bam*H I de 1 051 pb (nt 6930 a 123). Los 207 nt de su extremo 5' incluyen la parte carboxi-terminal de L1, mientras los 19 nt en su extremo 3' están dentro de la parte amino-terminal de E6, por lo que está compuesta de 825 pb. El sitio *Bgl* I se encuentra a 379 nt del inicio de la transcripción. Los subfragmentos corresponden al *Bam*H I-*Rsa* I (6930-7120), el distal *Rsa* I-*Rsa* I de 389 nt (7121-7509), el central *Rsa* I-*Rsa* I de 230 nt (7510-7739) y el proximal *Rsa* I-*Bam*H I de 237 nt (7740-119). El primer nt de la LCR (104) es referido como -1.

La LCR contiene sitios de unión para diferentes factores transcripcionales. En el subfragmento distal se encuentran un sitio Sp1, YY1, NF-I y para la proteína viral E2. En el central (donde se haya el *enhancer* constitutivo) se localizan 3 sitios de unión de NF-I (los 2 primeros como dímero), 2 de Oct-1, 1 de AP1, YY1, KRF-1, C/EBP β -YY1 y LIP. En la región proximal (con las secuencias del promotor y el origen de replicación): 1 AP1, Epoc-1, YY1, CDP, Sp1, 3 E2 y para TBP. Las cajas CAAT (C) y TATA (T) están señaladas, así como la ubicación de los reporteros usados en esta tesis. (La numeración está en base a LANL, 1996).

VP (ACCN₆GGT) para la proteína viral E2 (2 están a 4 pb entre ellas), el origen de replicación, así como típicas cajas TATA y CAAT (Thierry et al., 1987b). Los 2 sitios de unión a E2 (ACCGA₄CGGT) flanqueados en 5' por el sitio aberrante Sp1 y en 3' por la secuencia TATA son los responsables de la inducción por la proteína E2 con un promotor heterólogo (Garcia-Carranca et al., 1988; Gius et al., 1988), aunque en el contexto de la región reguladora completa este factor reprime la transcripción (Thierry et al., 1987a; Bernard et al., 1989). El sitio Sp1, el de unión para TBP y los 2 sitios para E2 proximales, junto con sus precisos espaciamientos, están conservados en los VPH genitales, lo que sugiere que los dímeros de E2 desplazan a Sp1 y a TFIID en todos ellos (Tan et al., 1994). El sitio E2 cercano a -140 pb que tiene baja afinidad por la proteína, no es un palíndromo perfecto, lo mismo que en otros VPH malignos genitales, a diferencia del que se encuentra en los benignos (Garcia-Carranca et al., 1988). En este fragmento 3' YY1 ejerce represión de la actividad promotora (Bauknecht et al., 1992).

Numerosos factores proteínicos que interaccionan con la región de control del VPH-18 han sido identificados. Garcia-Carranca y colaboradores (1988) fueron los primeros en realizar experimentos de huella (o *footprint*) con extractos nucleares de varios tipos celulares, lo que sirvió de pauta para análisis posteriores por muchos laboratorios buscando factores de unión a secuencia específica. Estos y otros probables factores implicados han sido confirmados por ensayos de huella *in vivo* sugiriendo que prácticamente todo el *enhancer* está ocupado por proteínas (Bednarek et al., 1998). La actividad del *enhancer* y promotor del VPH depende de la cooperación de más de 10 factores de transcripción diferentes (revisado en O'Connor et al., 1995).

El grupo de factores celulares de transcripción que se unen a elementos reguladores dentro de la LCR del VPH-18 incluye a AP1 (Garcia-Carranca et al., 1988; Offord y Beard, 1990; Mack y Laimins, 1991; Thierry et al., 1992; Butz y Hoppe-Seyler, 1993; Bauknecht et al., 1995), NF-I (Gloss et al., 1989; Butz y Hoppe-Seyler, 1993), KRF-1 (Mack y Laimins, 1991; Butz y Hoppe-Seyler, 1993), Oct-1 (Butz y Hoppe-Seyler, 1993), Sp1

(Hoppe-Seyler y Butz, 1992, 1993; Butz y Hoppe-Seyler, 1993), YY1 (Bauknecht et al., 1992, 1995), el heterodímero C/EBP β -YY1 (región *switch*; Bauknecht et al., 1995, 1996), Epoc-1 (Yukawa et al., 1996), CDP (O'Connor et al., 2000) y LIP (Bauknecht y Shi, 1998; Darnell et al., 2005). Estos elementos han sido funcionalmente probados como subregiones aisladas y clonadas en promotores homólogos (Offord y Beard, 1990; Bauknecht et al., 1992; Yukawa et al., 1996) y heterólogos (Mack y Laimins, 1991; Hoppe-Seyler y Butz, 1993; O'Connor et al., 2000) o dentro de la LCR completa (Hoppe-Seyler y Butz, 1992; Thierry et al., 1992; Butz y Hoppe-Seyler, 1993; Bauknecht et al., 1995, 1996; Yukawa et al., 1996; Bauknecht y Shi, 1998; Darnell et al., 2005). Mediante mutaciones en la LCR íntegra se probó que cada uno de los 2 sitios de unión a AP1 y el Sp1 3' tenían una importancia crucial en la eficiente activación viral, y en menor medida el elemento KRF-1, en células de origen epitelial en cultivo (Hoppe-Seyler y Butz, 1992; Thierry et al., 1992; Butz y Hoppe-Seyler, 1993). YY1 y C/EBP β -YY1 también afectaron importantemente la transcripción viral (Bauknecht et al., 1995, 1996).

El análisis funcional de la región temprana completa ha determinado que, en las líneas celulares probadas, los niveles fisiológicos de AP1, NF-I, KRF-1, Oct-1, Sp1 y C/EBP β -YY1 actúan positivamente sobre la transcripción (Hoppe-Seyler y Butz, 1992; Thierry et al., 1992; Butz y Hoppe-Seyler, 1993; Bauknecht et al., 1995, 1996). En cambio, la sobreexpresión de Oct-1 sin necesidad de unión al *enhancer* redujo fuertemente la transcripción, lo que sugiere un efecto de *sqelching* de algún factor celular necesario para la estimulación (Hoppe-Seyler et al., 1991). Ensayos de cotransfección indicaron que los receptores α , β o γ del ácido retinoico, al igual que p53, regularon negativamente a la región de control (Bartsch et al., 1992; Desaintes et al., 1995). La función de regulación positiva por Epoc-1 sólo se ha mostrado también por medio de este ensayo (Yukawa et al., 1996). Los niveles fisiológicos de CDP (O'Connor et al., 2000) y LIP (Darnell et al., 2005) reprimieron la transcripción viral. Además, la región de control responde positivamente a glucocorticoides o progesterona *in vitro* (Chan et al., 1989).

La proteína con dedos de cinc, YY1, unido en la subregión 3' cumple su papel dual ya que funciona como activador de la LCR completa en células HeLa y como represor de la misma en células HepG2, siendo esta doble actividad dependiente de la unión o no de C/EBP β -YY1 a la región *switch*, respectivamente (Bauknecht et al., 1995, 1996). En concordancia, C/EBP β sobreexpresado en células HepG2 indujo la unión a su sitio de reconocimiento junto con YY1 para activar la transcripción (Bauknecht et al., 1996), mientras que su sobreexpresión o la de su isoforma dominante negativa LIP en HeLa reprimió a la región reguladora, interfiriendo con la unión de TBP a su secuencia TATA (Bauknecht y Shi, 1998). La restauración de pRb en células que no lo tenían provocó la unión de LIP en vez de C/EBP β -YY1 a la región *switch* (Darnell et al., 2005).

En cuanto a la distribución espacial, algunos factores son ubicuos, como Oct-1, Sp1, NF-I y YY1. Otros son específicos de epitelio como Epoc-1, que se detecta en las células más superficiales casi exclusivamente de piel (Andersen et al., 1993); KRF-1 está presuntamente sólo en queratinocitos (Mack y Laimins, 1991). El receptor de ácido retinoico α es ubicuo, el β se expresa en ciertos tejidos y γ casi exclusivamente en piel (Zelent et al., 1989). En epitelios, p53 está restringido a las células menos diferenciadas y no puede ser detectado en las capas superiores más diferenciadas (Gusterson et al., 1991). Los miembros de las subunidades de AP1 son expresados diferencialmente en los estratos epiteliales (Welter y Eckert, 1995). AP1 está formado de homodímeros o heterodímeros de Jun o heterodímeros de Jun y Fos, que son productos de protooncogenes. Ambos

constituyen familias de multigenes de tres y cuatro diferentes miembros, respectivamente: *c-jun*, *junB* y *junD*; y *c-fos*, *fosB*, *fra1* y *fra2* (revisado en Vogt y Bos, 1990). El principal factor Jun de AP1 que se une a las secuencias de VPH-18 en queratinocitos humanos es JunB, que es el predominante en éstos así como en HeLa; en células C33 los complejos que se unen a éstas son con c-Jun y JunD, habiendo niveles bajos de los tres Jun en esta línea celular (Thierry et al., 1992). La secuencia de unión es cercana a la consenso del elemento responsivo al promotor de tumor TPA, llamada TRE (TGAGTCAG; Angel et al., 1987).

Un nucleosoma traslapa el promotor, sugiriendo que lo hace inaccesible a factores de transcripción (Stünkel y Bernard, 1999).

Por todo lo anterior, pareciera que la especificidad tisular mostrada por VPH es definida por una combinación de composición de sitios de unión, diferencias cuantitativas y cualitativas de factores transcripcionales y tal vez la presencia o ausencia de cofactores reguladores, así como del estado de diferenciación celular.

Finalmente, la LCR de VPH-18 es un activador mucho más fuerte de la transcripción que la del VPH-16 y es responsable del potencial de inmortalización más alto del VPH-18 comparado con VPH-16 (Barbosa y Schlegel, 1989; Romanczuk et al., 1991; Bartsch et al., 1992; Hoppe-Seyler y Butz, 1992; Bauknecht y Shi, 1998; Cid-Arregui et al., 1998a).

LOS RATONES TRANSGÉNICOS CON LA LCR DEL VPH-18

En muchos casos no es claro si las observaciones con el virus del papiloma *in vitro* reflejan propiedades biológicas reales o éstas pudieran resultar alteradas por el sistema de cultivo celular utilizado, representando sólo una pobre aproximación a las del medio ambiente natural. Como ejemplo de esto es el análisis del VPH-18 en células HeLa, las cuales pueden tener las características transcripcionales alteradas como resultado de su estado transformado.

La biología molecular y celular han proporcionado la tecnología para el desarrollo de la transgénesis. Los ratones transgénicos representan una herramienta invaluable para analizar las funciones de virus *in vivo* (revisado en Cid-Arregui et al., 1998a). En este modelo el transgén viral se encuentra establemente integrado en la línea germinal quedando presente en cada célula de la progenie. Este sistema amplía nuestro entendimiento sobre los requerimientos y el comportamiento de la expresión genética, así como nuestra comprensión de mutaciones inducidas en el genoma viral.

Los ratones transgénicos con VPH eran una necesidad para su estudio al no tenerse hasta ese momento un modelo *in vitro* que pudiera imitar la diferenciación epitelial.

En los ratones transgénicos con la LCR del VPH-18 como reguladora del gen bacteriano *lacZ* (β -galactosidasa), que previamente se reportaron (Cid et al., 1993), se encontró que la activación del transgén fue específica de células epiteliales en ciertos órganos como lengua, útero, testículo, intestino delgado y riñón. Además, se notó que en hembras la expresión del reportero variaba en el tracto genital, mientras que en fetos la actividad enzimática se detectó al término de la gestación. Esto sugería un papel hormonal en la regulación transcripcional de la región de control del VPH-18. Finalmente, se mostró que el tratamiento con glucocorticoides (dexametasona) modulaba al transgén en la lengua, lo que mostraba el potencial de utilizar hormonas o compuestos administrados exógenamente.

Entre las ventajas de nuestro sistema, aparte de las mencionadas ya, se cuenta por un lado con que la actividad del transgén es cuantificable y por otro que permite evaluar el control genético del VPH-18 en el contexto íntegro del animal.

HORMONAS ESTEROIDES Y RETINOIDES Y EFECTO EN LA TRANSCRIPCIÓN DEL VPH-18 *IN VITRO*

Los esteroides son una clase de lípidos que tienen una estructura básica común: el núcleo del anillo ciclopentanofenantánico (Figura 3A); las diferentes hormonas difieren en la composición de sus cadenas laterales, por ejemplo los corticoides y las hormonas sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos; Figura 3B). Los retinoides son moléculas lipofílicas, estructuralmente relacionadas con la vitamina A (retinol) (Figura 3A); cada región de la molécula puede ser modificada resultando en un número casi ilimitado de compuestos. Las acciones de estos reguladores son mediadas por receptores intracelulares. Los compuestos que se enlazan a un receptor dado y no transmiten la respuesta, ya sea total o parcialmente, son denominados antagonistas (Figura 3B).

Los receptores nucleares forman una superfamilia de proteínas relacionadas que unen hormonas esteroides (sexuales, glucocorticoides, mineralocorticoides, ecdisteroides en artrópodos), retinoides, hormonas tiroideas y vitamina D₃. Estos receptores comparten varias características estructurales como un dominio de unión a DNA (66-68 aa) con dos dedos de cinc, localizado entre el amino terminal y el dominio de unión a la hormona, el cual muestra un alto grado de homología con los otros miembros de la familia; un dominio de enlace al ligando en el extremo carboxilo que está relativamente bien conservado entre los diferentes receptores a hormonas; y regiones variables con poca homología, responsables para propiedades tales como translocación nuclear y *trans*-activación (Figura 8A). Los receptores a hormonas esteroides son proteínas fosforiladas con grupos sulfhidrilo, necesarios para la interacción con su ligando. En su estado nativo los receptores de esteroides son entidades complejas que consisten de la proteína asociada con otras macromoléculas (como proteínas de choque térmico –*heat shock proteins*) (revisado en Beato, 1989 y en Jensen, 1991).

El enlace al ligando (estado activado) es seguido típicamente por homo (para receptores a esteroides humanos) o heterodimerización (para los receptores de ácido retinoico, RARs) con la subsecuente unión del complejo receptor-ligando a secuencias específicas de DNA (de alrededor de 15 pb) llamadas elementos de respuesta a hormona (HRE). Los HRE son secuencias que contienen palíndromos perfectos, imperfectos o medios sitios repetidos directamente (como los RARs) o en repeticiones invertidas (en el caso de receptores de hormonas esteroides; Figura 7A), espaciados por un número determinado de pb (revisado en Mangelsdorf et al., 1995). Aunque secuencias consenso y perfectas han sido definidas para los principales tipos de receptores, los HRE raramente las conforman. Desviaciones de la secuencia consenso típicamente reducen la afinidad del receptor por el elemento y disminuyen su eficiencia como *enhancer* transcripcional. Los receptores actúan como factores de transcripción e influyen sobre el comportamiento de muchos tejidos entre especies de vertebrados. Ciertas células responden mejor, generalmente las que contienen un nivel elevado del receptor.

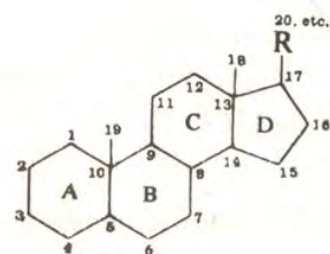
El receptor de progestinas es de 2 tamaños, A y B, siendo el primero una forma truncada del segundo en su extremo amino. Dos formas, α y β , han sido identificadas para el receptor de estrógenos. Las acciones de retinoides son predominantemente mediadas a través de la formación de heterodímeros entre los subtipos de RARs (α , β , γ) y los receptores X de retinoides (RXR α , β y γ) (revisado en Jensen, 1991 y en Mangelsdorf et al., 1995).

Los retinoides son reguladores clave del crecimiento y la diferenciación celular epitelial y han demostrado actuar como agentes quimiopreventivos y antitumorales en varios

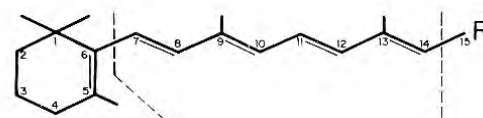
sistemas carcinogénicos (revisado en Moon y Mehta, 1991). El ácido retinoico (RA) ha sido un potente inhibidor del crecimiento *in vitro* de varias líneas celulares tumorales incluyendo a HeLa, provocando una reducción en los niveles de los productos de los oncogenes E6 y E7 (Bartsch et al., 1992; Castelán-Sánchez, I., comunicación personal). Glucocorticoides incrementan la transcripción de las secuencias de los genes E6 y E7 integradas en el genoma de células C-4I (von Knebel Doeberitz et al., 1988). Las hormonas esteroides ováricas estrógenos y progesterona controlan el crecimiento, diferenciación y función de útero y vagina. Asimismo, la región de control de VPH-18 contiene al menos un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE)/progesterona (PRE) (Chan et al., 1989).

En esta tesis se estudió, en sistemas de cultivo de células y en ratonas transgénicas, el efecto de hormonas esteroides sobre la transcripción temprana del VPH-18 y las posibles explicaciones y consecuencias que emergen de éstos. También análisis con RA y con ratones transgénicos que tienen al gen reportero para CAT.

A

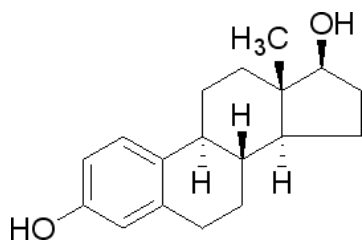


Un esteroide

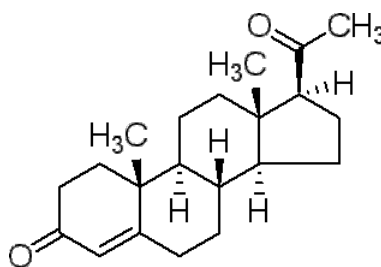


Un retinoide

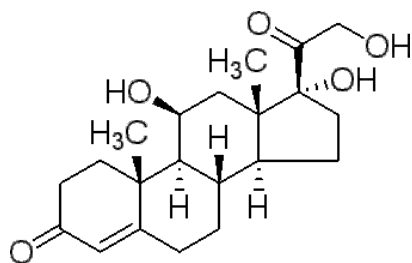
B



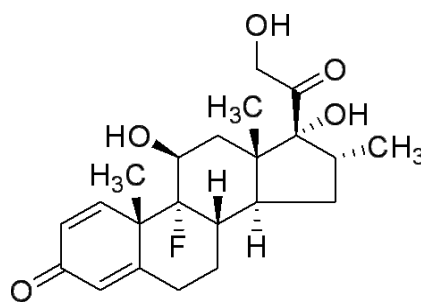
17β-Estradiol



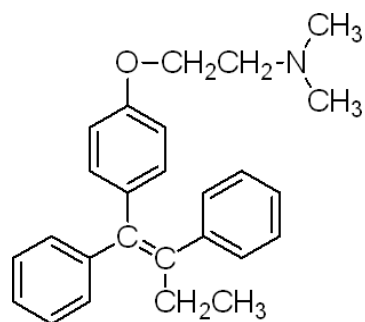
Progesterona



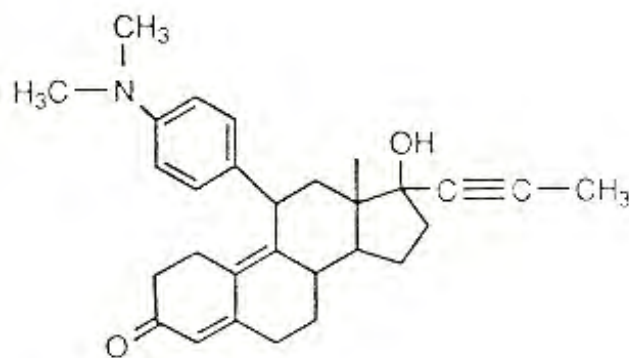
Cortisol



Dexametasona



Tamoxifeno



RU-486

Figura 3. Estructura química de los principales compuestos mencionados en la tesis.

(A) Estructura básica de los esteroides y retinoides. En el esteroide, las letras identifican a los anillos A, B, C y D, con la numeración mostrando la posición de los carbonos. En el retinoide se muestra el anillo (trimetilciclohexenilo), la cadena lateral de polieno (β -todo-*trans*) y el grupo polar, separados por líneas discontinuas; R = CH₂OH, retinol. R = COOH, ácido retinoico. R = CH₂OCOCH₃, acetato de retinol. Los grupos metilo se indican por líneas rectas.

(B) Fórmulas estructurales de hormonas y antagonistas. Estrógeno (estradiol), progesterona (en la testosterona cambia únicamente el R [= OH]), glucocorticoide (hidrocortisona o cortisol) y su análogo sintético dexametasona; los antagonistas tamoxifeno y RU-486.

JUSTIFICACIÓN

“Sol, que tú eres tan parejo
para repartir tu luz,
habías de enseñarle al amo
a ser lo mismo que tú”.
Corrido revolucionario

Dada la alta incidencia y mortalidad del CaCU, particularmente en poblaciones con bajo desarrollo socio-económico, el estudio de aspectos funcionales del agente causal se hace indispensable para profundizar en su comprensión y poder así diseñar terapias mejor orientadas a las pacientes. Las infecciones por el VPH están muy diseminadas en la población y la mayoría desaparece espontáneamente, pero una minoría (<10%) persiste siendo el principal riesgo para la carcinogénesis cervicouterina, lo que implica que otros factores en el ambiente o la hospedera contribuyen al proceso tumoral. Análisis epidemiológicos apuntan a los embarazos y a los anticonceptivos hormonales como cofactores sólo en mujeres positivas a VPH y se sabe que el virus responde transcripcionalmente a la estimulación hormonal *in vitro*. Sin embargo, las hormonas esteroides tienen un papel poco definido todavía en el CaCU. De aquí deriva la importancia de analizar los mecanismos fisiológicos y moleculares relacionados a las hormonas que dirijan la expresión de los oncogenes E6 y E7 del virus, controlada desde su región reguladora, la cual se considera como el primer paso en el proceso de la carcinogénesis inducida por VPH.

Además, este virus representa un excelente modelo para el estudio de la regulación genética eucarionte.

HIPÓTESIS

“Las hormonas esteroides regulan la actividad de la región de control de la transcripción del VPH-18 en células transfectadas en cultivo y en ratonas transgénicas”.

OBJETIVOS

GENERALES

Estudiar los mecanismos fisiológicos y moleculares, naturales e inducidos, que regulan la transcripción temprana del VPH-18 y así contribuir al conocimiento de la expresión de los oncogenes virales E6-E7.

PARTICULARES

Analizar el papel de hormonas esteroides sobre la transcripción temprana del VPH-18, utilizando cultivos celulares y ratones transgénicos.

Evaluar el efecto del (de los) GRE(s) en la expresión de la LCR completa del VPH-18 mediante una mutación puntual en transfecciones transitorias.

Examinar si el tejido genital, así como el estado fisiológico (embarazo y ciclo estral) de la ratona transgénica con la LCR del VPH-18, pudieran influir en la funcionalidad de la región reguladora temprana y en su caso, identificar los factores hospederos involucrados.

Determinar si hormonas esteroides exógenas (estradiol y progesterona) pueden modular la región de control del VPH-18 en el conjunto de un sistema animal y, en tal caso, si pudieran actuar entonces de una manera opuesta en presencia de antagonistas hormonales.

MATERIALES Y MÉTODOS

“Despacito y buena letra:
el hacer las cosa bien
importa más que el hacerlas”.
Antonio Machado

PLÁSMIDOS

Construcciones para la expresión de β -galactosidasa

Los plásmidos pLCR β gal A1, pLCR β gal A2 y pLCR β gal A1+2 fueron construidos por inserción del fragmento *Bam*H I de 1 051 pb, que contiene a la LCR completa del VPH-18 (Figura 2), en el sitio único *Sma* I del vector pC4-AUG- β gal (Thummel et al., 1988), antes del gen reportero *lacZ* (Figura 14). El recombinante pLCR β gal A1 tiene mutado el sitio AP1 distal; pLCR β gal A2, el proximal; y pLCR β gal A1+2, ambos (Figuras 13 y 14). Las mutaciones anulan la respuesta conferida por este factor (Thierry et al., 1992). Los plásmidos parentales (VPH-18 clonado dentro del sitio *Eco*R I de pBR322) con las LCRs mutadas en los sitios AP1 (PV18 A1, PV18 A2, PV18 A1+2) fueron proporcionados por la Dra. Françoise Thierry. En el caso de pLCR16 β gal 1 y pLCR16 β gal 2 (este último con la LCR clonada en orientación contraria) se introdujo el fragmento *Kpn* I/*Hind* III, con la LCR silvestre del VPH-16, también en el sitio *Sma* I de pC4-AUG- β gal. El plásmido parental pTZ LCR-16 fue un amable regalo del Dr. Karl Münger.

Para la clonación de la región de control del VPH-16 y del VPH-18 en el plásmido de expresión de *lacZ*, primero todos se purificaron mediante CsCl. El vector pC4-AUG- β gal se cortó con *Sma* I, se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó y lavó con etanol, resuspendiéndose en agua. Posteriormente los extremos se desfosforilaron con fosfatasa alcalina 15 min a 37 °C. De nuevo se extrajo, precipitó, lavó y resuspendió. Los plásmidos pHPV18 con las mutaciones (PV18 A1, PV18 A2 y PV18 A1+2) se digirieron con *Bam*H I para extraer las LCRs, mientras que el pTZ LCR-16 se cortó con *Kpn* I/*Hind* III. Todos se extrajeron con fenol-cloroformo, se precipitaron y lavaron con etanol. Se repararon los extremos cohesivos 45 min a temperatura ambiente con el fragmento Klenow y 1 μ l de cada dNTP [2.5 mM]. Se recuperaron las bandas reparadas de un gel con agarosa al 1% en TAE* que se corrió a 40 mA. La agarosa se disolvió con 1 ml de NaI a 37 °C por 30-45 min. Se agregaron 5 μ l de perlas de vidrio (*glass milk*, Bio 101), se mezcló con *vortex* y se dejó 30 min en hielo. Se centrifugó 5 min y se retiró el sobrenadante. Se agregó otro ml de NaI para lavar de agarosa, se agitó y se centrifugó 2 min. Se retiró sobrenadante. Se puso 1 ml de etanol al 70%, se revolvió suavemente y se centrifugó 2 min. Se retiró sobrenadante, golpe de centrifuga, se absorbió el resto y se dejó secar. Se adicionaron 15-20 μ l de TE, dejándose 30 min a 37 °C. Se centrifugó 3 min y el sobrenadante se cambió a otro tubo, guardándose a 4 °C. Posteriormente el vector (1 μ l ~ 105 ng) se ligó con cada uno de los 3 fragmentos *Bam*H I-*Bam*H I y con la LCR del VPH-16 en presencia de ligasa T4 con 1 μ l de ATP [1 mM]_f. Se pusieron 2 concentraciones del inserto (relaciones 3 y 10 respecto al vector). Al ser extremos romos se dejó a 16 °C toda la noche. Al otro día la mitad de la ligación se incubó con *Sma* I y después se utilizó para la transformación de bacterias competentes. El resto se guardó a 4 °C. Debían crecer más colonias en las clonaciones que en el control (vector sin inserto).

Plásmidos de expresión del receptor de glucocorticoides

Estos plásmidos expresan el cDNA del receptor de glucocorticoides activado (GR) o mutante (GRm) (Figura 8A). El GR de rata constitutivamente activo (aa 3-556 del receptor silvestre) en ausencia de la hormona es una forma truncada en el extremo carboxilo, sin el dominio de unión al ligando, que estimula fuertemente la *trans* activación (Severne et al., 1988). El GRm (3-S482-556) codifica un GR mutante nulo, sin la actividad biológica (Cys482 $\rightarrow$ Ser). Por comparación, el receptor silvestre de rata tiene 795 aa por 777 del humano, siendo altamente homólogos.

PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Con este método se puede llegar a obtener una buena eficiencia de transformación (en teoría 10⁷ colonias por μ g de DNA). Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 α .

* Ver apéndice 3.

La bacteria se cultivó en agitación a 37 °C durante toda la noche en medio SOB* complementado con MgSO₄ a 10 mM. Se inocularon 500 µl de este precultivo en 50 ml de SOB con MgSO₄ y se creció en agitación moderada a 37 °C hasta alcanzar una D.O.₅₅₀ de 0.5. Entonces el cultivo se transfirió a un tubo Falcon estéril y se enfrió 10 min en hielo. Las bacterias fueron centrifugadas a 2 500 rpm por 12 min a 4 °C, eliminándose el sobrenadante cuidadosamente y colocando los tubos invertidos sobre un pañuelo desechable. La pastilla se resuspendió suavemente (con pipetas) en 16 ml de la solución RF1* y se incubó 15 min en hielo. Se centrifugó y la pastilla resultante se resuspendió en 4 ml de la solución RF2*. Se dejó 15 min en hielo. Se distribuyó en alícuotas de 200 y 400 µl en tubos Eppendorf previamente enfriados. Se almacenaron a -70 °C.

TRANSFORMACIÓN

Las bacterias competentes de la cepa DH5α fueron transformadas con las construcciones que contienen a la LCR del VPH-18 silvestre (P₁₀₅-wt) y mutada en el GRE (P₁₀₅-GREm); a la LCR del VPH-18 mutada en los sitios API (pLCRβgal A1, pLCRβgal A2, pLCRβgal A1+2) y sus parentales PV18 A1, PV18 A2, PV18 A1+2 y pC4-AUG-βgal; a la LCR del VPH-16 (pLCR16βgal 1 y pLCR16βgal 2); y con los de expresión del GR y GRm.

Un volumen de 200 µl de la suspensión de bacterias competentes se mezcló con el plásmido o con el 0.5 v de la ligación durante 20 min en hielo. La mezcla se puso 90 seg a 42 °C y después 2 min en hielo. Se añadieron 800 µl de medio SOC* y los tubos se incubaron en agitación por 50 min. Se tomaron 50 µl para esparcir sobre una caja de medio LB* con agar conteniendo ampicilina (bacteria diluida). El resto del cultivo se centrifugó 1 min a 10 000 rpm, se tiró el sobrenadante y con el remanente (~100 µl) se resuspendió la pastilla y se esparció en otra caja (bacteria concentrada). Las cajas se dejaron toda la noche a 37 °C.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Minipreparación

Para probar las construcciones con las LCRs clonadas en pC4-AUG-βgal (pLCRβgal A1, pLCRβgal A2, pLCRβgal A1+2, pLCR16βgal 1 y pLCR16βgal 2), así como su orientación, se obtuvieron los plásmidos de las bacterias transformadas para después de cortarse y correrse en geles de agarosa al 0.8% en TBE* que contenían 1 µg/ml de bromuro de etidio.

Se tomaron las candidatas con un palillo de dientes y se creció cada una en 2 ml de medio LB* con ampicilina [100 µg/ml] toda la noche a 37 °C con agitación. El cultivo se empastilló a 14 000 rpm por 3 min en Eppendorf. Se retiró todo el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 200 µl de TS*. Se mezcló hasta homogeneizar con *vortex*. Se agregaron 200 µl de ELT* y se agitó gentilmente. Se incubó 20 min a temperatura ambiente para posteriormente ponerse en baño María a 70 °C por 30 min. Se centrifugó 10 min a temperatura ambiente. Se descartó la pastilla y se adicionó 1 v igual de la solución de PEG*. Se agitó gentilmente (3 veces), para luego dejarse 20 min a temperatura ambiente y centrifugarse 5 min. Se retiró bien todo el sobrenadante y el DNA se resuspendió en 20 µl de TE*. Los 500 µl de cultivo que sobraron se guardaron a 4 °C.

Maxipreparación

Para transfecciones y clonaciones se necesitaron de cantidades mayores de DNA seguidas de su purificación a través de un gradiente de CsCl. Se realizó para los plásmidos con el gen bacteriano de CAT, P₁₀₅-wt y P₁₀₅-GREm; con los del gen reportero para β-galactosidasa pLCRβgal A1, pLCRβgal A2, pLCRβgal A1+2, así como sus parentales pC4-AUG-βgal, pTZ LCR-16, PV18 A1, PV18 A2 y PV18 A1+2; y con los de expresión GR y GRm.

Un inóculo con 5 ml de un precultivo bacteriano de la noche previa se añadió a 500 ml de medio LB* con ampicilina [50 µg/ml]. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación hasta que alcanzó una D.O.₆₀₀ de 0.6. Entonces el plásmido se amplificó por adición de cloranfenicol [170 µg/ml] o con tetraciclina [10 µg/ml] y se continuó la incubación toda la noche. Posteriormente, el cultivo se empastilló a 6 000 rpm durante 10 min. Se eliminó todo el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 4 ml de la solución de TS*, se transfirieron a un tubo SW40 de polialómero, y se adicionaron 4 ml de la solución de ELT*. El tubo se agitó lentamente y se dejó 10 min a temperatura ambiente y después 10 min a 70 °C. Posteriormente se centrifugó a 40 000 rpm

* Ver apéndice 3.

durante 30 min en ultracentrífuga. El sobrenadante se precipitó volumen a volumen con la solución de PEG*, durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3 000 rpm por 10 min y se resuspendió con 3 ml de TE*.

Extracción y precipitación de DNA

Para limpiar el plásmido obtenido de minipreparaciones o tratado con enzimas.

Se llevó a un volumen de 100 μ l con TE*, añadiéndose 0.5 v de fenol (con hidroxiquinoleína 0.1% y pH > 7.8) y 0.5 v de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), seguido de agitación y centrifugación por 2 min a temperatura ambiente para recuperar fase acuosa. (Al fenol-cloroformo:isoamílico sobrante se le agregó 1 v igual de TE, se agitó y centrifugó –reextracción de la fase fenólica– y la fase superior se juntó con la primera. Se repite el fenol-cloroformo:isoamílico al total si se considera necesario). Se adicionó 1 v de cloroformo:alcohol isoamílico, se agitó y se centrifugó 4 min, y a la fase acuosa recuperada se le repitió este paso. Al DNA, ya sin proteína, se le añadió 1 v de acetato de amonio 4 M y 2.5 v (del total) de etanol absoluto; se agitó levemente. Se dejó precipitando a -20°C toda la noche (opcional). Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 min al menos, a 4°C , eliminándose el sobrenadante. El DNA se lavó con 1 ml de etanol al 80%, agitando gentilmente, se centrifugó 15 seg, se retiró el alcohol, se dejó secar (no ressecar) y se resuspendió en TE.

Purificación del DNA en gradientes de cloruro de cesio

La purificación de las moléculas de plásmido superenrollado provenientes de la maxipreparación fue por centrifugación en un gradiente de densidad de CsCl.

Se adicionó 1 g de CsCl por cada ml de la mezcla de DNA plasmídico-TE* y se disolvió por inversión. Por cada 10 ml de la mezcla CsCl-DNA-TE se añadieron 0.8 ml de bromuro de etidio [10 mg/ml]. Densidad final 1.55 g/ml. La solución se introdujo en tubos Quick-Seal® para ultracentrifugarse en un rotor NVT 90 por 3 h a 20°C a velocidades de entre 90 000 a 80 000 rpm y con desaceleración lenta. Las moléculas de DNA se trasladan a posiciones en donde sus densidades son iguales a la solución de CsCl. Cuando fue necesario, la localización de las moléculas de DNA dentro del tubo de centrífuga pudo determinarse por absorción de luz UV. Con una jeringa, bisel de la aguja arriba, se tomó cuidadosamente la banda inferior, agujerando primero el extremo superior del tubo, para permitir la entrada del aire.

El bromuro de etidio del plásmido se removió con isopropanol, mezclando y removiendo la capa superior de color violeta rosáceo y repitiendo hasta que quedara incolora. La capa inferior contenía al plásmido. El DNA se limpió de CsCl por diálisis contra TE, 3 veces. La solución con el DNA se cuantificó a 260 nm. Si era necesario, el DNA se precipitaba para concentrarlo como se mencionó en el apartado anterior.

CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron las líneas celulares humanas C33, la cual no contiene DNA de VPH, y HeLa (derivada de un carcinoma cervical), la cual lleva integrado a su genoma celular copias del DNA del VPH-18. La primera se creció con suero fetal al 10%, mientras que la segunda fue en suero neonato al 10%. Además, células COS (CV-1 de riñón de mono verde africano transformadas con SV40) crecidas con 10% de suero fetal (Gibco).

Para probar el probable efecto del éster de forbol TPA sobre la región reguladora del VPH-18 se utilizó la clona F4, creada en nuestro laboratorio a partir de fibroblastos de ratón NIH 3T3 tranfectados establemente con la construcción pURR18*lacZ* (pLCR β -gal; Ovseiovich et al., 1994). Las células F4 se crecieron durante 1 o 3 días anteriores al tratamiento con TPA [100 ng/ml] (disuelto en acetona) en 2% de suero fetal de bovino en D-MEM, en vez del 7% normalmente usado, y se cosecharon inmediatamente después de la adición.

Todas estas líneas se crecieron en D-MEM (Dulbecco's Mod. Eagle Medium, Gibco BRL), suplementado con penicilina (bencilpenicilina, Pengesod^{MR}, Lakeside^{MR}) [100 U/ml] y estreptomycin (sulfato de estreptomycin, Estrepto-monaxin^{MR}, Lakeside^{MR}) [100 μ g/ml].

En el caso de las células MCF7, se trasfectaron en medio MEM-EARLE sin rojo fenol, L-glutamina ni NaHCO_3 (Seromed, Biochrom KG) y cada 100 ml se complementaron con 200 μ l de glutamina 200 mM, 222 μ l de HEPES 10 mM, 1 ml de insulina 100 U/ml (Humulin^{MR} R, Lilly^{MR}), 1 ml de aa no esenciales 0.1 mM (Gibco), 10% de suero fetal bovino inactivado, además de los antibióticos penicilina y estreptomycin. Para inactivar el suero se mezclaron 0.5% de Norit-A (carbón activado) con 0.05% de *dextrán* y 0.14 M de NaCl en agitación por 3 h a 4°C . Cien ml de suero fetal bovino se pusieron con 5 ml de la solución a 55°C por 30

* Ver apéndice 3.

min y pasado ese tiempo se centrifugaron por 15 min a 2 500 rpm para recuperar el suero y se filtró con 0.22 μm . Se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El tratamiento con 17β -estradiol se agregó a $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ en etanol (10 μl) por 24 h.

El pasaje de las células fue por tripsinización (1 ml) seguida por centrifugación en medio con suero, para neutralizar la tripsina*. Todas las líneas se mantuvieron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera húmeda con CO_2 al 5%.

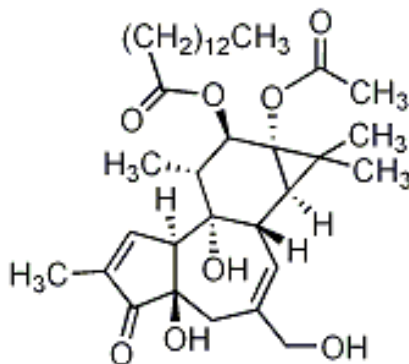


Figura 4. Molécula de TPA.

TRANSFECCIONES

Transfección por el método de fosfato de calcio

Las células C33, COS, HeLa y MCF7 fueron transfectadas por la técnica de coprecipitación con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

La noche previa se sembraron 1×10^6 células por caja de 6 cm (p60). La noche siguiente, se mezclaron en frío un total de 10 μg por caja del plásmido $\text{P}_{105}\text{-wt}$ con o sin GR o GRm, incluyendo el acarreador (pGEM) si fuese el caso, con 425 μl de HeBS* a temperatura ambiente. La mezcla se agitó suavemente 10 seg por 4 veces durante 10 min con ayuda de un *vortex*. Se agregaron 25 μl de CaCl_2 2 M (guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se agitó de la misma manera. La reacción se goteó esparciendo directamente sobre las células y se mezcló suavemente. A las 14-16 h se cambió el medio de crecimiento suplementado con suero y antibióticos por nuevo. A las 24 h después (40 h postransfección) las células se cosecharon.

Electroporación

Las células HeLa fueron transfectadas por la técnica de electroporación.

Para cada reacción se diluyeron en una sola celda (Gene Pulser®, Bio-Rad, distancia entre electrodos 0.4 cm) 50 μg del plásmido $\text{P}_{105}\text{-wt}$ o del $\text{P}_{105}\text{-GREm}$ en un volumen final de 200 μl completados con HeBS*. Se agitó con *vortex* y se agregaron 200 μl que contenían el total de células de 5 cajas de cultivo de 10 cm (p100) a confluencia (previamente lavadas con PBS*, despegadas con tripsina*, neutralizándose con D-MEM suplementado con suero neonato al 10%, centrifugadas 3 min y resuspendidas en el mencionado volumen de HeBS). La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar 10 min en hielo. Las condiciones de electroporación fueron 960 μF y 260 V. Se dejaron de nuevo 10 min en hielo. La reacción se transfirió a 5 cajas p60 ya con el medio de cultivo suplementado con antibióticos y 10% de suero neonato. A las 14-16 h se cambió medio y se añadió el tratamiento con el glucocorticoide sintético dexametasona (24 μl ; Sigma). A las 40 h postransfección las células se cosecharon y se obtuvieron los extractos.

COSECHA Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

Primeramente, la capa de células se lavó 2 veces con TD* a temperatura ambiente. Posteriormente se raspó en 1 ml de TD a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La suspensión se centrifugó 2-3 min. La pastilla celular se resuspendió en 200 μl de Tris-glicerol-DTT* con *vortex* y se las células se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El resto se siguió como lo describieron Cid-Arregui y colaboradores (1998b, CAT Assay, pasos 4 y 5, apéndice 2), con la opción de continuar con el ensayo o almacenar el extracto en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

* Ver apéndice 3.

ENSAYO CON ONPG

El ensayo se utilizó para medir la actividad de β -galactosidasa en extractos de células de la clona F4.

La concentración de proteínas se estandarizó mediante el método reportado por Bradford (1976), tomando 10 μ l de la muestra y calculando el equivalente a 0.5, 1 o 2 D.O.

El extracto se aforó a 1 ml con amortiguador de fosfatos*. Se agregaron 200 μ l de la solución de ONPG (Figura 5) 4 mg/ml y se incubó 1 h a 37 °C. La reacción se detuvo con 500 μ l de Na_2CO_3 1 M y se leyó a 420 nm contra un blanco con el extracto de células 3T3, colocado bajo las mismas condiciones.

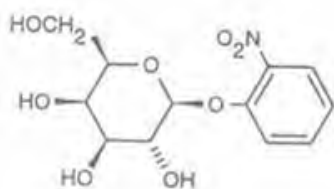


Figura 5. Molécula de ONPG.

Ésta es convertida a galactosa y *o*-nitrofenol por la β -galactosidasa.

ENSAYO CAT

Este ensayo para medir la actividad del gen reportero en extractos celulares después de la transfección fue descrito por Cid-Arregui y colaboradores (1998b, sección 2, apéndice 2), incubándose 1 h con 4 μ l de cloranfenicol- ^{14}C .

Las muestras fueron normalizadas mediante la cuantificación de proteínas en base al método de Bradford (1976). Para el caso de células HeLa electroporadas con P₁₀₅-wt y tratadas con dexametasona el ensayo se realizó con 180 μ g de proteína total.

La determinación de radioactividad de la forma acetilada y la no acetilada del cloranfenicol se llevó a cabo en líquido de centelleo* (ICN Radiochemicals) en un contador para tal fin.

MUTACIÓN DEL GRE EN LA REGIÓN REGULADORA DEL VPH-18

El cambio de base en el elemento de respuesta a glucocorticoides (C7843 $\rightarrow$ A; Figura 7B) se realizó por mutagénesis sitio dirigida por oligonucleótido (Muta-Gene[®] M13 *in vitro* mutagenesis, Bio-Rad). Este método consistió en clonar la región de control del VPH-18 (fragmento *Bam*H I-*Bam*H I) en el DNA de doble cadena (forma replicativa) del fago M13. El vector recombinante se introdujo en una cepa de *E. coli* doble mutante *dut* (inactiva a la dUTPasa) *ung* (inactiva la uracilo N-glucosidasa) que produce bacteriófagos con DNA de cadena sencilla que tiene cierta cantidad de uracilos en vez de timinas. Esta cadena ya purificada se utilizó como molde para la síntesis *in vitro* de una cadena complementaria mediante un oligonucleótido con la mutación puntual como cebador. La doble cadena se usó para transformar una cepa silvestre, que selecciona contra la cadena con uracilos, obteniendo así bacteriófagos que contienen el DNA de cadena sencilla sin uracilos con la mutación en el GRE. El proceso se siguió de acuerdo al manual incluido y no se describe aquí.

RATONES TRANSGÉNICOS CON LA LCR DEL VPH-18

Todos los transgénicos contenían a la LCR completa del VPH-18 (fragmento *Bam*H I; Figura 2).

Se utilizó descendencia de ratones transgénicos que fueron retrocruzados a la línea parental no transgénica (C57Bl/6J X C3HeB/FeJ, también llamada B6C3), y así fueron obtenidos tanto hemicigóticos F1 transgénicos como no transgénicos para nuestros experimentos.

Para los ratones de la serie YY1 se utilizaron las líneas M1 (7837-GCAGCACATACTATACccgcggTgAATtCagcgAACAAATTGTAG-23) y M2 (GCAGCACATAtgATgCccgcggTTAATACTTTTAAACAATTGTAG), con mutaciones en la región reconocida por esta proteína celular (Figura 13) dentro de la LCR del VPH-18 seguida del gen reportero para CAT. La línea M1 originalmente contaba con 5 sublíneas y la M2 con 6. De éstas sobrevivieron 3 y 2

* Ver apéndice 3.

sublíneas, respectivamente. Se tenía además la línea WT que contenía la LCR silvestre como regulador del gen *cat* y de ésta había originalmente 4 sublíneas de las que sobrevivió sólo una.

Para medir la actividad en este caso, como en los experimentos con retinoides, se prefirieron machos, para evitar las variaciones en la actividad del transgén que pudieran presentar las hembras durante el ciclo del estro. En estos experimentos también hubo un grupo de ratones no transgénicos.

MANEJO Y TRATAMIENTO DE LOS RATONES

Todos los ratones fueron mantenidos sin condiciones especiales, bajo ciclos de luz-oscuridad 12:12, con alimento y agua *ad libitum*.

Antes de las ovariectomías se adormeció a las ratonas con Anestésal® (pentobarbital sódico [6.3g/100ml]) diluido 1:10 en PBS y aplicado a concentración final de 90 mg/kg de peso corporal. Para las operaciones se realizaron incisiones longitudinales del lado dorsal, a la altura de los ovarios, extrayéndolos completos junto con los oviductos.

Los hormonales y antihormonales se prepararon por separado en soluciones *stock* [10 mg/ml de etanol] para posteriormente mezclarse, evaporar el solvente (a 37 °C toda la noche) e inyectarse a volumen final de 100 µl en propilén-glicol. Las hembras con ovariectomía, transgénicas y no transgénicas, fueron inyectadas 3 veces, ya sea con el vehículo o con el tratamiento respectivo. La dosis de 17β-estradiol aplicada (15 µg/día) es equivalente a la producción durante el embarazo en la mujer (> 30 mg/día; Heap, 1982) y logra la expresión del receptor de estrógenos, convirtiéndolo además al estado activo (Leavitt et al., 1974). La cantidad de progesterona administrada (500 µg) es proporcionalmente mayor a la que se produce diariamente en mujeres hacia el tercer trimestre del embarazo (250-350 mg; Taylor y Martin, 1998); las dosis diarias de tamoxifeno (150 µg) y de RU-486 (5 mg) fueron en proporción más altas que las farmacéuticas en humanos (20-40 mg y 600 mg al día, respectivamente; Goldfien y Monroe, 1998).

El antagonista RU-486 (RU 38 486; mifepristona; 17β hidroxí 11β[4-dimetilaminofenil] 17α [1-propinil] estra 4,9-dieno-3-ona) es un esteroide sintético y fue regalado por Roussel Uclaf (Francia).

En el caso de retinoides se emplearon machos transgénicos para evitar las variaciones del transgén LCR-HPV-18-*lacZ* debidas al ciclo estrual. Para el tratamiento con acetato de retinol (acetato de retinil) todo *trans* sintético (Sigma), éste se disolvió primero en DMSO [1mg/50 µl] (*stock* almacenado a -20 °C) y se llevó a 1ml con PBS. Se aplicó intraperitonealmente (i.p.) a 5, 10 o 50 mg/kg de peso del animal en un volumen total de 500 µl alcanzado con PBS, 1 dosis diaria por 1 o 2 días; para la serie con 5 mg/kg 1-6 días se usó una solución inicial de 2 mg/ml en DMSO que se ajustó a un volumen final de 200 µl inyectados i.p. En el caso del RA todo *trans* (Sigma) se disolvieron 50 mg/ml de DMSO y el volumen se ajustó a 60 µl con el solvente, inyectándose i.p. 5 o 100 mg/kg por 1 o 2 días consecutivos (Tabla 1). Para probar el efecto de progesterona (Sigma) en machos, una solución a 100 mg/ml en DMSO se administró i.p. (una vez por día) a 30 mg/kg de peso, permitiéndose tuviera efecto por 12, 24 y 48 h. Todos los ratones se sacrificaban al mismo tiempo. El tiempo mínimo postratamiento dejado antes de sacrificar a los animales (24 h) se considera suficiente para afectar la transcripción y subsecuente traducción de la enzima (Cid et al., 1993).

Los órganos para los experimentos (lengua, intestino delgado [duodeno], riñón, testículo, epidídimo, útero, vagina y cérvix) fueron tomados como lo reportan Cid-Arregui y colaboradores (1998a, sección 3, apéndice 1). Lengua, riñón y útero fueron cortados en dos partes aproximadamente iguales. Después de la disección, los órganos que se utilizarían para la obtención de los extractos crudos de proteína fueron congelados inmediatamente en N₂ líquido y guardados a -70 °C, excepto para la tinción de vagina y cérvix completos.

TAMIZACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

Obtención de DNA a partir de la cola del ratón

Para probar la presencia del transgén en cada ratón de experimentación o de mantenimiento de la línea, primero se necesitaba aislar su DNA genómico. Éste se obtuvo de la cola del ratón (Cid-Arregui et al., 1998a, sección 1, apéndice 1).

El extremo distal de cada cola se cortó (~ 1 cm) dentro de un tubo Eppendorf de 2 ml. Se agregaron 700 µl de la solución TESS* + 40 µl de SDS al 10% + 16 µl de NaCl 5 M + 35 µl de proteinasa K [10 mg/ml en agua] (Merck) y se dejó a 56 °C con agitación toda la noche. Al otro día se añadieron a cada tubo 250 µl de NaCl 6 M, se dejaron 5 min en agitación seguidos de 10 min de centrifugación. Se recuperaron 750 µl del sobrenadante y se les adicionaron 500 µl de isopropanol. Dos min de agitación y 5 min de centrifugación. Se

* Ver apéndice 3.

eliminó bien el sobrenadante y el DNA se lavó con 500 µl de etanol al 70% seguido de golpe de centrifuga hasta quitar el remanente. El DNA se resuspendió con 100 µl de TE* y se midió su concentración con 10 µl.

La relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm fue generalmente de alrededor de 1.7-1.8.

Desnaturalización del DNA genómico de ratón

Diez µg de DNA por ratón se llevaron a 400 µl con TE pH 7 y se agregaron 40 µl de NaOH 3 M (0.1 v). Se desnaturalizaron a 68 °C durante 30 min a 1 h y rápidamente se pasaron a hielo. La reacción se neutralizó con 440 µl (1 v) de CH₃COONH₄ 2 M, agitándose.

El volumen completo se cargó por pozo en una unidad de *slot blot*.

Transferencia del DNA genómico al papel de nitrocelulosa

La hemicigocidad fue verificada por análisis de DNA tipo *slot blot* (Figura 12).

La unidad (MinifoldII) armada contenía en su interior un papel de nitrocelulosa de 0.45 µm (con una esquina cortada) que reposaba sobre 2 papeles Whatman 3MM, todos previamente mojados en la solución neutralizadora 1 M. El DNA desnaturalizado se cargó en cada pozo con ayuda de vacío. El filtro se puso a secar de 5 a 10 min bajo lámpara normal y posteriormente el DNA se fijó con 2 ciclos de luz UV en un UV Stratalinker 2 400 (1 200 µJoules X 100, Stratagene). Después se puede guardar a temperatura ambiente.

Prehibridación, hibridación y lavados

El filtro con el DNA de ratón se incubó en la solución de prehibridación* a 42 °C durante 1 h, evitando burbujas dentro la bolsa usada para este fin. El DNA de esperma de salmón era desnaturalizado por 5 min en agua hirviendo y luego enfriado en hielo antes de agregarse a la solución. (Si se alarga la incubación toda la noche, al otro día se cambia por solución nueva sin el esperma de salmón.)

La sonda marcada se calentó en baño María 5 min e inmediatamente se enfrió en hielo antes de mezclarse con la solución de prehibridación, dejándose hibridar a 42 °C toda la noche.

Al otro día el filtro se lavó con una solución de SSC* 2X + SDS al 0.1% durante 10 min en agitación a temperatura ambiente por 2 veces. Se continuó con 3 lavados con una solución precalentada de SSC 0.2X + SDS al 0.1% por 30 min cada vez a 65 °C. Finalmente, el filtro se dejó secar a temperatura ambiente y se expuso con pantalla intensificadora a -70 °C.

Marcaje de la sonda de DNA

La positividad de los ratones se verificó por la hibridación de su DNA con el transgén (ya sea completo o sólo la región de control del VPH-18; Figura 2).

La sonda se marcó radioactivamente en presencia de [α -³²P] dCTP con ayuda del fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I en base al método reportado por Feinberg y Vogelstein (1983). Posteriormente la mezcla de reacción se pasó a través de una columna de aproximadamente 10 cm de Sephadex G-50 equilibrada con TE* y SDS al 0.1%, para remover los nucleótidos no incorporados. El DNA marcado se encontraba en el primer pico. Alternativamente, se centrifugaba a 2 k rpm 5 min para acelerar la obtención del DNA marcado a través de la columna la cual era, en tal caso, previamente centrifugada por 2 min.

DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL TRANSGÉN

La actividad enzimática fue detectada en órgano íntegro (vagina-cérvix); extractos crudos de órganos completos (intestino delgado, testículo, vagina o epidídimo) o de mitades (lengua, útero o, riñón); o en secciones de tejido (vagina).

Para la detección de β -galactosidasa en vagina-cérvix íntegros con X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosido), a la solución teñidora recién preparada se le agregó MgCl₂ a 2 mM, K₃Fe(CN)₆ a 5 mM y K₄Fe(CN)₆ a 5 mM y posterior a la tinción, que se puede extender toda la noche si es necesario, el órgano se lavó con PBS y se secó para realizar la segunda fijación.

La preparación de los extractos crudos de proteína a partir de los órganos, en 500-2 000 µl de amortiguador PM-2, fue reportada por Cid-Arregui y colaboradores (1998a, sección 5, apéndice 1). Éstos se usaron en 3 tipos de ensayo: colorimétrico con ONPG; quimioluminiscente con AMPGDTM, y CAT con cloranfenicol-¹⁴C. La concentración se determinó por duplicado mediante el ensayo de proteína (Bio-Rad) basado en el procedimiento de Bradford (1976), para estandarizar las muestras. El reactivo se diluyó al 20%

* Ver apéndice 3.

(v/v) en el amortiguador PM-2. Para lengua se colocaron 2-4 μ l del extracto total; para intestino delgado 2 μ l o 12 μ l de una dilución 1:10; para riñón y testículo: 2 μ l del total o 50 y 75 μ l y 50 y 100 μ l, respectivamente, de una dilución 1:50; para epidídimo 2 μ l; para útero 2 o 10 μ l; y para vagina 3 μ l.

Para la cuantificación de actividad β -galactosidasa con el ONPG se utilizaron por reacción 100 o 200 μ g de proteína, para lengua; para intestino delgado 200 o 400 μ g; epidídimo 200 μ g; útero 200 y 400 μ g; para vagina 100 o 200 μ g. Los 800 μ g de ONPG se disolvieron en 200 μ l de PM-2 y se agregaron al extracto de proteína diluido en 800 μ l del mismo amortiguador, para empezar la reacción. El tiempo de incubación necesario generalmente fue de 1 h, excepto para intestino delgado para el que fueron necesarias hasta 10 h o, en una ocasión, 12 h para epidídimo. En el caso de este último órgano, con 100 o 200 μ g se utilizó también el competidor (ver más abajo) a concentración final de 1 mM por 4-6 h, respectivamente.

El ensayo quimioluminiscente (Galacto-LightTM) se usó para lengua (10 y 20 μ g), intestino delgado (10, 20, 100 y 200 μ g), riñón (25, 50, 100 y 200 μ g), testículo (25, 50, 100 y 200 μ g), epidídimo (10 y 20 μ g), útero (10, 20 y 40 μ g) y vagina (10 y 40 μ g), llevándose a volúmenes iguales de 10 o 20 μ l con PM-2 y agregándose 100 o 200 μ l del amortiguador de reacción, respectivamente. En ocasiones (intestino delgado, riñón, testículo, epidídimo) también se añadió antes de iniciar el ensayo *D-Galactonic acid γ -lactone* (*D-Galactono-1,4-lactone* [100 mM]; Sigma), un competidor que debería reducir la actividad endógena de fondo, a concentración final de 1 o 4 mM. Las reacciones se dejaron incubando con el amortiguador por una hora a temperatura ambiente. Las determinaciones cuantitativas del ensayo fueron realizadas en un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold).

El ensayo para detectar la actividad del gen reportero para la CAT en ratones transgénicos se reportó por Cid-Arregui y colaboradores (1998a y b, secciones 8 y 2, respectivamente), y se realizó con 200 μ g del extracto, incubándose con 8 μ l de acetil-coenzima A y 1-3 μ l de cloranfenicol-¹⁴C por aproximadamente 1h.

NORTHERN BLOT

Extracción, purificación y análisis de RNA

Para la obtención del RNA total se siguió básicamente el método descrito por Sambrook y colaboradores (1989), con modificaciones. Brevemente, el órgano (lengua) se homogeneizó durante 1 min con *Polytron* en 1.5 ml de amortiguador con GTC (a 4 M, β -mercaptoetanol 1% en fresco). Se agregó *Sarcosyl* al 0.5%, agitándose gentilmente. Se cambió a un tubo Eppendorf, y se centrifugó por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se pipeteó lentamente en tubos SW60Ti (previamente limpiados con GTC) que contenían 3 ml de CsCl 5.7 M y fueron rellenados con el amortiguador con GTC. Se centrifugó a 40 k rpm por 12 h a 20 °C. La pastilla se lavó con etanol al 70% y posteriormente se disolvió en 270 μ l de agua con DEPC* más 30 μ l de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 900 μ l de etanol, transfiriéndose a un Eppendorf y dejándose a -70 °C 30 min. El RNA ya a temperatura ambiente se centrifugó 10 min a 4 °C, se lavó con etanol al 70%, centrifugándose 5min. El sobrenadante se secó con *speed vac* 10 min y el RNA se resuspendió en 30 μ l de agua con DEPC. Una dilución 1:200 se cuantificó a 260 nm y el resto se guardó a -70 °C. Se mezclaron 10 μ g con el amortiguador de carga para RNA* y 6 μ l de bromuro de etidio [0.5 mg/ml], precalentándose a 65 °C por 15 min y enfriándose en hielo antes de cargar en el gel. Éste se preparó al 1% de agarosa con MAE* 1X y formaldehído [2.2%]_f y se precorrió a 100 V en el amortiguador de electroforesis* 15 min. La corrida duró 2-3 h a 100-150 V. El gel se fotografió bajo luz UV y se lavó 2 veces con 500 ml de SSC* 1X 20 min y se transfirió toda la noche con SSC 10X a papel de nitrocelulosa, el cual se equilibró con este último por 15 min previamente. Al otro día el papel se lavó 5 min con SSC 1X, se secó bajo la lámpara y recibió 2 ciclos de *cross-link*. La prehibridación, la hibridación con la sonda LCR-HPV-18-*lacZ* y los lavados se siguieron como se menciona arriba.

* Ver apéndice 3.

RESULTADOS

“A menos que esperes lo inesperado nunca encontrarás la verdad, pues es difícil de descubrir y duro de alcanzar”.
Heráclito de Éfeso

Los resultados de esta tesis se agrupan en dos grandes rubros. En el primero se presenta el estudio del elemento de respuesta a glucocorticoides en la región larga de control del VPH-18. El papel de los glucocorticoides fue analizado tanto utilizando un plásmido que expresaba constitutivamente el GR en células C33, las cuales no lo tienen, como en células HeLa, en las que el receptor se activa con ayuda de la hormona. En ambos casos hubo un aumento transcripcional muy moderado y la respuesta fue sólo con la LCR silvestre y no con la que tenía al GRE cambiado en una base. En la segunda parte se muestran resultados no publicados para células y ratones transgénicos que constituyen avances que podrían servir de base a futuras investigaciones con el propósito, entre otros, de que no se necesite repetir un camino ya recorrido. Aquí se encontrarán los tratamientos con TPA, RA y las mutaciones en el sitio de reconocimiento a YY1. Finalmente, se presentan los datos que muestran la importancia de las hormonas femeninas en la regulación de la transcripción del VPH-18 en ratonas transgénicas. Durante el embarazo y el ciclo del estro, la actividad seguía los niveles endógenos de hormonas. La ovariectomía abolió la expresión y ésta se recuperó al inyectar estradiol, mientras que sus antagonistas redujeron esta recuperación.

PRIMERA PARTE EL SISTEMA DE CÉLULAS EN CULTIVO

Se sabe que el VPH tiene especificidad por ciertas líneas celulares. Con el objeto de poder evaluar el efecto de los glucocorticoides, primeramente quisimos validar las células en que el promotor viral mostrara una adecuada funcionalidad bajo nuestras condiciones de laboratorio. Para este efecto ensayamos su transcripción en dos líneas diferentes. La región de control del VPH-18, transfectada bajo las mismas condiciones, se expresó aceptablemente en células C33 pero pobremente en células COS (Figura 6). Esto justificó el uso de nuestro sistema en las primeras. Cuantificando las actividades de la LCR, en las células COS fue de casi una décima parte con respecto a la encontrada en las C33.

El GRE en la región de control transcripcional del VPH-18

Existen muchos ejemplos de que la regulación genética en eucariontes pluricelulares es controlada por hormonas esteroideas a nivel del comienzo transcripcional (*e. g.* Morimoto et al., 2001). Esta respuesta se lleva a cabo a través de la unión del receptor con su respectivo HRE.

Una búsqueda de secuencias con similitud al GRE consenso se realizó a lo largo de la LCR del VPH-18, arrojando como resultado al menos 8 potenciales GREs (Figura 7B).

La secuencia más cercana al promotor, aproximadamente a -120 pb del inicio de la transcripción, es un palíndromo parcial invertido con alta homología respecto al GRE perfecto y al inverso (12/15 bases), a diferencia de otras (Figura 7B), por lo que parece una buena candidata. Ésta es la que muestra en general mayor homología con relación a las secuencias de referencia (aunque comparada sólo con la consenso hubo otros 2 con mayor homología).

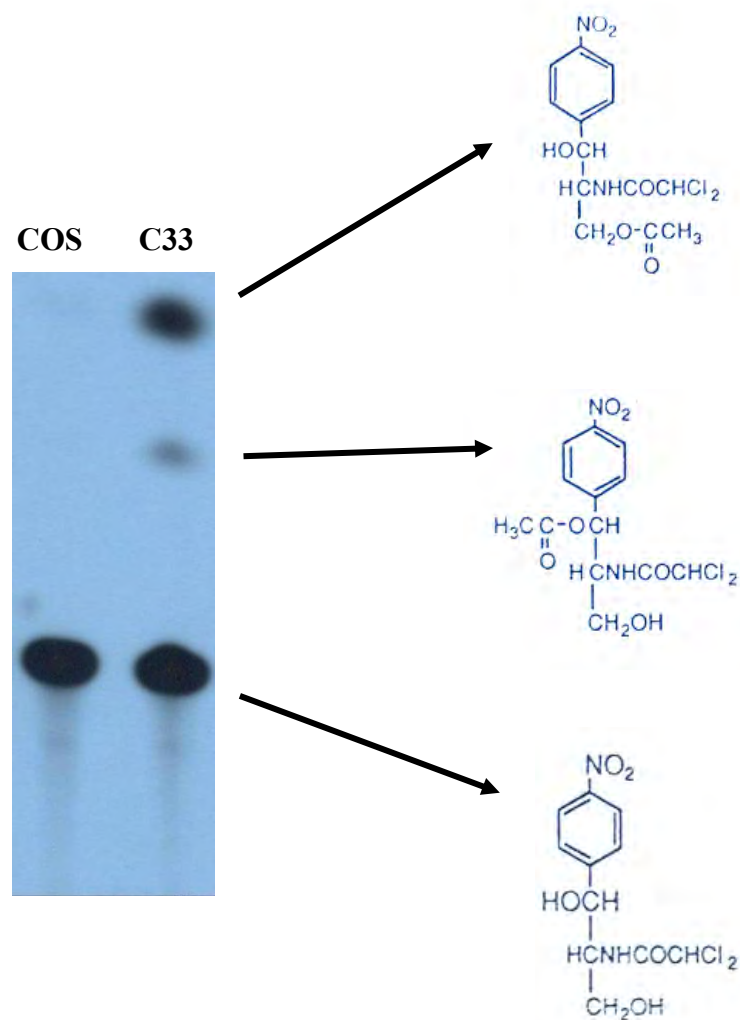


Figura 6. Expresión de la región de control transcripcional del VPH-18 en células C33. El plásmido P₁₀₅-wt (con la LCR enfrente del gen reportero para CAT) fue transfectado (5 µg) en células COS (células transformadas de riñón de mono) o C33 (células humanas de origen epitelial) por la técnica de fosfato de calcio, como se explica en materiales y métodos. El ensayo CAT fue realizado aproximadamente 40 h postransfección. Se muestra al cloranfenicol, al 1-acetilcloranfenicol (en medio) y al 3-acetilcloranfenicol (arriba).

A

GREs

GTTACA	AAC	TGTTCT	MMTV
GGTACA	CTG	TGTCCT	hMTII _A
TGTACA	GGA	TGTTCT	rTATII

GGTACA NNN TGTTCT – Secuencia consenso directa
 AGAACA NNN TGTACC – Secuencia (consenso) inversa
 AGAACA NNN TGTTCT – Secuencia palíndromo perfecta

B

VPH-18	Coincidencia con GRE / 15 bases (%)		
	Consenso	Inverso	Perfecto
7219 – GGTATG TAT GGTGTG – 7233	11 (73)	7 (47)	9 (60)
7278 – AATAAA ATA TGTTTT – 7292	11 (73)	9 (60)	11 (73)
7295 – GGTTCT GTG TGTTAT – 7309	12 (80)	8 (53)	10 (67)
7372 – GCTATA TAT TGTCCT – 7386	12 (80)	9 (60)	10 (67)
7632 – GCTACA ACA ATTGCT – 7646	11 (73)	8 (53)	9 (60)
7689 – GGCACA TAT TTTAGT – 7703	11 (73)	10 (67)	10 (67)
7756 – CCAACA TTC TGTCTA – 7770	9 (60)	10 (67)	10 (67)
7839 – AGCACA TAC TATACT – 7853	11 (73)	12 (80)	12 (80)
AGCA <u>AA</u> TAC TATACT – mutado			

Figura 7. Secuencias GRE auténticas y potenciales.

(A) Comparación de 3 GREs naturales y sus derivados. Las posiciones conservadas en sus nt están sombreadas. Las secuencias consenso del GRE y el PRE son indistinguibles entre sí y a su vez de los elementos de respuesta a mineralocorticoides y a andrógenos. (La secuencia GRE del MMTV corresponde al de la posición –184 a –170 en la LTR).

Abreviaturas: MMTV, mouse mammary tumor virus; hMTII_A, human metallothionein II_A gene; rTATII, rat tyrosine aminotransferase gene (motif) II.

(B) Secuencias en la LCR del VPH-18. Se muestran los potenciales GREs y el real (nt 7839-7853). La base cambiada está subrayada. Los números marcan las posiciones dentro de la LCR (LANL, 1996).

(Todas las secuencias son 5' a 3').

Paralelamente se realizaron experimentos en el laboratorio para estudiar la secuencia. Este elemento fue suficiente para conferir respuesta al GR sobre un promotor mínimo *tk* cuando se transfectó en células C33 (Fig. 1A, artículo 1). Al duplicarlo, el comportamiento positivo pareciera ser más eficiente que el observado en el caso del GRE consenso, actuando con sinergia (Fig. 1A, artículo 1).

El siguiente paso obvio era comprobar si el GR se unía a la secuencia. Nuestro equipo encontró que el GRE del VPH-18 tiene aparentemente una menor afinidad por el GR que el GRE consenso en experimentos de unión (Fig. 1B, artículo 1).

La mutación en el GRE eliminó la inducción por parte de dexametasona y resultó en un decremento de la transcripción basal del VPH-18

Como el comportamiento funcional de un elemento regulador en *cis* puede ser fuertemente influenciado por la composición global de la región de control, el GRE individual fue modificado por mutagénesis sitio dirigida en el contexto de la LCR completa del VPH-18.

Subsecuentemente, los efectos de esta mutación sobre la transcripción fueron evaluados en ensayos de transfección transitoria.

Se cambió la 5ª base (C → A; Figura 7B), la cual se encuentra en el 75% de 25 GREs positivos analizados, y es la posición más conservada del bloque de la izquierda; además, la G correspondiente de la cadena opuesta está protegida contra la metilación por dimetil sulfato en presencia del receptor, lo que sugiere que esta base hace contacto con el GR (Beato et al., 1989). Como se esperaba, el laboratorio demostró la incapacidad de unión con el GR por experimentos de “retardamiento” (Fig. 1B, línea a, artículo 1).

Para probar el (los) GRE(s) potencial(es) se utilizaron los plásmidos P₁₀₅-wt, con la LCR silvestre, y P₁₀₅-GREm, con la secuencia modificada, primeramente junto a las construcciones para GR y GRm. El GR transfectado no necesita del ligando para estimular a la LCR del VPH-18 (Figura 8B). Como se observa en la Fig. 2A (artículo 1), nuestro laboratorio mostró que dentro del contexto de la región reguladora completa la actividad basal se redujo hasta aproximadamente la tercera parte con la mutación en el GRE.

Al observar la gráfica de la Fig. 2B (artículo 1) se encuentra que, en células HeLa, la respuesta de VPH-18 al glucocorticoide se incrementa conforme la concentración de dexametasona en el medio de cultivo es mayor, hasta llegar al doble, pareciendo estar muy cerca de alcanzar su meseta, por lo que se puede considerar como una inducción reducida. Mientras tanto, para el caso de la región reguladora con el sitio GRE modificado no hay aumento significativo con las mismas concentraciones de dexametasona. El ensayo CAT de esta gráfica puede observarse en la Figura 9. También aquí puede apreciarse que la mutación en el GRE disminuye la basal de la región transcripcional (comparar carriles 1 y 6 [EtOH solo] y Figura 10). Al igual que con el método de electroporación, mediante el método de fosfato de calcio se transfectaron células HeLa y se observó un efecto similar por la dexametasona (dato no mostrado).

Todo lo anterior indica que el GRE participa en la actividad basal y en la respuesta a la hormona por el receptor endógeno, dentro del contexto de la LCR del VPH-18. Al mismo tiempo, y al no encontrarse ya el aumento teniendo sólo este elemento mutado, se descartan otros posibles GREs en la LCR para la regulación por el GR.

El GR siguió activando aun con 1 sitio AP1 mutado en la región reguladora del VPH-18 y aumentó la respuesta con brahma humano (hbrm)

Es interesante el hecho de que aunque se encuentre inactivado individualmente cada elemento AP1 continúe habiendo una estimulación proporcionalmente semejante a la que habría si estuvieran intactos (Fig. 3, artículo 1). Además, la transcripción respondió a GR sin necesidad del factor hbrm, en células C33 (las cuales no parecen contener endógenamente a ninguno de los dos; Muchardt y Yaniv, 1993) (Fig. 4, artículo 1). Aquí, con las concentraciones usadas del plásmido para GR ya se observa la meseta. Lo anterior podría hablar de la importancia de las hormonas en la regulación, independientemente de otros factores. Éstas le darían una ventaja al virus al compensar una posible actividad perdida, aun si tuviera mutaciones en sitios de unión de su genoma.

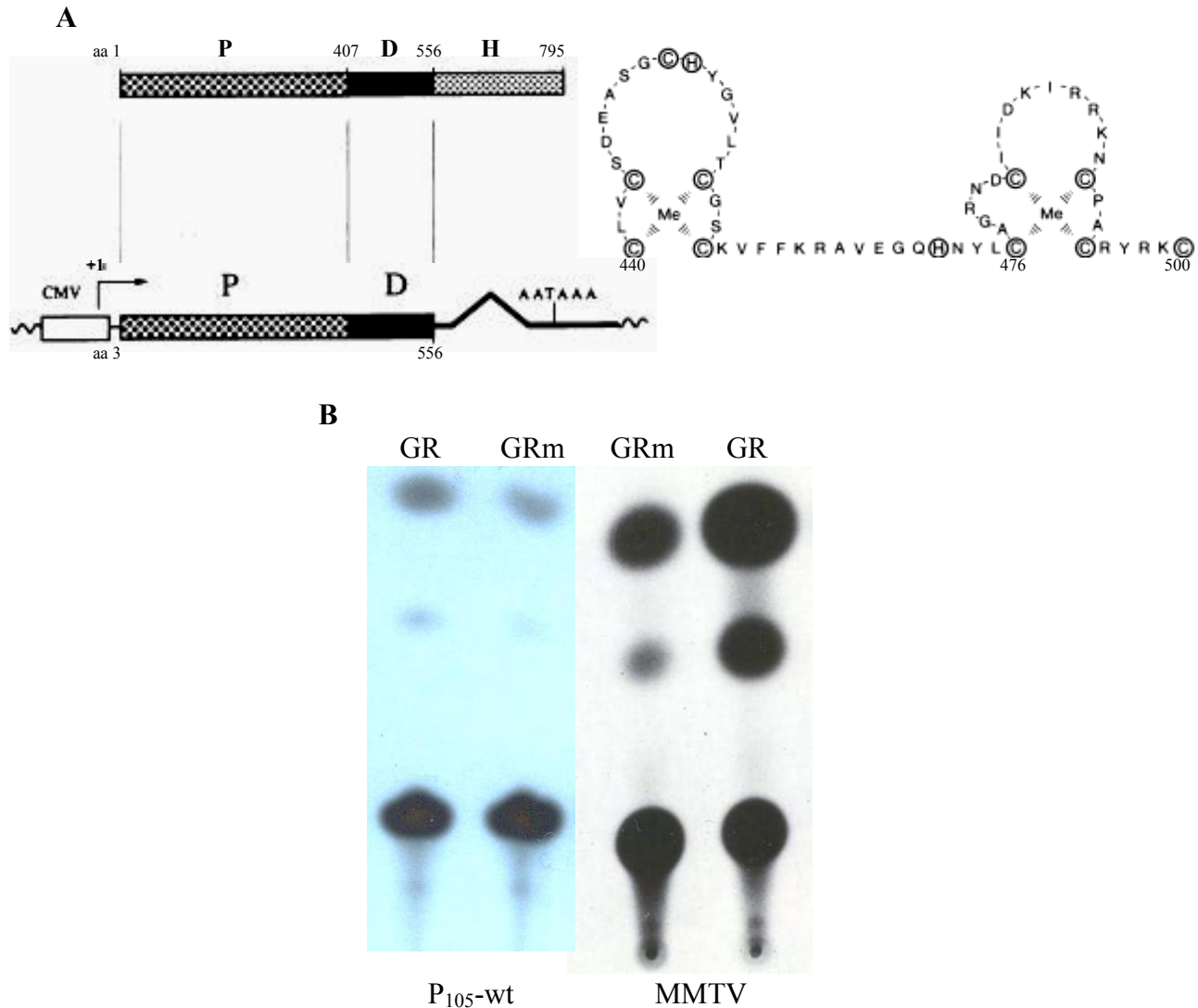


Figura 8. El receptor de glucocorticoides activa la transcripción viral.

(A) Estructura del GR de rata. El receptor tipo silvestre se subdivide en 3 dominios: el potenciador (P) que lleva la función de activación, el de unión a DNA (D) y el carboxilo terminal que es el de enlace a la hormona (H). La versión truncada es un receptor con el carboxilo deleteo, que es constitutivamente activo. CMV, promotor/*enhancer* de citomegalovirus; línea delgada, secuencia líder *tk* de virus del herpes simple (incluido codón de iniciación AUG); línea gruesa, señal de poliadenilación/*splice* de la β -globina de conejo; línea ondulada, DNA plasmídico. (Tomado de Schatt et al., 1990). En la estructura de dedos de cinc del GR se observan las cisteínas involucradas. La mutación del GRm se da en la Cys482. (Tomado de Severne et al., 1988).

(B) El plásmido P₁₀₅-wt (5 μ g) fue cotransfectado con 3 μ g del plásmido que expresa al receptor de glucocorticoides activado (GR) o al inactivo (GRm) en células C33, por la técnica de fosfato de calcio, para posteriormente realizar el ensayo CAT como se describe en materiales y métodos. Se incluye la expresión de un plásmido con el promotor del MMTV como referencia del nivel de activación por el GR (cortesía de la Dra. Françoise Thierry).

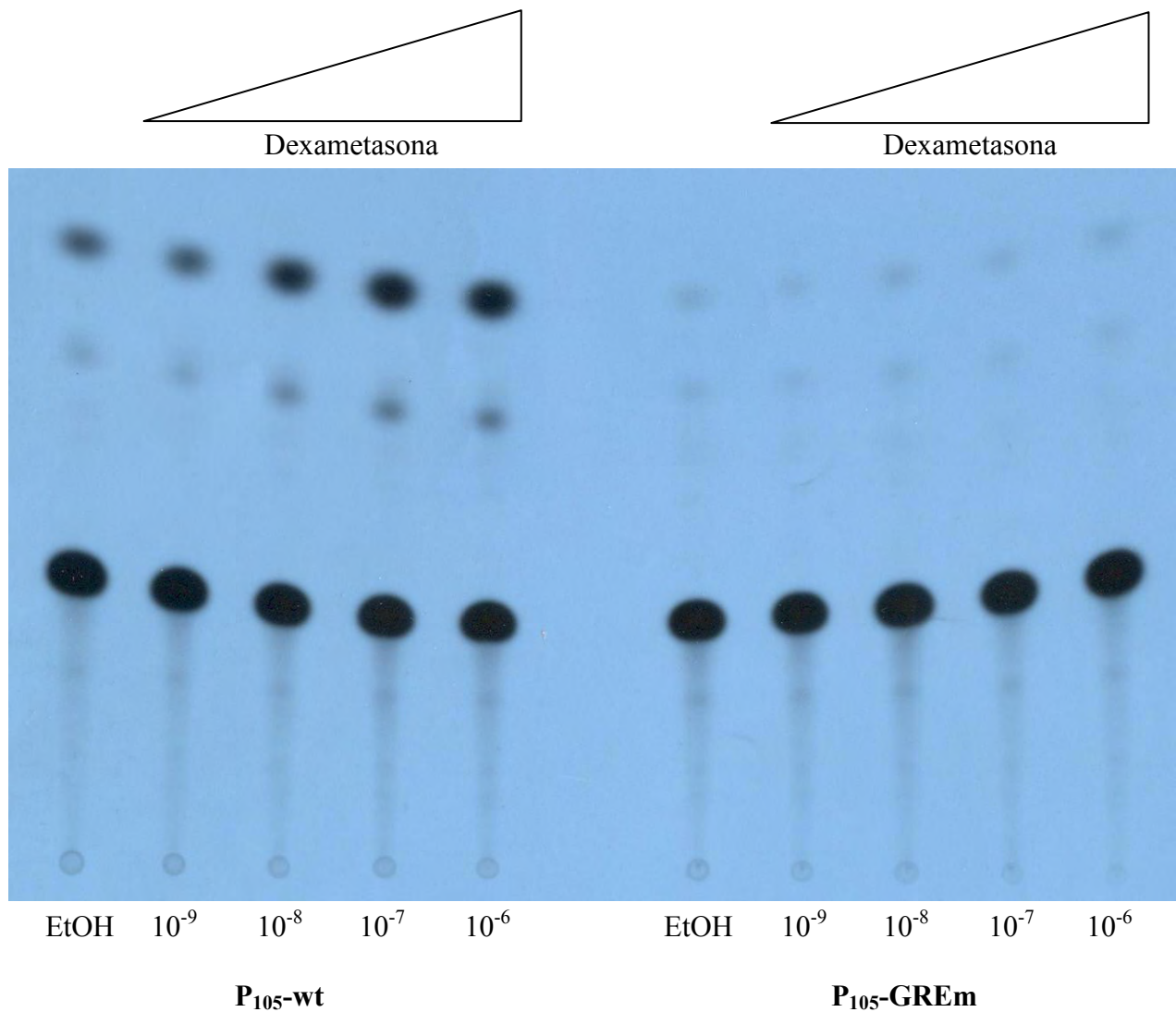


Figura 9. La región reguladora del VPH-18 no es activada por dexametasona cuando el GRE se encuentra mutado.

Células HeLa fueron electroporadas con 50 µg del plásmido P₁₀₅-wt o P₁₀₅-GREm y divididas en 5 cajas para posteriormente ser tratadas con las diferentes concentraciones molares finales de dexametasona indicadas durante 24 h antes de realizar el ensayo CAT, como se describe en materiales y métodos. EtOH, etanol (control).

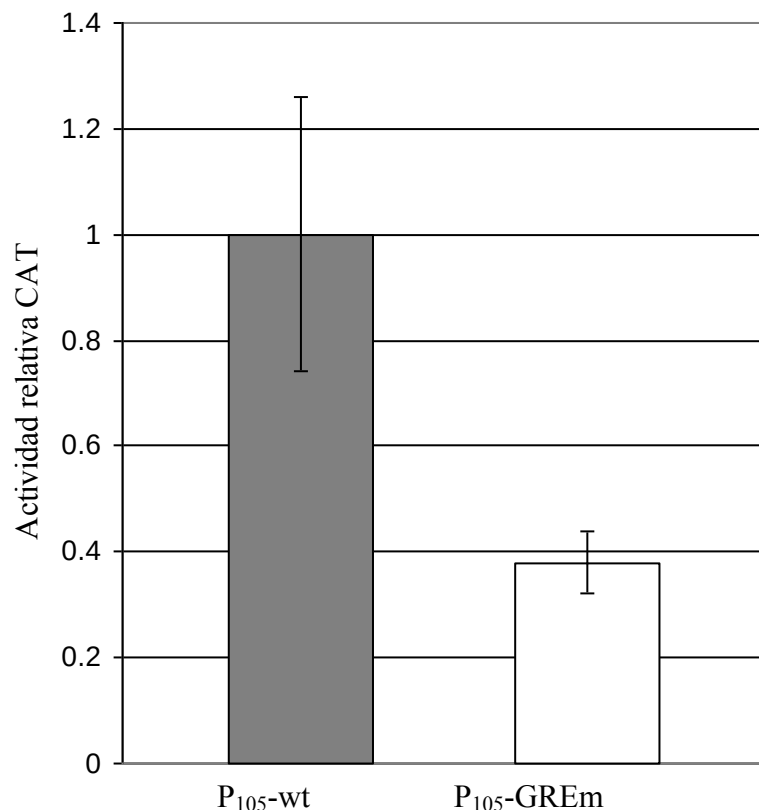


Figura 10. La mutación del GRE reduce la actividad basal de la región reguladora transcripcional del VPH-18 en células HeLa.

Los plásmidos P₁₀₅-wt y P₁₀₅-GREm se transfectaron por electroporación como se explica en la Figura 9 y las células se cosecharon a las 40 h sin tratamiento con dexametasona. La gráfica corresponde al promedio de los carriles EtOH del experimento de la Figura 9, realizado por triplicado.

En conclusión, los resultados muestran el papel del GRE detectado en la región próxima al inicio de la transcripción en la LCR, y no otros posibles, *in vitro*. También se comprobó la activación directa por parte de glucocorticoides a través de su receptor.

Con esto el GR se suma a otros factores de transcripción que interactúan en la región reguladora del VPH-18, siendo el primer receptor de hormona identificado (Figura 11).

ARTÍCULO 1

A single element mediates glucocorticoid hormone response of HPV18 with no functional interactions with AP1 or hbrm

Medina-Martinez, O., Morales-Peza, N., Yaniv, M., García-Carrancá, A., and Thierry, F.

Virology 217, 392-396 (1996).

(PubMed – indexed for MEDLINE: 8599228)

Una secuencia próxima al inicio de la transcripción es el elemento de respuesta a glucocorticoides en el VPH-18

En este trabajo se mostró que sólo una secuencia en la región reguladora del VPH-18 responde a glucocorticoides *in vitro*. En ensayos de transfección la secuencia confirió respuesta al GR con un promotor mínimo y al dimerizarse funcionó de manera comparable a como lo hace un GRE consenso repetido. En ensayos de “retardamiento” el GRE de VPH-18 fue unido por el GR y compitió con el GRE consenso por la proteína. Al realizar la mutación en una base del elemento el GR no pudo unirse más y en el contexto de la región reguladora completa del VPH-18 ésta ya no fue activada a concentraciones crecientes del análogo dexametasona ni utilizando el GR. Esto muestra que la respuesta a la hormona es directamente a través de la unión del receptor con el GRE. La mutación puntual también inhibió la transcripción basal de la LCR. El efecto del GR es independiente de cada sitio AP1 y del factor brahma humano.

SHORT COMMUNICATION

A Single Element Mediates Glucocorticoid Hormone Response of HPV18 with No Functional Interactions with AP1 or hbrm

OLGA MEDINA-MARTINEZ,* NÉSTOR MORALES-PEZA,* MOSHE YANIV,
ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA,*[‡] and FRANÇOISE THIERRY¹

**Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, and ‡División de Investigación Básica, INCan-SS., México, D.F., Mexico; and Unité des Virus Oncogènes, CNRS URA 1644, Département des Biotechnologies, Institut Pasteur, Paris, 75724, France*

Received October 13, 1995; accepted December 18, 1995

We determined that the human papillomavirus type 18 (HPV18) regulatory region contains one functional GRE sequence that interacts with the glucocorticoid receptor. This sequence conferred a moderate hormonal activation to the HPV18 P₁₀₅ promoter. Two modulators of glucocorticoid hormone activity, AP1 and hbrm, both involved in P₁₀₅ transcription, were found not to interfere with this hormonal activation. © 1996 Academic Press, Inc.

The human papillomavirus type 18 (HPV18) has been found to be associated with the etiology of cervical carcinomas, along with few other viral types forming the so-called "high risk" group. Members of this group have been shown to express two transforming proteins, E6 which interacts with p53 and induces its degradation and E7 which interacts with the product of the cellular Rb tumor suppressor gene (1–3). Transcription of these two oncogenes is apparently tightly regulated by a complex array of cellular and viral proteins. This regulation may be modified by integration of the viral genome, an event frequently occurring during carcinogenic progression. The pattern of integration has been shown to be conserved, keeping intact a genomic fragment containing the whole regulatory region and the E6 and E7 genes, with a specific interruption in the downstream E1 and/or E2 ORFs (4, 5). In the free or integrated genomic form, transcription of the viral oncogenes is under the control of numerous cellular factors, among which, are steroid hormone receptors. Epidemiological studies have raised the possibility that the hormonal status of the infected person, such as pregnancy, may influence the development of HPV-associated lesions (6).

Sequences resembling glucocorticoid hormone receptor response elements (GREs) have been identified in the regulatory regions of HPVs associated with genital lesions (7). The HPV16 genome has been shown to contain such an element in its transcriptional enhancer (8). In the HPV18 genome, the cell-type-specific enhancer

has been shown to contain responsive elements for numerous cellular factors including AP1 (9), NF1/CTF, and KRF/Oct (10). Additional binding sites for transcription factors are present more proximal to the promoter initiation site, including Sp1 (11, 12), YY1 (13), AP1, and an Oct related site (14). In addition this region also contains binding sites for the viral E2 transcriptional regulator as well as the origin of viral DNA replication. The E2 binding site most proximal to the promoter TATA box has been shown to mediate repression of the E6/E7 promoter activity by E2 (12, 15), while the three E2 binding sites are crucial for viral DNA replication (16, 17). It should be noted that this region of approximately 200 nt is devoid of any intrinsic transcriptional activity in the absence of its transcriptional enhancer (14). Within this proximal region, we found by computer search two putative GRE elements, one at position 7756 containing 7 of 12 conserved residues with regard to the consensus GRE sequence (CCAACA N3 TGTCTA) and a second one at position 7839 containing 9 of 12 conserved residues (AGCACA N3 TATACT). The existence of two potential sites might be correlated with the bimodal glucocorticoid activation of the LCR of HPV18 linked to the *lacZ* gene in transgenic mice (18). Analysis by mutagenesis of PCR-amplified DNA containing the two putative GRE sites indicated that only the GRE element at position 7839 is hormone responsive (data not shown). Contrary to numerous hormone-responsive promoters where synergistic activation between at least two hormone-responsive elements occurs (19), the HPV18 P₁₀₅ promoter thus appears to respond only to a single GRE element. This element, present at position 7839, has been previously mentioned (7, 11).

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: 33-1-45 68 87 90.

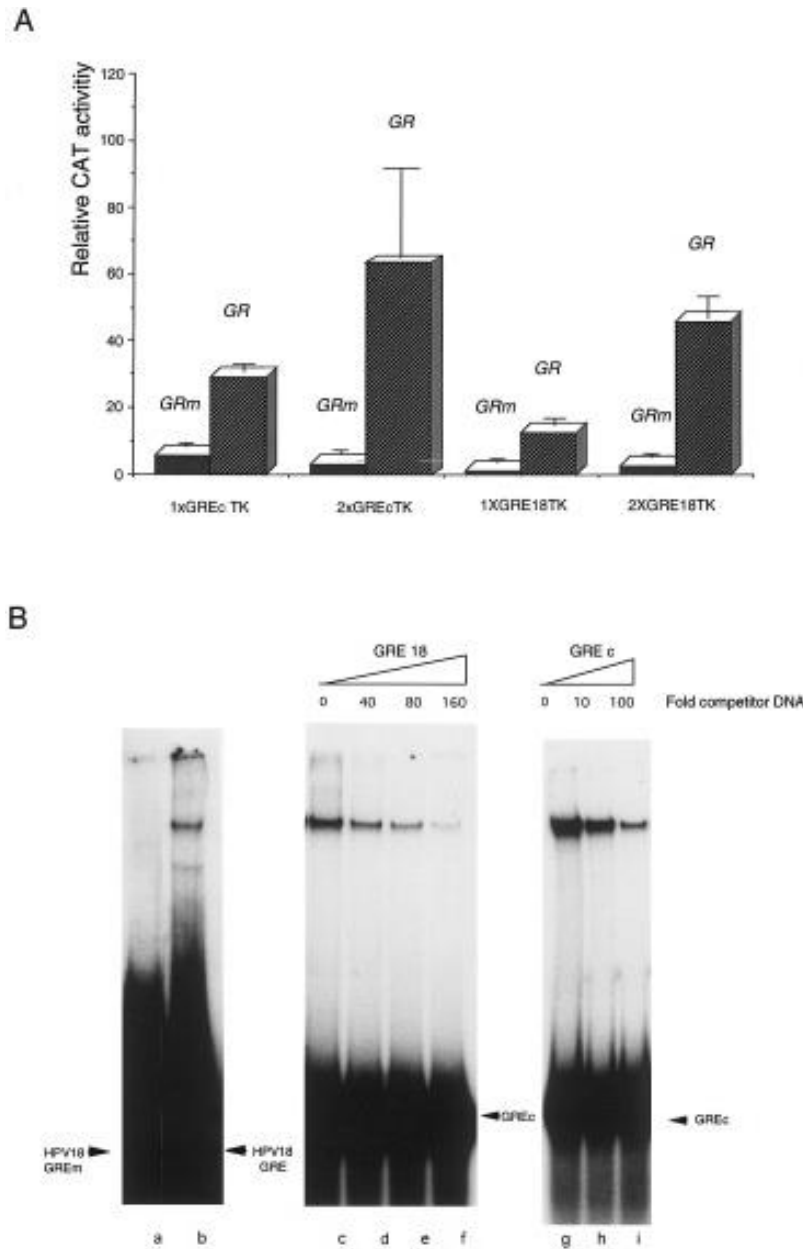


FIG. 1. (A) Activation of GRE tk CAT by the glucocorticoid hormone receptor. tk-CAT expression plasmids (0.5 μ g) were cotransfected with 50 ng of either the mutant glucocorticoid receptor (GRm) (black bars) or the wild-type GR (gray bars) expression plasmids in C33 cells by the standard calcium phosphate coprecipitation method (29). The constitutive GR and its mutated version were expressed under a CMV promoter, as previously described (30). CAT assays were done 40 hr posttransfection, results given are the mean of at least three experiments that were standardized with the use of a cotransfected B-galactosidase reporter plasmid in each plate, and error bars are the calculated standard deviations. (B) Binding of purified GR to wild-type and mutated GRE sequences. Purified glucocorticoid hormone receptor obtained from bacterial extracts was used for binding assays with end-labeled probes by Klenow filling. Probes contain either wild-type (GRE18), AGCACA N3 TATACT, or mutated, AGCAAA N3 TATACT, sequences from HPV18 or a consensus GRE sequence (GREc), AGAACA N3 TGTTCT. Binding assays were performed under standard conditions, in the absence of nonspecific competitor DNA. Briefly, proteins were incubated with the labeled probes in the presence of 12 mM HEPES (pH 7.9), 0.5 mM EDTA, 4 mM $MgCl_2$, 60 mM KCl, and 20 mM spermidine. Competitions were done on a GREc-labeled probe with excess unlabeled oligonucleotides containing the HPV18 or consensus GRE sequences using increasing molar excess as indicated at the top of each lane.

We further examined whether this GRE sequence could cooperate to increase the hormonal response when multimerized. We synthesized oligonucleotides containing either this HPV18 GRE sequence (AGCACA

N3 TATACT) or a consensus GRE sequence (AGAACA N3 TGTTCT) and cloned either one or two copies of them in front of the minimal thymidine kinase (tk) promoter. As shown in Fig. 1A, both sequences mediated efficient

glucocorticoid receptor (GR)-dependent activation of the tk promoter. In addition, both sequences increased the hormonal response when duplicated, although the HPV18 sequence was less efficient than the consensus GRE.

To further compare the activity of the HPV18 GRE with the consensus sequence, both oligonucleotides were used in gel shift assays with a purified GR protein produced in bacteria. Both sequences were bound by the purified GR; however, the consensus sequence bound with a higher efficiency, as shown in direct binding assays in Fig. 1B (compare lanes b, GR binding to the HPV18 GRE, with lanes d and g, GR binding to the consensus GRE). In competition experiments, with excess unlabeled oligonucleotides, both the GREc and the GRE18 sequences competed for the binding of GR to the consensus sequence (Fig. 1B, lanes c to i). In contrast, a mutated oligonucleotide containing a base change in one of the conserved nucleotides of the HPV18 GRE element (AGCAAA N₃ TATACT) was neither bound by the purified GR (Fig. 1B, lane a) nor did it compete for GR binding (data not shown).

We next examined whether the P₁₀₅/CAT plasmid, containing the entire regulatory region cloned upstream of the CAT gene (20), could be activated by cotransfection with a constitutively expressed wild-type or mutated GR in C33 cells. As shown in Fig. 2A, we detected a weak but reproducible transcriptional activation. It should be noted that control experiments (not shown) with highly responsive regulatory regions such as the MMTV promoter showed a very high hormonal activation (30- to 50-fold) in similar conditions. It therefore indicated the presence of high concentrations of endogenous GR upon transfection of the expression plasmid. In order to confirm that the site that we identified by *in vitro* binding was indeed responsible for this activation of transcription in the context of the whole HPV18 long control region, we introduced the point mutation within the GRE sequence that was shown to abolish GR binding *in vitro* (Fig. 1B, lane a). We found that this mutation decreased the promoter basal level and when cotransfected with the constitutive GR, its transcription was further repressed (Fig. 2A). This result unambiguously indicated that the activation observed with the wild-type sequence was due to the presence of an intact GRE sequence. The unusual effect of the point mutation raises the possibility that another cellular factor might bind to this site and cooperate with the glucocorticoid receptor. However, gel shift assays with nuclear extracts failed, until now, to detect such a protein (results not shown). When the levels of both mutated and wild-type P₁₀₅ transcription were compared in the presence of cotransfected GR, the wild-type sequence was 10-fold more active than the mutated one (compare the two gray columns in Fig. 2A). Direct activation of HPV18 transcription by glucocorticoids could also be observed in HeLa cells, which contain

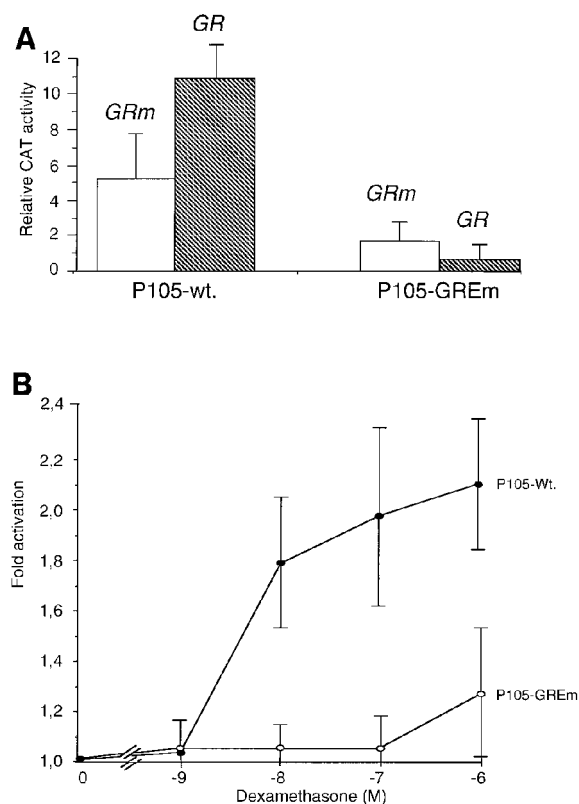


FIG. 2. Hormonal regulation of the HPV18 P₁₀₅/CAT construct containing either a wild-type or a mutated GRE. (A) C33 cells were cotransfected with 2 μ g of the HPV18 P₁₀₅/CAT plasmids and 50 ng of either GR (gray bars) or mutated GR (white bars) expression plasmids by the standard calcium phosphate cotransfection method (29). The wild-type plasmid P₁₀₅-wt. has been described (9), and P₁₀₅-GREm contains a single-base-pair mutation in the GRE, as described in the text and in the legend to Fig. 1. CAT assays were done 40 hr after transfection. The values given represent the mean of at least three independent transfection experiments. (B) HeLa cells were transfected either with the wild-type P₁₀₅ promoter in front of CAT (●) or with the one containing the single GRE mutation (○). Cells were treated for 24 hr with different molar concentrations of dexamethasone, as indicated. Cell extracts and CAT assays were done 40 hr after transfection. Each point is the average of three independent transfection experiments.

endogenous receptors. A transfected HPV18 P₁₀₅ wild-type/CAT plasmid was activated 2- to 3-fold in different experiments by dexamethasone treatment, but not the one containing a mutated GRE sequence (Fig. 2B). In contrast, we could not detect hormonal activation of the P₁₀₅ promoter in the mammary tumor cell line MCF7 which expresses a high level of endogenous receptors, but does not support basal P₁₀₅ transcription (data not shown).

Our experiments indicated that a single point mutation in the GRE sequence is sufficient to abolish the glucocorticoid responsiveness of the HPV18 P₁₀₅ promoter. In addition, we have also shown that the single or multimerized GRE sequence of HPV18 can efficiently confer glucocorticoid responsiveness to a minimal promoter. The single point mutation that we have introduced in this GRE

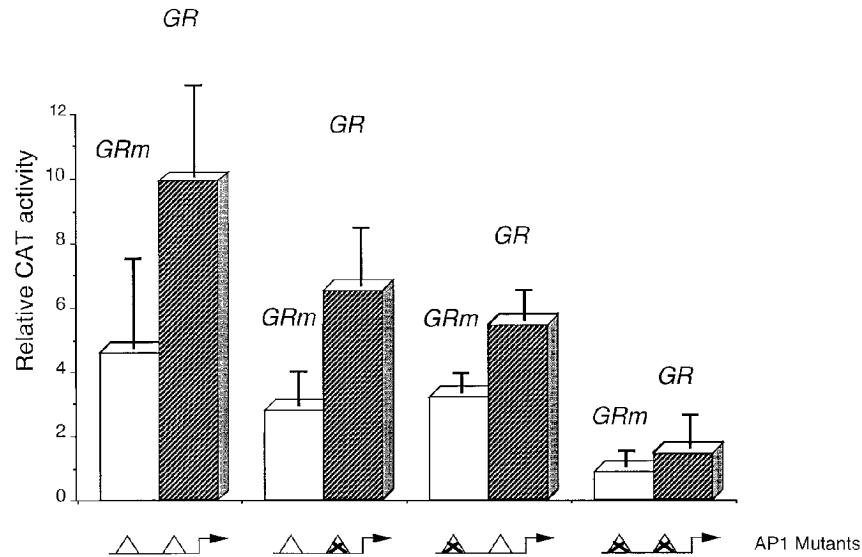


FIG. 3. Transcriptional activation by the glucocorticoid hormone receptor of HPV18 P_{105} promoters mutated in AP1 binding sites. The HPV18 P_{105} /CAT plasmids, either wt or mutated in either one or both AP1 binding sites (9), are schematically represented at the bottom of the figure (crossed triangles indicate mutated AP1 binding sites). Two micrograms of each plasmid was cotransfected with 50 ng of GR (gray bars) or GR-mutated (white bars) expression plasmids in C33 cells, as described in Fig. 2.

(A to C) led to a decrease in the basal activity of the P_{105} promoter. This is in contrast with a double point mutation (AA to GG) introduced in the same element by Butz and Hoppe-Seyler (1993) that led to increased basal activity of this promoter (11). Opposite effects of different GRE mutants could be due to different sequence changes that would affect other regulatory elements located in close proximity, such as a YY1 element located just few bases from the GRE. Another possibility is that endogenous hormonal receptors could interact with this sequence in the absence of transfected GR and modulate the basal P_{105} activity.

The weak hormonal activation of P_{105} (two- to threefold) could result from a putative negative interference of the receptor with AP1, an essential element of the promoter (9), since it is well documented that a complex cross-talk exists between glucocorticoid hormone receptor and the AP1 complex (21, 22). In several cases they antagonize each other while in others they cooperate in transcriptional activation. Since the HPV18 regulatory region contains two AP1-responsive sites and a GRE, we investigated whether these elements interfere or synergize with each other. In agreement with previous results, single or double AP1 mutations in the P_{105} promoter decreased its activity; however, all mutants were still activated roughly twofold by glucocorticoid receptor, as observed for the wild-type promoter (Fig. 3). These experiments demonstrate that AP1-dependent activation of P_{105} did not imply any obvious negative or positive interference with the hormonal activation. In the converse experiment, GR repressed transcription of a promoter mutated in its GRE (Fig. 2A), still raising the possibility that excess GR in the absence of its target DNA se-

quence can repress the AP1 activity. The concomitant presence of TREs and GRE in a regulatory region can constitute "composite elements" as in the proliferin gene, for instance (23). Regulation of these composite elements led to either activation or repression. Our results indicate that the TRE and GRE of HPV18 do not constitute composite elements since both sequences are located far from each other and seem to be regulated independently.

Another explanation for the weak hormonal activation of the HPV18 transcription could be that full activation requires another cellular factor(s). The cellular hbrm protein, a constituent of a complex that modulates chromatin

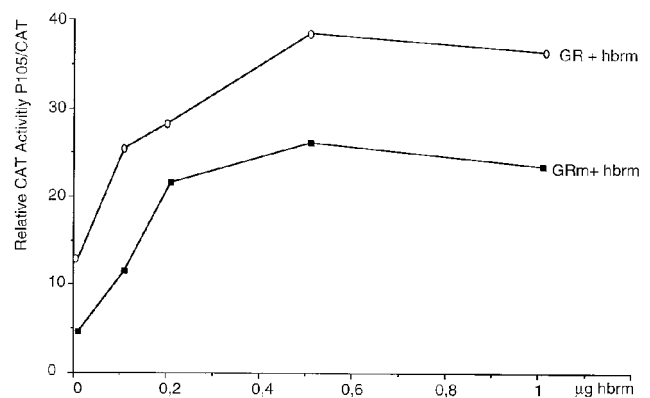


FIG. 4. Transcriptional activation by hbrm of the HPV18 P_{105} /CAT plasmid. Two micrograms of wt P_{105} /CAT plasmid was cotransfected with 50 ng of the GRm or GR expression plasmids in the presence of variable amounts (between 0 and 1 μ g) of the hbrm expression plasmid in C33 cells. Transfections were done as indicated in the legend to Fig. 2. Values plotted on the curves are the result of a typical transfection experiment.

structure, could represent such a candidate since it has been shown to potentiate GR activation (24). We therefore investigated the putative involvement of hbrm in the GR-mediated activation of HPV18 transcription. Cotransfection of a cytomegalovirus promoter (CMV) hbrm expression plasmid with the P₁₀₅ CAT plasmid in the C33 cell line (which does not express endogenous hbrm) produced a dose-dependent activation of transcription of the P₁₀₅ promoter (up to fourfold), as shown in Fig. 4. Cotransfected GR further increased this activation, although not in a cooperative manner, at any concentration of hbrm plasmid used in the experiment. hbrm activation of P₁₀₅ therefore appeared independent from hormonal activation through binding to the HPV18 GRE element since the GRE mutated HPV18 LCR was also activated by hbrm (data not shown). In HeLa cells, which contain endogenous hbrm (24), we did not detect P₁₀₅ activation by increasing its levels with cotransfected hbrm (not shown). In addition, the fact that the hormonal activation reported above in HeLa cells (Figure 2B) was rather weak indicated that there is no obvious cooperation between the transfected GR and the endogenous hbrm. We can conclude from these experiments that the activation of P₁₀₅ by hbrm is not mediated through the hormonal receptor but through other regulatory factor(s) yet to be determined.

We failed to demonstrate in the present study any positive or negative interactions between the GR and other cellular factor(s) in regulating the HPV18 P₁₀₅ transcriptional activity, even though GR has been shown to synergize with many cellular transcription factors in other systems (19, 24, 25). These results raise the question of the exact role of the hormonal regulation in the context of HPV18, although it has been shown that glucocorticoid activates HPV18 transforming genes in HeLa cells (27). We believe that a complex interplay can still exist *in vivo* between regulatory pathways in which a key element may be the cell specificity. We and others have shown that the HPV early promoters are strictly epitheliotropic and are controlled by a complex array of cellular factors. Among these, the composition of the AP1 factor may be of relevant importance since it has been suggested that specific AP1 combinations are regulated differently by steroid hormones (26, 28). Interestingly, TPA or glucocorticoid hormones are potent modulators of cell proliferation and differentiation. Their potential antagonistic roles in controlling epithelial differentiation may be of extreme importance in the HPV regulation since viral expression tightly depends on the keratinocyte differentiation. In conclusion, modulations by GR/AP1 interactions might involve a very complex cell/virus relationship in this specific example.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was made possible by a French–Mexican exchange program, between CNRS–CONACYT. We thank B. Bourachot and C. Mu-

chardt for the gift of purified bacterial GR and for the gift of the CMV hbrm expression plasmid, R. Ovseiovich for participating in the generation of the GRE mutant, F. Arnos for technical help, and Christian Desaintes for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by grants from CONACYT (1705M9209) and the Miguel Alemán Foundation, the ARC, and the LNFCC.

REFERENCES

1. Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M., *Science* **248**, 76–79 (1990).
2. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M., *Cell* **63**, 1129–1136 (1990).
3. Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K., and Harlow, E., *Science* **243**, 934–937 (1989).
4. Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stemlau, A., and zur Hausen, H., *Nature* **314**, 111–114 (1985).
5. Berumen, J., Casas, L., Segura, E., Amezcua, J., and Garcia-Carranca, A., *Int. J. Cancer* **56**, 640–645 (1994).
6. Schneider, A., Hotz, M., and Gissmann, L., *Int. J. Cancer* **40**, 198–201 (1987).
7. Chan, W. K., Klock, G., and Bernard, H. U., *J. Virol.* **63**, 3261–3269 (1989).
8. Gloss, B., Bernard, H. U., Seedorf, K., and Klock, G., *EMBO J.* **6**, 3735–3743 (1987).
9. Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M., and Howley, P. M., *J. Virol.* **66**, 3740–3748 (1992).
10. Mack, D. H., and Laimins, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9102–9106 (1991).
11. Butz, K., and Hoppe-Seyler, F., *J. Virol.* **67**, 6476–6486 (1993).
12. Demeret, C., Yaniv, M., and Thierry, F., *J. Virol.* **68**, 7075–7082 (1994).
13. Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H. D., and zur Hausen, H., *EMBO J.* **11**, 4607–4617 (1992).
14. Garcia-Carranca, A., Thierry, F., and Yaniv, M., *J. Virol.* **62**, 4321–4330 (1988).
15. Thierry, F., and Howley, P. M., *New Biol.* **3**, 90–100 (1991).
16. Remm, M., Brain, R., and Jenkins, J. R., *Nucleic Acids Res.* **20**, 6015–6021 (1992).
17. Demeret, C., Le Moal, M., Yaniv, M., and Thierry, F., *Nucleic Acids Res.* **23**, 4777–4784 (1995).
18. Cid, A., Auewarakul, P., Garcia-Carranca, A., Ovseiovich, R., Gaisert, H., and Gissmann, L., *J. Virol.* **67**, 6742–6752 (1993).
19. Schüle, R., Müller, M., Kaltschmidt, C., and Renkawitz, R., *Science* **242**, 1418–1420 (1988).
20. Thierry, F., and Yaniv, M., *EMBO J.* **6**, 3391–3397 (1987).
21. Schüle, R., Rangarajan, P., Klierer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M., and Evans, R. M., *Cell* **62**, 1217–1226 (1990).
22. Yang-Yen, H. F., Chambard, J. C., Sun, Y. L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J., and Karin, M., *Cell* **62**, 1205–1215 (1990).
23. Mordacq, J., and Linzer, D., *Genes Dev.* **3**, 760–769 (1989).
24. Muchardt, C., and Yaniv, M., *EMBO J.* **12**, 4279–4290 (1993).
25. Strähle, U., Schmid, W., and Schütz, G., *EMBO J.* **71**, 3389–3395 (1988).
26. Miner, J. N., and Yamamoto, K. R., *Genes Dev.* **6**, 2491–2501 (1992).
27. von Knebel-Doeberitz, M., Bauknecht, T., Bartsh, D., and zur Hausen, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1411–1415 (1991).
28. Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K., and Yamamoto, K. R., *Science* **240**, 1266–1272 (1990).
29. Wigler, M. S., Silverstein, S., Lee, L. S., Pellicer, A., Cheng, Y., and Axel, R., *Cell* **11**, 23–32 (1977).
30. Gauthier, J. M., Dostatni, N., Lusky, M., and Yaniv, M., *New Biol.* **3**, 498–509 (1991).

SEGUNDA PARTE

EL SISTEMA DE RATONES TRANSGÉNICOS

Se ha demostrado la importancia de la región reguladora completa, dada la contribución relativa en *cis* de los elementos individuales que la conforman, a la actividad transcripcional de VPH-18 (Butz y Hoppe-Seyler, 1993).

Para el sistema *in vivo*, contábamos con líneas de ratones llevando a la LCR entera como regulador del gen reportero *lacZ* o del gen reportero para la CAT.

Primeramente, para corroborar la presencia del transgén, se efectuó el escrutinio con la técnica de *slot-blot*. Como ejemplo obsérvese la Figura 12, donde sólo los ratones portadores LCR-*lacZ* dan la señal positiva. Los ratones no transgénicos eran usados como controles negativos en los experimentos.

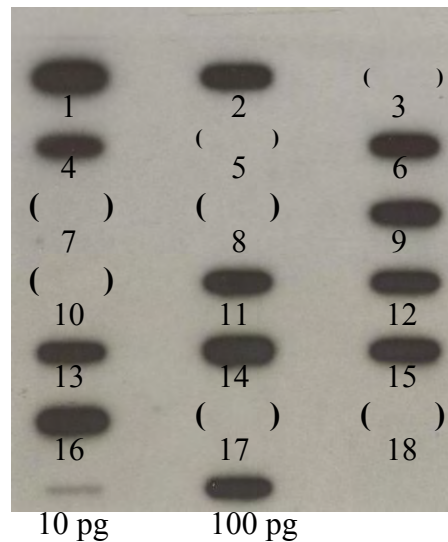


Figura 12. Selección de ratones transgénicos por *slot blot*.

Muestras de DNA genómico (10 µg por pozo) extraídas de la cola de los ratones fueron desnaturalizadas y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Ésta fue posteriormente tratada con 2 ciclos de *cross-linking* e hibridada con el transgén completo (LCR del VPH-18-*lacZ*) marcado radioactivamente con ^{32}P por *random primer*. Los controles positivos corresponden a 10 y 100 pg del transgén. Se muestran ratones hembras (1-6 y 13-16) y machos (7-12 y 17-18) de cruas de la línea 411.

Las engañosas secuencias TRE y YY1 en la LCR del VPH-18

En la LCR del VPH-18 se localizan 2 sitios que corresponden en 6 de 8 bases a un TRE consenso (TGAGTCAG; Angel et al., 1987) y que son también los de unión a AP1 (Figura 13). El sitio próximo al comienzo transcripcional confiere inducción a TPA sobre el promotor *tk* cuando es separado del VPH-18 (Gius y Laimins, 1989).

Dada esta alta homología entre ambos elementos, decidimos utilizar al éster de forbol para estudiar la transcripción viral vía AP1 *in vitro* en el contexto de la LCR completa. Previamente supusimos que la acción del TPA podía ser enmascarada por factores presentes en el medio, por lo que el cultivo fue crecido con 2% de suero, resultando mejor condición que 7 o 0.5% para nuestros objetivos. En experimentos con células 3T3 transfectadas permanentemente con la LCR completa enfrente del gen reportero *lacZ* y tratadas con TPA, las observaciones iniciales indicaban un aumento del doble al cuantificar la actividad de la β -galactosidasa (Ovseiovich et al., 1994). El valor descendía hasta la mitad a las 24 h de aplicación del éster de forbol. Sin embargo, de manera inexplicable para nosotros, repeticiones posteriores indicaron que este resultado no se repetía, elevándose sólo un pobre 10-30%, en vez del 100% obtenido previamente. Bauknecht y colaboradores (1992) tampoco obtuvieron una respuesta importante al tratar células HeLa y medir la actividad del gen reportero para CAT (30%), pero identificaron una región de regulación negativa en la LCR de VPH-18 a la que se unía el represor YY1, que podría explicar las observaciones que teníamos. Posteriormente (1995) mostraron que la mutación en esta región reprime la funcionalidad del VPH-18 en HeLa, por lo que YY1 actúa como un activador en el contexto de la LCR entera.

Con el objeto de probar el efecto de YY1 *in vivo* desarrollamos ratones transgénicos teniendo a la LCR, tanto silvestre como modificada en el sitio de unión de la proteína, y al gen reportero *cat*. Para evitar fluctuaciones de la expresión del transgén debidas a los cambios hormonales durante el ciclo del estro (ver más adelante) se utilizaron sólo machos. En un ensayo inicial la actividad enzimática dirigida por la LCR silvestre se pudo detectar en lengua, con lo que se probó que es posible utilizarla en un sistema de este tipo (Fig. 26.2D, Cid-Arregui et al., 1998a, apéndice 1). Sin embargo, al buscar en otros órganos como intestino delgado, riñón y testículo (epidídimo incluido), no se encontró que hubiera una mayor actividad en estos órganos con respecto a los de no transgénicos.

La línea con la primera mutación sobre el elemento de reconocimiento a YY1 (llamada M1; Figura 13) se probó en la lengua de ratones con las sublíneas 4/2 y 4/3; mientras que la otra mutación (llamada M2; Figura 13) de la misma región se ensayó en lengua de individuos de la sublínea 5/6. Comparándose con la sublínea 6/1 (WT) se encontró que al modificar la secuencia de unión del factor regulador se obtiene un resultado similar al de un ratón no transgénico, mientras que en los que llevaban a la LCR silvestre, ésta se comportaba eficientemente (Fig. 26.2D, Cid-Arregui et al., 1998a, apéndice 1). De ahí que esto lleve a sugerir que la unión de YY1 a la LCR del VPH-18 funcione como activador en un órgano que la expresa de manera satisfactoria, como lengua, *in vivo*.

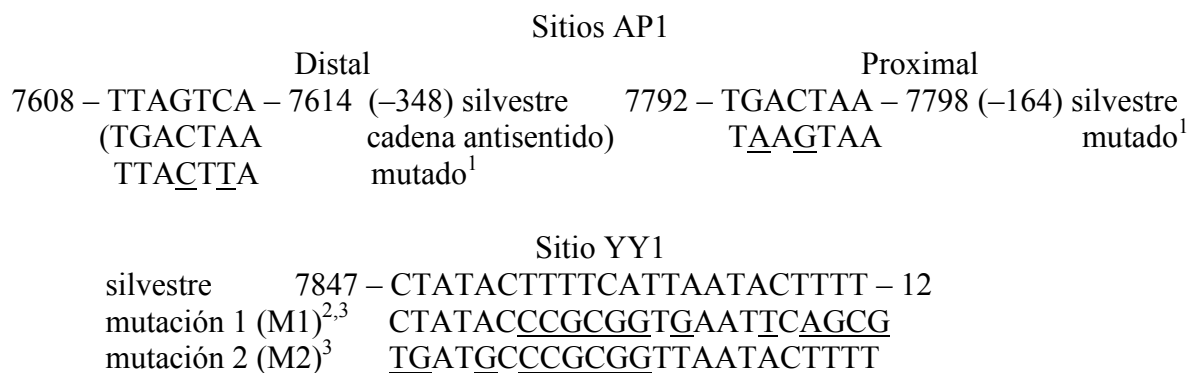


Figura 13. Sitios de unión de AP1 y YY1 en la LCR del VPH-18.

Las bases cambiadas están subrayadas. Los números marcan las posiciones dentro de la LCR (LANL, 1996). En los sitios AP1 la posición 3' respecto al comienzo de la transcripción está entre paréntesis. Nótese que ambos sitios AP1 son iguales. (Todas las secuencias son 5' a 3').

¹Thierry et al., 1992. ²Bauknecht et al., 1992. ³Bauknecht et al., 1995 y comunicación personal.

Plásmidos con la LCR del VPH-16 y con mutaciones en los sitios de unión al factor AP1 dentro de la región reguladora del VPH-18

La expresión de AP1 correlaciona con la transcripción de E6-E7 en las células epiteliales estratificadas (Kyo et al., 1997). Esto sugiere que la alta actividad del transgén en estratos superiores del epitelio vaginal durante el estro, en hembras con la LCR del VPH-18 y el gen reportero *lacZ*, puede estar determinada principalmente por AP1.

Con el fin de examinar esta posibilidad en ratones transgénicos, se construyeron plásmidos con los elementos AP1 modificados. Estos sitios corresponden al AP1 distal y al proximal (–348 y –164 nt de P₁₀₅), los cuales se encuentran en la porción central (*enhancer*) y 3' de la LCR, respectivamente. Las mutaciones son incapaces de unir al factor AP1 (Garcia-Carranca et al., 1988), afectando el nivel transcripcional basal de VPH-18 *in vitro* (Thierry et al., 1992). Cabe mencionar que los cambios son idénticos en ambos elementos (Figura 13). Se obtuvieron las construcciones pLCRβgal A1 (elemento distal mutado), pLCRβgal A2 (elemento proximal mutado) y pLCRβgal A1+2 (ambos elementos mutados). La LCR quedó enfrente del gen reportero *lacZ*, con el objeto de dirigir su transcripción.

En el caso de las construcciones para la LCR silvestre del VPH-16, se tienen ambas orientaciones. Los 2 plásmidos resultantes contienen el fragmento con la LCR en la orientación *syn* (pLCR16βgal 1) y *anti* (pLCR16βgal 2) (Figura 14). Los plásmidos se podrán utilizar en un futuro para desarrollar ratones transgénicos *lacZ* con la LCR del VPH-16 como regulador transcripcional.

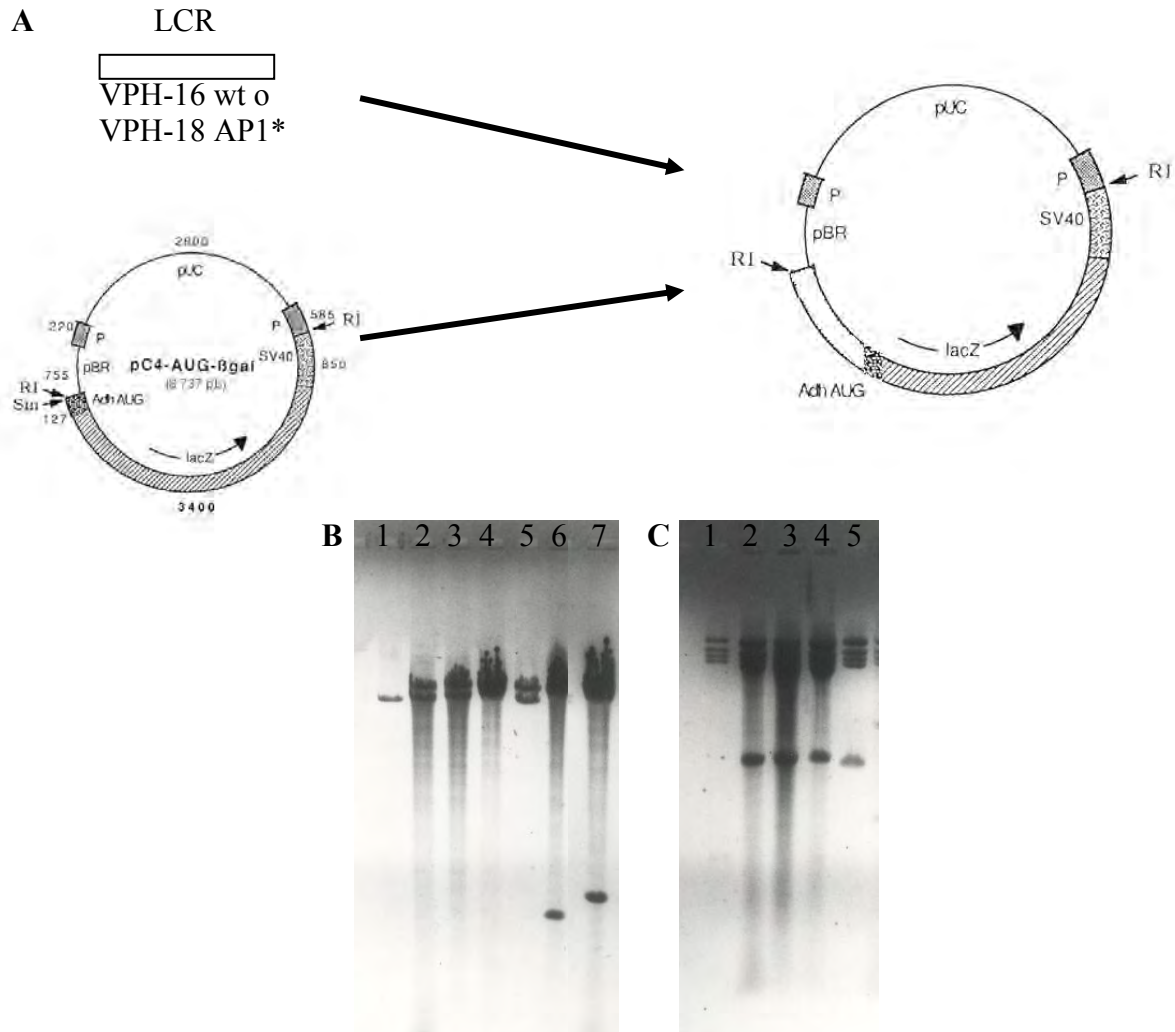


Figura 14. Construcciones con las regiones de control de VPH-16 o VPH-18 clonadas en el vector de expresión de β -galactosidasa.

(A) Diagrama del plásmido parental pC4-AUG- β gal y derivados. El fragmento con la LCR silvestre del VPH-16 (VPH-16 wt) y los fragmentos que contienen a las LCRs del VPH-18 modificadas en las secuencias de unión a AP1 (VPH-18 AP1*) se introdujeron en el sitio *Sma* I de pC4-AUG- β gal, frente a la secuencia codificadora *lacZ* de *E. coli*. La orientación del gen está indicada por la flecha. Las figuras no están dibujadas a escala. Los tamaños están en pb. P, extremos del elemento P de *Drosophila*; Adh AUG, codón de iniciación; SV40, señal de poliadenilación de SV40. Sitios de restricción: Sm, sitio único *Sma* I; RI, *EcoR* I. (Modificado de Thummel y colaboradores, 1988).

(B y C) Análisis de los plásmidos con las enzimas *EcoR* I (B) y *EcoR* I + *Bgl* I (C). Los vectores de expresión llevan la región de control del VPH-18 (2-4) con mutaciones en los sitios AP1 distal (2), proximal (3) y en ambos (4) y la silvestre del VPH-16 (6 [sentido] y 7 [antisentido]). Las bandas más rápidas en 6 y 7 se deben a un sitio *EcoR* I en la LCR (nt 7454). Los cortes en C sirvieron para verificar la orientación correcta de la LCR aprovechando el sitio interno *Bgl* I (nt 7576; ver Figura 2). Se incluyeron los plásmidos pC4-AUG- β gal (1) y pURR18*lacZ* (5; Cid et al., 1993) como controles. En el primero, con *EcoR* I las 2 bandas de 4.3 kb son indistinguibles entre sí.

Las pruebas con retinoides en ratones transgénicos con la LCR de VPH-18-*lacZ*

Se ha propuesto (zur Hausen, 2000) que existe un bloqueo intra- e intercelular en la síntesis de las oncoproteínas de VPH, cuya interrupción resultaría en un paso más en la carcinogénesis cervicouterina. Entre las evidencias se encuentra que el RA interfiere con la expresión genética temprana del VPH-18 en células HeLa (Bartsch et al., 1992).

Para probar la posible influencia de retinoides sobre la LCR del VPH-18 en los ratones transgénicos con el gen reportero *lacZ* utilizamos dos compuestos: acetato de retinol y RA. Se trataron ratones machos para descartar las variaciones en la actividad del transgén propias de hembras. Con un número muy reducido de animales, se observó una represión inconsistente y desigual en diferentes órganos, que fue desde ninguna con RA o acetato de retinol hasta más del 60% con acetato de retinol para el mismo tejido (lengua) y que no fue dependiente de tiempo ni dosis (Tabla 1). Un solo intento con acetato de retinol disuelto en agua para beber no produjo diferencia importante a 2 días de exposición, lo que sugeriría que la alimentación con retinoides debe ser crónica. En intestino delgado, riñón y testículo aparentemente se encontró una disminución, pero fue difícil de establecer debido al fondo endógeno en estos órganos y baja actividad específica de nuestra enzima. El resultado no se hizo más evidente cuando se agregó el competidor de la β -galactosidasa, en el caso de riñón y testículo. Llama la atención que en epidídimo apareciera la reducción más constante, pues podría indicar especificidad de tejido en la respuesta, tal vez debida a concentraciones en los RARs.

Adicionalmente, el extracto de riñón mostró tener una inhibición de la actividad enzimática por el método luminiscente, como se deduce cuando al probar concentraciones crecientes de aquél hubo una disminución en las lecturas.

Mediante *Northern blot* de extractos de lengua de ratones tratados en presencia o ausencia de acetato de retinol por dos días se confirmó que el efecto de la inhibición era a nivel de la transcripción del transgén (Figura 15).

Después de estos ensayos, todavía preliminares, es obvio que se necesitan más experimentos para confirmar la observación inicial. Dado que es difícil comparar la posible atenuación en órganos con actividad endógena, la cual interfiere con las mediciones, en el futuro será mejor usar órganos con poco fondo, como lengua, o preferentemente vagina (v. gr. en Villanueva et al., 2006).

Tabla 1. Relación de los tratamientos inyectados con retinoides en ratones transgénicos.

Compuesto	Dosis diaria	Órgano(s)	% de represión de la actividad respecto al ratón tratado con el vehículo solo (ensayo)
Acetato de Retinol	5 mg/kg 2 días	Lengua	64% (colorimétrico) 69% (luminiscente)
		Intestino delgado	Sin efecto (colorimétrico) 35% (luminiscente)
		Riñón	45% (luminiscente)
		Testículo	19% (luminiscente)
Acetato de Retinol	10 mg/kg 1 y 2 días	Lengua	18% y 27% (colorimétrico) 18% y 28% (luminiscente)
		Intestino delgado	37% y 57% (colorimétrico)
Acetato de Retinol	5 mg/kg 1,2,3,4,6 días	Lengua	Sin efecto negativo (colorimétrico, luminiscente)
		Intestino delgado	(-/+ competidor) Sin efecto negativo (luminiscente)
		Epidídimo	30, 30, 22, 16, 17% (colorimétrico) 30, 43, 33, 10, 11% (luminiscente) (+ competidor) 40, 31, 23, 19, 13% (colorimétrico) 41, 54, 41, 7, 18% (luminiscente)
Acetato de Retinol	5 mg/kg 2 días	Lengua	Sin efecto negativo (colorimétrico, luminiscente)
		Epidídimo	Sin efecto negativo (colorimétrico) 15% (luminiscente) (+ competidor) Sin efecto negativo (colorimétrico) 22% (luminiscente)
	50 mg/kg 2 días	Lengua	11% (colorimétrico) 14% (luminiscente)
		Epidídimo	26% (colorimétrico) 36% (luminiscente) (+ competidor) 21% (colorimétrico) 42% (luminiscente)
Ácido Retinoico	5 mg/kg 1 y 2 días	Lengua	34% y 19% (colorimétrico)* 24% y 16% (luminiscente)*
Ácido Retinoico	100 mg/kg 1 y 2 días	Lengua	34% y sin efecto negativo (colorimétrico)* 32% y sin efecto negativo (luminiscente)*

*Con respecto a ratón no tratado.

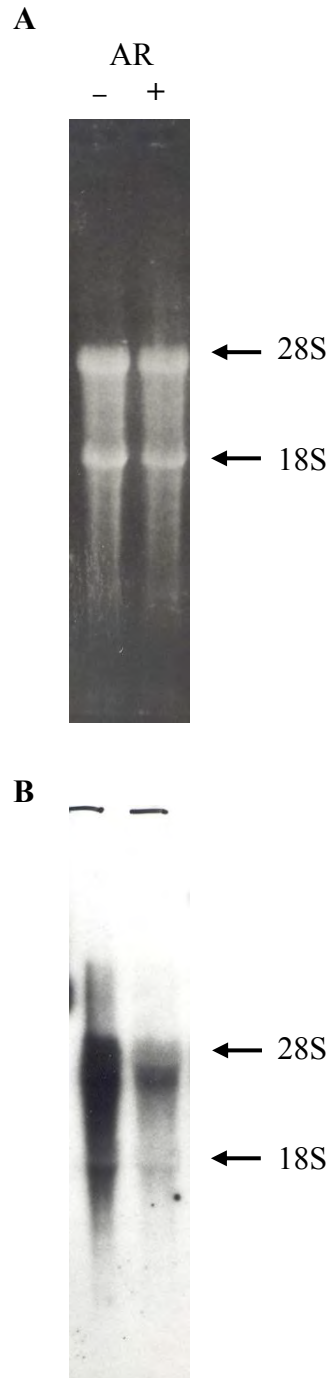


Figura 15. Efecto de retinoides sobre la transcripción del transgén.
 (A) Gel preparativo de RNA total de extracto de lengua.
 (B) *Northern blot* con el fragmento LCR-HPV-18-*lacZ* como sonda. El ratón (AR+) se inyectó intraperitonealmente con acetato de retinol a concentración de 5 mg/kg por día durante 2 días. AR-, control. Se extrajo el RNA total y 10 µg fueron sujetos a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, para transferirse a membrana de nitrocelulosa. El filtro se hibridó contra la sonda de DNA marcada con ^{32}P y se expuso con película para rayos X. Las flechas indican las posiciones de los rRNAs 28S y 18S.

La regulación hormonal de la LCR del VPH-18 en ratones transgénicos *lacZ*

Aprovechando el sistema de ratones transgénicos con la LCR completa del VPH-18, uno de nuestros objetivos más importantes fue identificar factores hormonales involucrados en la funcionalidad transcripcional de los oncogenes E6 y E7 *in vivo*. Decidimos utilizar la serie con el gen reportero *lacZ* debido a la mayor facilidad del ensayo enzimático respecto a la serie con CAT y además sin necesidad de radioisótopos, lo que daba un menor fondo en el resultado.

En esta parte se decidió examinar un órgano blanco de las hormonas, como la vagina, la cual no se había cuantificado anteriormente (Cid et al., 1993). Igualmente, se evaluó la actividad del transgén en la lengua de los mismos animales, para comparar los efectos en un órgano sin células blanco.

La concentración de hormonas femeninas endógenas correlaciona con la actividad viral durante el embarazo

La asociación entre embarazos a término con el riesgo de cáncer cervical proporciona evidencia de que eventos relacionados al segundo y tercer trimestre de gestación o al nacimiento pueden ser relevantes (Muñoz et al., 2002).

Un resultado muy similar al de la Fig. 1A (artículo 2), con alta actividad al final del embarazo, se obtuvo también con la técnica de cuantificación de la actividad de β -galactosidasa en vagina por el ensayo de quimioluminiscencia y sin una tendencia clara en lengua e intestino delgado de los mismos animales (datos no mostrados).

Esto podría indicar que alguna hormona progestágena estuviera involucrada en actividad del transgén. Una posibilidad son los esteroides sexuales. Y una buena manera de estudiarlas naturalmente es a través del bien conocido ciclo estral de la ratona.

La actividad del VPH-18 es máxima posterior al pico hormonal en el ciclo estral

En ratones hembra algunas hormonas tienen picos de concentración similares a la fluctuación seguida por el transgén durante el ciclo del estro murino, como la prolactina y las gonadotropinas (FSH y LH), además de la progesterona y el estradiol (Freeman, 1988). Apoyando la modulación hormonal, en la Fig. 1B (artículo 2) se observa el retraso característico entre la presencia del ligando esteroide y el efecto sobre la traducción genética (de varias horas).

Resultados parecidos se obtuvieron en vagina y útero con la técnica de detección de β -galactosidasa por el ensayo quimioluminiscente (el cual es mucho más sensible; Cid-Arregui et al., 1998a), y por el de ONPG como sustrato en útero, confirmando nuestras observaciones. En cambio, en el caso de lengua e intestino delgado no se observó esta variación; en este último órgano tampoco con el método colorimétrico (datos no mostrados).

La eficiente transcripción está restringida a capas diferenciadas del epitelio

Como se observa en la Fig. 2A-B (artículo 2), la actividad del transgén en estro se encuentra claramente en los estratos medio y superior de la membrana, y si se compara con la hembra en diestro, se trata de células en diferenciación de un epitelio engrosado, indicando la especificidad espacio-temporal. Esto muestra que la inducción transcripcional del virus está influenciada por el tipo celular y estado de proliferación natural del estrato genital *in vivo*.

Lo anterior correlaciona bien con que los transcritos E6 y E7 de VPH-18 son escasamente detectables en la capa basal no diferenciada de lesiones precancerosas de bajo grado, pero sus niveles se incrementan con los grados mayores de diferenciación en células superiores (Stoler et al., 1992), lo que sugiere que nuestro modelo se asemeja a lo descrito para los oncogenes virales *in situ* y apoya que este órgano es ideal para estos estudios.

Aquí, los resultados indican que la actividad transcripcional del VPH-18 durante el ciclo del estro está comprometida al programa de diferenciación celular del tejido epitelial.

La importancia de las hormonas ováricas

Los resultados durante el embarazo y el ciclo del estro sugieren fuertemente que la variación *sui generis* de la LCR puede deberse a alguna(s) hormona(s), ya que varias siguen un comportamiento similar. Asimismo, se sabe que los esteroides ováricos poseen efectos específicos en los órganos sexuales (Guyton, 1984).

Ya que los ovarios maduros sintetizan y secretan de manera dinámica estrógenos y progesterona, éstas podrían ser las hormonas que activan la LCR. Adicionalmente, el estradiol estimula la proliferación y maduración de las células epiteliales cérvico-vaginales (Anderson y Kang, 1975). Para confirmar nuestra hipótesis se analizaron ratonas con ovariectomía de 3 semanas, tiempo suficiente para que las hormonas ováricas alcancen su nivel más bajo (Short, 1982; Guyton, 1984). Al extirpar los ovarios se abolió completamente la actividad de la LCR (Fig. 3, artículo 2; Ovx). Con esto también se descarta a las gonadotropinas hipofisarias.

El resultado obtenido indica que la regulación transcripcional del transgén necesariamente debe estar sujeta a una hormona ovárica (o más), pues no queda más que un nivel semejante al de las ratonas no transgénicas. Esto también muestra que las hormonas esteroides producidas en la corteza suprarrenal, como los glucocorticoides, además de estrógenos o progesterona residuales o sintetizados a partir de otros compuestos, no son importantes por sí solos en la activación del VPH-18 *in vivo*.

La administración del 17 β -estradiol (E₂) es suficiente para recuperar la transcripción del VPH-18

Las hormonas esteroides gonadales controlan crecimiento, diferenciación epitelial y función de órganos sexuales (Guyton, 1984; Jensen, 1991). En el ciclo del estro el folículo ovárico crece con el consecuente incremento en la producción de estrógenos, especialmente E₂, el estrógeno más activo producido por el ovario debido a su potencia biológica y diversos efectos fisiológicos en los tejidos periféricos blanco, de aquí que se decidiera utilizar éste. En apoyo del estradiol, la mayor parte del presente en circulación periférica es resultado directo de la secreción ovárica (Goldfien y Monroe, 1998). Adicionalmente, verificamos que la vagina de rata contiene receptores de progesterona y estrógenos (Cerbón, M. A., y Morales-Peza, N., datos no mostrados).

La sola aplicación de E₂ en hembras con remoción de ovarios provocó que el útero y la vagina aumentaran de volumen (dato no mostrado), lo que demostró su efecto sobre órganos blanco, como se esperaba. A nivel tisular, el tratamiento garantiza la diferenciación estructural del epitelio cérvico-vaginal (Anderson y Kang, 1975).

Al administrar E₂ o E₂ + progesterona en hembras con ovariectomía, se alcanzaron niveles cercanos a los más altos durante el ciclo del estro, mostrando que es suficiente con la primera para obtener la mayor parte de actividad de la LCR por hormonas. De hecho, E₂ + progesterona no es significativamente diferente de E₂ solo, o sea, no hay efecto aditivo.

Esto demostró que el E₂ es la principal hormona involucrada en la activación del VPH-18, en ausencia de proteínas virales autólogas.

Al igual que en hembras, no hubo un claro efecto sobre el transgén en lengua de ratones machos inyectados con progesterona a diferentes tiempos (12, 24 y 48 h), mediante el ensayo colorimétrico (datos no mostrados).

La inhibición por el RU-486 puede bien ser atribuida a su efecto antiestrogénico y no al antiprogestágeno, por lo que esto igualmente apoyaría de nuevo al estradiol en la activación. Se ha reportado que el RU-486 puede reprimir el efecto transcripcional por E₂ a través de la unión del receptor de progesterona a su PRE (Kraus et al., 1995).

En el útero, que es también un órgano que responde a esteroides sexuales, se observó colorimétricamente un comportamiento parecido al de vagina, al administrarse hormonas exógenas (datos no mostrados), pero con un fondo mucho mayor debido a la actividad endógena del tejido (Cid et al., 1993).

Finalmente, al buscar en la LCR no se encontró una secuencia que tuviera identidad con el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) perfecto (GGTCA o TGACC).

ARTÍCULO 2

In vivo tissue-specific regulation of the human papillomavirus type 18 early promoter by estrogen, progesterone, and their antagonists

Morales-Peza, N., Auewarakul, P., Juárez, V., García-Carrancá, A., and Cid-Arregui, A.

Virology 294, 135-140 (2002)

(PubMed – indexed for MEDLINE: 11886272)

Las hormonas esteroides sexuales femeninas modulan la transcripción del VPH-18 *in vivo*

En este trabajo se mostró la correlación entre la concentración hormonal y la actividad de la región reguladora del VPH-18 en el epitelio vaginal de ratonas transgénicas. Esto fue determinado mediante detección histoquímica y cuantificación de la expresión del gen reportero para la β -galactosidasa, bajo el control de la LCR. Incremento de la transcripción reportera al final del embarazo y nivel máximo en estro, inmediatamente después del pico fisiológico de estrógenos. La actividad se observó en capas diferenciadas del epitelio de vagina. La ovariectomía abatió la funcionalidad de la LCR, mientras que la administración de 17β -estradiol en hembras ovariectomizadas restauró el nivel perdido. El tratamiento combinado con progesterona no estimuló significativamente más que el de 17β -estradiol solo. Antagonistas hormonales estrogénicos reprimieron parcialmente la expresión recuperada. Finalmente, las alteraciones en el comportamiento del transgén no se observaron en lengua, órgano que no está bajo influencia de hormonas sexuales.

In Vivo Tissue-Specific Regulation of the Human Papillomavirus Type 18 Early Promoter by Estrogen, Progesterone, and Their Antagonists

Néstor Morales-Peza,* Prasert Auewarakul,^{†1} Victoria Juárez,‡ Alejandro García-Carrancá,*§ and Angel Cid-Arregui ^{†2}

*Institute of Biomedical Research, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Apdo. Postal 70-228, 04510 Mexico City, Mexico;

[†]Applied Tumor Virology, German Cancer Research Center (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany;

[‡]European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69012 Heidelberg, Germany; and [§]Division of Basic Research, National Institute of Cancer, Avenida San Fernando 22, 14000 Mexico City, Mexico

Received August 16, 2001; returned to author for revision October 9, 2001; accepted November 7, 2001; published online

Human papillomavirus type 18 is a causative agent of epithelial cancers in the uterine cervix. We show here that estrogen and progesterone activate β -galactosidase expression from the early promoter of this virus in the genital epithelia of transgenic mice. Ovariectomy caused suppression of transgene expression exclusively in vagina and cervix epithelia. β -Galactosidase expression could be restored in ovariectomized females by administration of estrogen, alone or in combination with progesterone. Further, rescue of transgene expression was inhibited by the estrogen antagonist tamoxifen and the anti-progesterone RU486, suggesting that this was a specific effect. © 2002 Elsevier Science (USA)

Key Words: oncogenic HPV; LCR; gene expression; estrogen; progesterone; receptor; cervical cancer; tamoxifen; RU486.

INTRODUCTION

Human papillomaviruses (HPVs) comprise a group of over 100 virus genotypes associated with epithelial neoplasias of skin and mucosae (zur Hausen and de Villiers, 1994). A subset of genital HPV types known as “high-risk” or oncogenic HPVs is associated with cancer of the uterine cervix, the second most common malignancy in women worldwide. Of these, HPV types 16 and 18 are the most prevalent. High-risk HPVs encode two early proteins with transforming properties, E6 and E7 (zur Hausen, 1996), that are consistently expressed in 80–90% of cervical neoplasias and in tumor-derived cell lines, such as HeLa (HPV-18). Transcription of E6 and E7 is driven by a long control region (LCR) which contains elements for binding of viral and cellular transcription factors (García-Carrancá *et al.*, 1988). The major viral transcription factor, E2, is frequently disrupted in cervical carcinomas (Schwarz *et al.*, 1985). Thus, in tumor cells the HPV LCR is thought to be regulated exclusively by cellular factors, including receptors of steroid hormones (glucocorticoid, estrogen, and progesterone) (Chan *et al.*, 1989; Mitrani-Rosenbaum *et al.*, 1989; reviewed in Pater *et al.*, 1994). Accordingly, epidemiological surveys indi-

cate that long-term administration of oral contraceptives and pregnancy, which involve elevated levels of circulating estrogen and progesterone, increase the risk for developing invasive cervical carcinomas among women with HPV-positive cervical lesions (Brinton *et al.*, 1986, 1989; Herrero *et al.*, 1990; Hildesheim *et al.*, 1990).

The study of the mechanisms underlying regulation of HPV expression *in vivo* has been complicated by the strict species-specificity of these viruses. We have generated a transgenic mouse model in which a β -galactosidase gene is expressed under control of the HPV-18 LCR (Cid *et al.*, 1993). Characterization of expression in three different transgenic lines showed the highest levels of reporter in vagina–cervix and tongue stratified epithelia. Therefore, these mice offer a model in which regulation of the HPV-18 LCR promoter can be studied *in vivo*. In this study we have extended the analysis of our transgenic mice to determine the effect of estrogen and progesterone on the HPV-18 LCR by quantifying reporter expression under various physiological and pharmacological conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Enhanced activity of the HPV-18-LCR-*lacZ* transgene during pregnancy

Epidemiological studies have shown that pregnancy accelerates progression of preexisting cervical cancers and that parity is a risk factor for this disease (Brinton *et al.*, 1989). A possible explanation for this phenomenon may be an enhanced expression of the HPV E6 and E7

¹ Present address: Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, 10700 Bangkok, Thailand.

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Angewandte Tumovirologie, DKFZ, Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg, Germany. Fax: 49 6221 424902. E-mail: cid@dkfz.de.



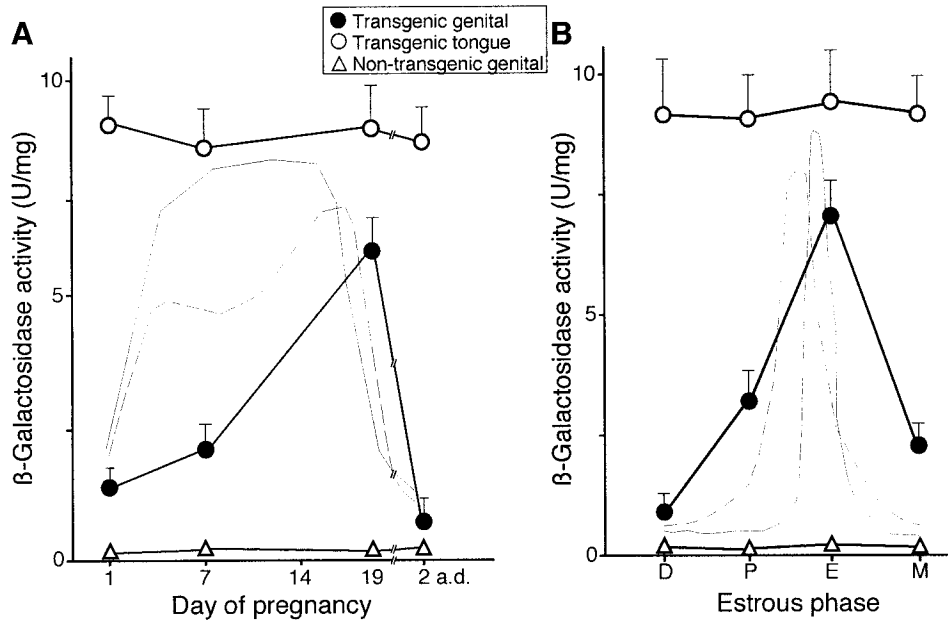


FIG. 1. Influence of pregnancy and the estrous cycle on HPV-18-LCR-*lacZ* transgene expression in vagina-cervix and tongue epithelia. Transgenic females heterozygous for HPV-18-LCR-*lacZ* were sacrificed when indicated, and tissue samples were removed for analysis of reporter expression. β -Galactosidase assays were performed with 0.2 mg of total protein. Crude extracts of protein were from vagina-cervix and tongue epithelia of transgenic animals and vagina-cervix epithelia of nontransgenic littermates. Endogenous galactosidase activities in the tongues of nontransgenic controls were negligible and are not shown. Symbol plots correspond to mean values $\pm$ SE of biochemical analysis of 6–8 mice each. Typical gestation time was 20 days. Plots (relative values) of serum levels of estradiol (dashed lines) and progesterone (continuous fine lines) during pregnancy and the estrous cycle have been drawn according to Freeman (1988). Peak values, obtained by RIA as described previously (Freeman, 1988; Goodman, 1978), were, for estrogen, 30 pg/ml (day 19 of gestation) and 50 pg/ml (proestrus–estrus), and, for progesterone, 70 ng/ml (day 14 of gestation) and 20 ng/ml (estrus). (A) Transgene expression during pregnancy. Transgenic (heterozygous) females were crossed with nontransgenic males and sacrificed 1, 7, and 19 days postcoitus and two days after delivery (2 a.d.) for quantitative analysis of β -galactosidase activity. (B) Transgene expression during the estrous cycle. Females were sacrificed in the morning of the day of the indicated phase: D, diestrus; P, proestrus; E, estrus; M, metestrus.

oncogenes in infected lesions during pregnancy. This would imply that estrogens and/or progesterone, the levels in serum of which remain physiologically increased during pregnancy, may stimulate HPV early gene expression, either directly upon activation of their cognate receptors or by indirect, more complex mechanisms. Indeed, these hormones have been shown to enhance the transforming capability of high-risk HPVs *in vitro* (see Pater *et al.*, 1994, and references therein).

We have investigated reporter expression during pregnancy in HPV-18-LCR-*lacZ* transgenic mice, which harbor an HPV-18 LCR fused to the *Escherichia coli lacZ* gene and SV40 poly(A) sequences (Cid *et al.*, 1993). Three different lines displayed a consistent expression pattern of the transgene, mainly restricted to the stratified epithelia of tongue (males and females) and vagina-cervix (females). Two of these lines, Nos. 406 and 411, showing higher levels of transgene expression were chosen for this study.

β -Galactosidase activity was measured at different stages of pregnancy (1, 7, and 19 days postcoitus) and shortly after delivery using protein extracts of crude homogenates prepared from vagina-cervix or tongue of transgenic females and nontransgenic littermates. As

shown in Fig. 1A, a trend toward increasing reporter activity was observed in genital epithelia during pregnancy. This increase correlated with ascent levels of circulating estrogen and progesterone, which reached a peak toward the last week of pregnancy (Casey *et al.*, 1992; Rugh, 1990). In contrast, no significant variation was observed in the epithelium of the tongue (Fig. 1A).

The activity of the HPV-18-LCR-*lacZ* transgene during the estrous cycle follows the fluctuations of circulating estrogen and progesterone

During the estrous cycle, mature ovarian follicles secrete progesterone and estrogen in response to gonadotropins. Circulating levels of both hormones reach a maximum at the proestrous–estrous phase. In order to evaluate the effect of such fluctuation on the HPV-18 LCR promoter, groups of transgenic females synchronized at any phase of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, or metestrus) were used to quantify reporter activity in their vagina-cervix epithelia. The time of estrous phase was assessed by microscopic examination of vaginal smears for the presence of characteristic cell types (Cunliffe-Beamer and Les, 1987).

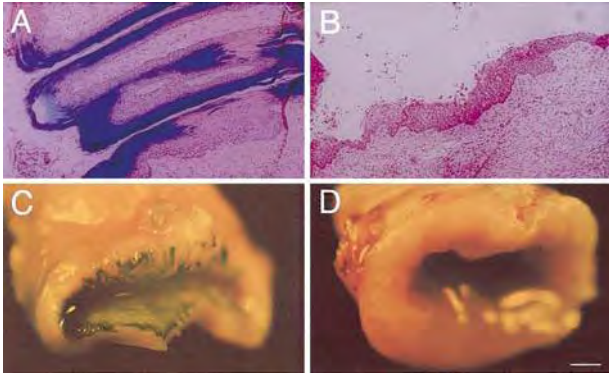


FIG. 2. Histochemical staining of β -galactosidase in vagina and cervix epithelia of HPV-18-LCR-*lacZ* transgenic females during the estrous cycle. Heterozygous transgenic females (2–3 months old) were sacrificed in the morning at the estrus and diestrus phases of the estrous cycle, as determined by microscopic examination of vaginal smears. Vagina and cervix tissues were dissected, fixed for 2 h with 4% paraformaldehyde, embedded in 30% sucrose in PBS, and snap frozen for cryosectioning (7- μ m thick sections; A and B). Alternatively, whole mounts of vagina-cervix (C and D) were stained using X-Gal substrate, which is cleaved by the β -galactosidase to yield blue insoluble indigo. (A and C) Estrus and (B and D) diestrus. Bar, 60 μ m (A and B) and 0.7 mm (C and D).

We observed an increased β -galactosidase expression in the genital epithelia of the HPV-18-LCR-*lacZ* that correlated with higher levels of circulating estrogens and progesterone. As shown in Fig. 1B, activity was maximal at estrus, shortly after the levels of estrogens and progesterone reached a peak, suggesting that these hormones might account for the activation of the HPV-18 LCR. Histochemical analysis of β -galactosidase activity in thin sections and whole mounts of vagina-cervix tissues further confirmed this observation (Fig. 2). A staining of high intensity was seen at estrus (Figs. 2A and 2C), which was localized to the suprabasal layers of the vaginal epidermis and the columnar endocervical epithelia, especially the metaplasia of the transformation zone. This is consistent with the predisposition of HPV to infect and form lesions in these areas of the human uterus. In contrast, almost no staining could be detected at diestrus (Figs. 2B and 2D). Quantitative analysis of β -galactosidase activity in the tongue epithelium of the same animals showed no significant variation during the estrous cycle (Fig. 1B).

Ovariectomy causes suppression of HPV-18-LCR-*lacZ* activity in a tissue-specific manner

The effect of ovarian estrogens and progesterone on the HPV-18 early promoter was confirmed in ovariectomized animals. Transgenic females (4–6 weeks old) were ovariectomized and reporter activity was measured in their genital epithelia 3 weeks later, when concentrations of ovarian steroids in blood and of their receptors in target tissues are rather low (Freeman, 1988; Leavitt *et*

al., 1974; Parczyk *et al.*, 1997). As illustrated in Fig. 3, ovariectomized females (Ovx) exhibited very low reporter activity in their vaginal epithelium, only slightly higher than that of nontransgenic animals. Ovariectomy did not affect transgene activity in the tongue epithelium (Fig. 3), as could be expected, since this tissue does not express estrogen or progesterone receptors (Yamashita, 2001). These data support a role for estrogen and progesterone hormones released by the ovary in regulating the HPV-18 promoter in a tissue-specific manner.

Effects of exogenous 17 β -estradiol, progesterone, and their antagonists on HPV-18-LCR-*lacZ* activity in ovariectomized, transgenic females

The inhibitory effect of ovariectomy on β -gal activity prompted us to attempt the rescue of reporter expression by administration of estrogen and progesterone to ovariectomized animals. Groups of transgenic females were ovariectomized and allowed to recover, and their endogenous hormone levels were given time to stabilize for at least 3 weeks, a time when progesterone receptor (PR)

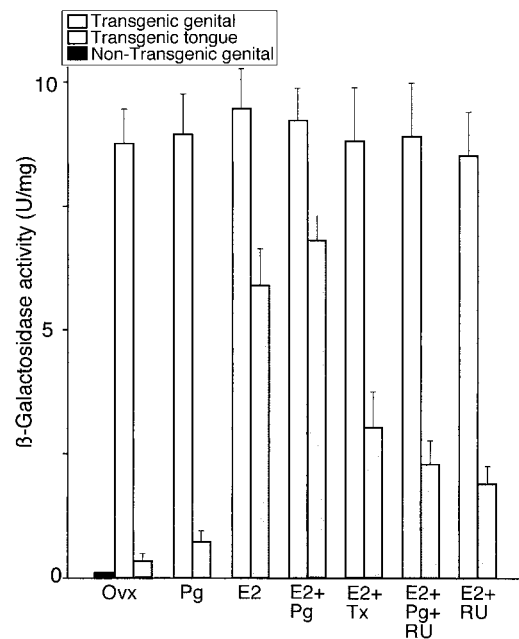


FIG. 3. Effects of estrogen, progesterone, and their antagonists tamoxifen and RU486 on HPV-18-LCR-*lacZ* activity in vagina-cervix and tongue epithelia. Ovariectomized animals (transgenic females and non-transgenic littermates) were either not treated (Ovx) or injected with 17 β -estradiol (E_2), E_2 followed by progesterone (E_2 + Pg), E_2 and tamoxifen (E_2 + Tx), E_2 followed by progesterone and RU486 (E_2 + Pg + RU), E_2 and RU486 (E_2 + RU), or as described in the text. The mice were sacrificed 1 day after hormone administration. Quantitative analysis of β -galactosidase activity was performed with 200 μ g of protein of crude extracts of vagina-cervix and tongue as described under Materials and Methods. β -Galactosidase activities in ovariectomized transgenic and nontransgenic mice injected with vehicle without hormone were comparable to those of untreated animals (Ovx) and are not shown.

decays to a minimum (Graham and Clarke, 1997). The animals were then treated with estrogen, progesterone, or a combination of both hormones before being sacrificed for quantification of β -galactosidase activity in vagina-cervix and tongue epithelia.

As shown in Fig. 3 (column E_2), E_2 administration sufficed to restore transgene activity in the genital tract up to the levels found in nonovariectomized females at the proestrous-estrous phase (compare to Fig. 1B). Two more groups of mice, in which E_2 treatment was repeated once or twice with a 3-day interval, showed reporter activities comparable to those of the group treated only once (data not shown), indicating that the hormone was able to maintain reporter expression to high levels for longer periods. Transgene expression in the epithelium of the tongue was not affected by the E_2 treatment. These results are in agreement with the activation of the HPV-18 LCR by estrogen in cells expressing estrogen receptors.

Although the HPV-18 LCR contains a progesterone responsive element, and progesterone activates HPV-18 transcription *in vitro* (Chan *et al.*, 1989), in our transgenic model administration of progesterone to a group of ovariectomized animals without previous injection of E_2 had a weak effect on reporter expression (Fig. 3). This is not surprising, since ovariectomy reduces PR levels in target cells due to a decrease in circulating estrogens, which are needed to maintain PR expression (Baumann *et al.*, 1999; Leavitt *et al.*, 1974; Tsai and O'Malle, 1994). Therefore, in a third group, previous to progesterone administration PR expression was induced by E_2 treatment as described above. On the third day, these mice were injected once with 500 μ g progesterone. One day later, the mice were sacrificed and reporter expression was quantified. As shown in Fig. 3, this group (column E_2 + Pg) showed a recovery of reporter activity in their vagina-cervix epithelia slightly higher than that obtained by administration of E_2 alone (column E_2). Control transgenic females, ovariectomized and injected as described above but with vehicle without any hormone, displayed no change in reporter activity (data not shown). A possible explanation for the fact that little synergistic effect of the two hormones was obtained may be that E_2 suffices to activate the HPV-18 early promoter to an extent beyond which progesterone has little effect, or that there is inhibitory cross-talk between receptors (Kraus *et al.*, 1995).

We next tested whether, as may be expected if the effect of E_2 were specific, the estrogen antagonist tamoxifen prevented rescue of reporter activity by E_2 in ovariectomized animals. An excess of tamoxifen injected along with E_2 reduced recovery of reporter activity to about 50% of that observed with E_2 alone (Fig. 3, E_2 + Tx). This observation suggests that the estrogen receptor is able to induce activation of the HPV early promoter *in vivo*. Nevertheless, tamoxifen is a weak agonist, which

may account for the incomplete suppression (i.e., to the OvX levels) of β -galactosidase expression in the vagina-cervix of the E_2 -treated ovariectomized females. Similarly, treatment of ovariectomized animals sequentially with E_2 and then with progesterone and a 10-fold excess of the anti-progestin mifepristone (RU486) reduced activation of reporter activity to 40% of that obtained with only E_2 and progesterone ($P < 0.05$) (Fig. 3, E_2 + Pg + RU). This effect is in agreement with activation of transgene expression by the PR. Furthermore, even lower activation was observed when RU486 was administered in combination with E_2 (Fig. 3, E_2 + RU). This inhibition of the E_2 effect by RU486 may be explained by the anti-estrogenic effect of this agent that involves the progesterone receptor (Kraus *et al.*, 1995; McDonnell and Goldman, 1994). The above effects were tissue-specific, since neither ovariectomy nor exogenous administration of estrogen, progesterone, or their antagonists had significant effects on transgene expression in the tongue epithelium (Fig. 3, white bars).

In a previous work using one of our transgenic lines, Michelin *et al.* (1997) investigated the effect of progesterone administration on HPV-18-LCR-*lacZ* activity in tongue epithelia of ovariectomized animals. These authors reported a slight transient activation after 24 h, which we were not able to see in any of the two lines used in our study. This activation, however, was surprising, since progesterone receptors are not expressed in the tongue. We have described previously a transient activation of the HPV-18 LCR by the glucocorticoid dexamethasone in the tongue epithelium of these mice (Cid *et al.*, 1993), which is known to express glucocorticoid receptors (Abbott *et al.*, 1994; Yamashita, 2001). As Michelin *et al.* (1997) used for their experiments progeny derived from a single homozygous transgenic male, those results should be interpreted cautiously. In that study, activity of the HPV-18-LCR-*lacZ* in genital epithelia was not determined.

In summary, we show for the first time *in vivo* a tissue-specific activation of the HPV-18 early promoter by E_2 and progesterone, which can be inhibited by tamoxifen and RU486. Because HPV carcinogenesis relies on expression of the viral early genes, factors influencing HPV expression may be of critical importance in the development of cervical carcinomas. Our data support the notion that ovarian hormones could be one such factor and suggest that sustained elevated serum levels of estrogen and/or progesterone, or increased expression of their receptors in the cervical epithelium, could account for an indirect mechanism of oncogenesis by activating HPV early gene expression. Furthermore, these data suggest that specific estrogen and progesterone antagonists, such as tamoxifen and RU486, may be useful for repressing HPV-18 oncogene expression in cervical carcinomas.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice

HPV-18-LCR-*lacZ* transgenic mice were generated from the hybrid strain C57B1/6J × C3HeB/FeJ by micro-injection, into the pronuclei of one-cell embryos of the F1 generation, of a DNA fragment containing the HPV-18 LCR fused to an *E. coli lacZ* gene and an SV40 poly(A) sequence (Cid *et al.*, 1993). Two lines (Nos. 406 and 411) used in this study were maintained by crossing back transgenic progeny to nontransgenic mice (C57B1/6J × C3HeB/FeJ). Nontransgenic littermate females were used as controls.

Pregnancy and estrous cycle determination

Transgenic females were bred with (C57B1/6J × C3H)F₁ nontransgenic males. Pregnancy was confirmed by the presence of a vaginal plug the following day, which was designated as day 1 of pregnancy. The phase of the estrous cycle in nonpregnant females was determined by microscopic examination of vaginal smears (Cunliffe-Beamer and Les, 1987). For the measurements of β -galactosidase activity shown in Fig. 1, groups of 4–6 and 3–4 females (8–16 weeks old) of lines 406 and 411, respectively, were used.

Ovariectomy and hormonal treatments

Transgenic females (10–16 weeks old) were surgically ovariectomized. Three to five weeks later, they were treated by subcutaneous injection on a daily basis with E₂ and progesterone, separately or in combination, or with injection vehicle alone. A group was injected twice (one dose per day) with E₂ (17 β -estradiol, 15 μ g/day; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluted in propylene glycol and on the third day with the vehicle alone. Another group was injected twice with E₂ as above and on the third day with progesterone (500 μ g; Sigma) diluted in propylene glycol. Similarly, a third group was injected twice with E₂ and then with progesterone plus an excess of RU486 (5 mg; Roussel UCLAF–Hoetsch). A fourth group was injected the first 2 days with E₂ mixed with a 10-fold excess of tamoxifen (150 μ g; Sigma) and the third day with vehicle. Finally, a last group was injected the first 2 days with E₂ mixed with RU486 (5 mg) and the third day with vehicle. Animals were sacrificed on the morning of the fourth day and tissue homogenates prepared for β -galactosidase activity measurements. Each group of animals consisted of 4–6 and 3–4 ovariectomized females (8–16 weeks old) of lines 406 and 411, respectively.

β -Galactosidase activity

Quantitative analysis of β -galactosidase activity in crude extracts was performed by the ONPG assay as described elsewhere (Cid *et al.*, 1993; Cid-Arregui *et al.*, 1998). In brief, 200–400 μ g of total protein extract was

incubated with 800 μ g of ONPG at 37°C for 1 h in PM-2 buffer (33 mM NaH₂PO₄, 66 mM Na₂HPO₄, 0.1 mM MnCl₂, 2 mM MgSO₄, 40 mM β -mercaptoethanol, pH 7.3) to a final volume of 1 ml. Color development was measured at A₄₂₀ against a blank without protein. β -Galactosidase-specific activities were calculated, after subtracting the initial absorbance of the reaction, using the formula units = 380 × A₄₂₀/time (min), such that 1 unit is equivalent to the conversion of 1 nmol of ONPG per min at 37°C (Norton and Coffin, 1985). Histochemistry was performed as described previously (Cid-Arregui *et al.*, 1998). Briefly, after fixation with 2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, 2 mM MgCl₂, in PBS (pH 7.3) for 2 h, organs were washed twice for 5 min at 4°C with 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 2 mM MgCl₂, in PBS, saturated with 30% sucrose, 2 mM MgCl₂/PBS for 3 h at 4°C and frozen using isopentane/liquid N₂. Sections were refixed for 5 min at 4°C, washed for 10 min, stained with X-Gal (1 mg/ml, 2 mM MgCl₂, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, in PBS) for 12 to 20 h at 37°C. For whole-organ staining, vaginas were dissected and immediately fixed in 1% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in PBS for 1 h at room temperature and then washed 4–5 times in PBS. Staining was performed with 1 mg/ml of X-Gal in 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40 in PBS at 30°C for 6 h in the dark. Finally, a second fixation was performed in 1% formaldehyde, 2% glutaraldehyde in PBS.

Statistical analyses

Differences in β -galactosidase expression were analyzed by adjusted one-way ANOVA test with *P* values corrected by the Bonferroni method on all groups of treated mice.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank H. zur Hausen for continuous support, M. A. Cerbón for critical suggestions, and G. D'az-Herrera and G. Bilbao for skillful technical assistance. This work was supported by a grant (MXI 6 G0A 5A) from the Scientific Collaborative Joint Program of the German BMBF and the Mexican CONACyT. N. M.-P. was a recipient of fellowships from CONACyT and DGAPA.

REFERENCES

- Abbott, B. D., McNabb, F. M., and Lau, C. (1994). Glucocorticoid receptor expression during the development of the embryonic mouse secondary palate. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **14**, 87–96.
- Baumann, C., Lim, C., and Hager, G. (1999). Intracellular localization and trafficking of steroid receptors. *Cell. Biochem. Biophys.* **31**, 119–127.
- Brinton, L. A., Huggins, G. R., Lehman, H. F., Mallin, K., Savitz, D. A., Trapido, E., Rosenthal, J., and Hoover, R. (1986). Long-term use of oral contraceptives and risk of invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer* **38**, 399–444.
- Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., Herrero, R., de Britton, R. C.,

- Gaitan, E., Tenorio, F., Garcia, M., and Rawls, W. E. (1989). Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am. J. Epidemiol.* **130**, 486–496.
- Casey, M. L., MacDonald, P. C., and Simpson, E. R. (1992). Endocrinological changes of pregnancy. In "Williams Textbook of Endocrinology" (A. D. W. F. J. D. Wilson, Ed.), pp. 977–991. Saunders, Philadelphia.
- Chan, W. K., Klock, G., and Bernard, H. U. (1989). Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol.* **63**, 3261–3269.
- Cid, A., Auewarakul, P., Garcia-Carranca, A., Ovseiovich, R., Gaissert, H., and Gissmann, L. (1993). Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J. Virol.* **67**, 6742–6752.
- Cid-Arregui, A., Morales-Peza, N., Auewarakul, Garcia-Iglesias, M. J., Juarez, M. V., Diaz, G., and Garcia-Carranca, A. (1998). Transgenic mouse strategies in virus research. In "Microinjection and Transgenesis: Strategies and Protocols" (A. Cid-Arregui and A. García-Carranca, Eds.), pp. 477–504. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Cunliffe-Beamer, T. L., and Les, E. P. (1987). The laboratory mouse. In "The UFAW (Universities Federation for Animal Welfare) Handbook on Care and Management of Laboratory Animals" (T. B. Poole, Ed.), 6th ed., pp. 275–308. Longman, Harlow, Essex.
- Freeman, M. E. (1988). The ovarian cycle of the rat. In "The Physiology of Reproduction" (E. Knobil and J. Neill, Eds.), pp. 1893–1928. Raven Press, New York.
- Garcia-Carranca, A., Thierry, F., and Yaniv, M. (1988). Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* **62**, 4321–4330.
- Goodman, R. (1978). A quantitative analysis of the physiological role of estradiol and progesterone in the control of tonic and surge secretion of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* **102**, 142–150.
- Graham, J. D., and Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* **18**, 502–519.
- Herrero, R., Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., de Britton, R. C., Tenorio, F., and Gaitan, E. (1990). Injectable contraceptives and risk of invasive cervical cancer: Evidence of an association. *Int. J. Cancer* **46**, 5–7.
- Hildesheim, A., Reeves, W. C., Brinton, L. A., Lavery, C., Brenes, M., De La Guardia, M. E., Godoy, J., and Rawls, W. E. (1990). Association of oral contraceptive use and human papillomaviruses in invasive cervical cancers. *Int. J. Cancer* **45**, 860–864.
- Kraus, W. L., Weis, K. E., and Katzenellenbogen, B. S. (1995). Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: Differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progesterone receptors. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1847–1857.
- Leavitt, W. W., Toft, D. O., Strott, C. A., and O'Malley, B. W. (1974). A specific progesterone receptor in the hamster uterus: Physiologic properties and regulation during the estrous cycle. *Endocrinology* **94**, 1041–1053.
- McDonnell, D. P., and Goldman, M. E. (1994). RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* **269**, 11945–11949.
- Michelin, D., Gissmann, L., Street, D., Potkul, R. K., Fisher, S., Kaufmann, A. M., Qiao, L., and Schreckenberger, C. (1997). Regulation of human papillomavirus type 18 in vivo: Effects of estrogen and progesterone in transgenic mice. *Gynecol. Oncol.* **66**, 202–208.
- 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**(Pt 8), 2227–2232.
- Norton, P. A., and Coffin, J. M. (1985). Bacterial β -galactosidase as a marker of Rous sarcoma virus gene expression and replication. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 281–290.
- Parczyk, K., Madjno, R., Michna, H., Nishino, Y., and Schneider, M. R. (1997). Progesterone receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **63**, 309–316.
- 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.
- Rugh, R. (1990). "The Mouse: Its Reproduction and Development." Oxford Univ. Press, New York.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111–114.
- Tsai, M.-J., and O'Malley, Y. B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451–486.
- Yamashita, S. (2001). Histochemistry and cytochemistry of nuclear receptors. *Prog. Histochem. Cytochem.* **36**, 91–176.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections—A major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**, F55–F78.
- zur Hausen, H., and de Villiers, E. M. (1994). Human papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 427–447.

DISCUSIÓN

“Viva la discrepancia que es el espíritu de la Universidad”.
Javier Barros Sierra

La expresión de la región temprana de los VPH de alto riesgo, que incluye a los oncogenes E6 y E7, es un prerrequisito para el proceso de transformación celular asociado a estos virus. Es por eso de particular interés esclarecer los efectores que participan en la transcripción de los genes transformantes del VPH. Para elucidar mecanismos que modulen la expresión de los oncogenes E6-E7 de VPH-18, un análisis de su región de control fue llevado a cabo *in vitro* y en ratones transgénicos. Nos preguntamos por el papel de las hormonas esteroides en estos sistemas. En el presente estudio se analizaron, a este respecto, factores fisiológicos, histológicos y moleculares involucrados en la regulación transcripcional del VPH-18. En esta tesis se muestra que la hormona sexual femenina E₂ regula la actividad de la LCR *in vivo*, tanto la endógena como la administrada exógenamente. Cabe mencionar que antes de nuestro reporte sólo se habían realizado experimentos *in vitro* y ésta es la primera vez que se prueba su relevancia sobre la activación transcripcional del VPH-18 *in vivo*, al utilizarse el órgano genital femenino. También, el examen del GRE del VPH-18 y la repercusión de su mutación en células en cultivo. Los resultados permitirían proponer mecanismos que vinculen a las hormonas esteroides con la inducción del virus y de aquí con el CaCU.

El GRE: mecanismo molecular

Para elucidar el mecanismo molecular por el que los glucocorticoides regulan la transcripción del VPH-18, un análisis por mutagénesis sobre la región reguladora fue llevado a cabo.

La falta de respuesta a glucocorticoides después de cambiar una sola base del GRE, por transversión de pirimidina a purina (C → A), muestra la especificidad del reconocimiento por el complejo hormona-receptor para su funcionalidad correcta y la importancia de que el GR se una a la secuencia como dímero. La mutación en el GRE descarta que el efecto observado con dexametasona sobre la LCR silvestre se deba a la activación del gen para algún factor de transcripción (*v. gr. c-jun*; Jonat et al., 1990).

El receptor de glucocorticoides (así como el de progesterona) coopera con Oct-1 para la respuesta hormonal en el promotor del MMTV (Brüggemeier et al., 1991), y hay una mayor unión de NF-I a su secuencia, promovida por el receptor (Archer et al., 1994), pero esto no se ha determinado para la LCR. Y a pesar de que en la LCR se encuentran motivos de unión para diversos factores (NF-I, Sp1, Oct-1) que se sabe colaboran con el receptor de glucocorticoides para una fuerte sinergia en construcciones quiméricas en células HeLa (Schüle et al., 1988), esta situación no se da en el VPH-18. Esto es una muestra de que los mismos factores pueden tener diferentes actividades en contextos distintos.

Chan y colaboradores (1989) encontraron una fuerte estimulación (más de 10 veces) por dexametasona con la LCR completa del VPH-18, pero frente al promotor *tk* en células HeLa, siendo del doble con el GRE aislado y *tk*.

A diferencia nuestra, Butz y Hoppe-Seyler (1993) con dos mutaciones contiguas en el bloque 5' del GRE (AGCACA → AGCGGA), una de las cuales fue la que cambiamos (→ AGCAAA), lograron un incremento en la actividad basal de la LCR del VPH-18 de 2-3 veces utilizando la misma línea celular que nosotros (HeLa); aunque, igualmente, sin

influencia notoria por parte de la dexametasona. Sin embargo, ellos no buscaron la unión del receptor al elemento de respuesta. La explicación de una posible secuencia reguladora negativa parecería descartarse al ser una de las bases cambiadas la misma que analizamos y la otra estar colindando. Como sea, éste es un claro ejemplo de que mutaciones diferentes en el mismo elemento no necesariamente dan igual resultado.

La posición del GRE es muy cercana a otros sitios para factores de transcripción dentro de la LCR, como YY1 o CDP, y se encuentra dentro del *ori* (Desaintes y Demeret, 1996), por lo que hay la posibilidad que tenga también implicaciones en la replicación viral, aunque en tal caso debe ser cuando el VPH está en forma episomal, es decir en estados precancerosos. Ya sea que E1 y E2, proteínas virales involucradas, eviten temporalmente su unión y viceversa, o cooperen con el GR. Hasta el momento no se sabe con certeza.

La menor activación relativa por el GR entre la región reguladora completa del VPH-18 comparada con el GRE aislado (Figs. 1 y 2, artículo 1) sugiere que en la LCR interactúen factores negativos.

Es interesante que sólo los VPH genitales y no los cutáneos ni animales tengan secuencias GRE potenciales (Chan et al., 1989), lo que podría suponer una función importante para este grupo. Ya que los glucocorticoides pueden cooperar para el proceso de immortalización por DNA de VPH-16 transfectado en células *in vitro* (revisado en Pater et al., 1994), el resultado pudiese ser parecido para el caso del VPH-18. Un posible ejemplo del rol de los glucocorticoides es que se ha visto que el aumento en 4 veces de los transcritos E6-E7 por dexametasona incrementó la proliferación celular de C-4I en proporción similar (von Knebel Doeberitz et al., 1988, 1991), por lo que su papel tal vez no sea despreciable y pueda representar una ventaja. Que haya un GRE funcional para el virus pudiera ser una reminiscencia evolutiva de los 8 que quizás llegó a tener en algún momento, quedando los otros 7 como vestigiales. A diferencia del VPH-16, con 3 GREs que necesitan ser mutados para eliminar la respuesta a la hormona (Mittal et al., 1993), lo que supondría una mayor dependencia de ésta y una mayor incidencia de cáncer.

El VPH es un ejemplo único de virus, tanto de DNA como de humano, activado directamente por glucocorticoides.

La contribución con este trabajo fue mostrar que *in vitro* sólo un sitio de unión al GR, proximal al promotor, es el responsable de esta *trans*-activación inducida.

No hay un evidente *cross-coupling* en nuestro sistema

En contra de lo que se esperaba el GR no cruza con AP1, dado que ambos factores se unen e interfieren uno con otro en su actividad reguladora *in vitro* (Jonat et al., 1990). Se había observado anteriormente una interferencia parcial con un GR humano (que es homólogo del GR de rata), también truncado en su dominio de unión al ligando (Schüle et al., 1990a); y una construcción deleta en el segundo dedo de cinc (equivalente a nuestro GRm) eliminaba completamente la represión. Sin embargo, nosotros observamos lo contrario.

El posible papel de glucocorticoides *in vivo*

En condiciones obligadas de *stress* fisiológico llegan a producirse cantidades de glucocorticoides mayores a las normales, con lo que pudiera haber una exacerbación de las lesiones precursoras de carcinoma y mayores tasas de CaCU. El hecho de que los corticosteroides sirvan para activar vías de estrés (*v. gr.* en el ayuno) sugeriría que estas situaciones estarían vinculadas en el desarrollo del CaCU, al regular positivamente el nivel de la transcripción del VPH. Dentro de poblaciones con deficiencia alimenticia (como suele

suceder en países latinoamericanos, africanos o India, que son también los de más alta incidencia de CaCU) y para restaurar los niveles de glucosa en el plasma sanguíneo, la concentración de glucocorticoides se vería elevada, con la consecuencia de una mayor actividad viral. En el embarazo también aumenta la producción corticosuprarrenal de glucocorticoides (Taylor y Martin, 1998), los cuales podrían cooperar con los esteroides sexuales en la activación hormonal de VPH.

Sería interesante estudiar pacientes con problemas en la secreción hormonal, como el síndrome de Cushing (hipersuprarrenalismo con abundancia de glucocorticoides), que no hayan sido suprarrenalectomizadas, o aquéllas sometidas a terapias con altas dosis de glucocorticoides, y que sean positivas a VPH, observando lesiones genitales y su evolución con respecto a mujeres con concentraciones de glucocorticoides en los intervalos de la normalidad. Igualmente, buscar la concentración de glucocorticoides en mujeres con CaCU respecto a controles. Todo esto para tratar de confirmar o descartar a estos corticosteroides como cofactores de riesgo, pues aunque el VPH pueda ser activado por ellos, no necesariamente significa que sean importantes en el contexto del organismo completo.

Los resultados en transgénicos sugieren que su papel no sea crucial para el VPH-18 *in vivo* (al menos en no embarazadas). Anteriormente se había observado que la dexametasona incrementa débilmente la actividad del transgén en lengua (hasta un 80% a las 12 h; Cid et al., 1993) y al parecer los glucocorticoides endógenos solos tienen poca importancia, como se evidencia cuando ratonas son ovariectomizadas y se pierde la actividad en vagina sin importar los corticoides circulantes en sangre. La corticosterona es el principal glucocorticoide secretado por la suprarrenal de roedor (Guyton, 1984) y dada su actividad menor que la del cortisol se explicaría el muy poco o nulo efecto.

Se podría argumentar que los glucocorticoides alcancen poca concentración fisiológica, a diferencia de *in vitro*. Sin embargo, la concentración de cortisol plasmático en mujeres no embarazadas (0.08-0.54 μM ; Findling et al., 1998) está en el intervalo de la de activación por dexametasona (molécula de cortisol modificada que posee potencia glucocorticoide 30 veces mayor que aquél; Guyton, 1984) de nuestros experimentos, por lo que hipotéticamente tampoco debería haber una respuesta fuerte. El posible efecto combinado de glucocorticoides y esteroides sexuales está aún sin determinar.

La secuencia TRE en células en cultivo

Una posible explicación del porqué el TPA activó sólo al principio a la LCR transfectada permanentemente en células NIH 3T3 es que el resultado fuera un falso positivo. Además, bajo condiciones de “ayuno de suero” en estas células se expresan sólo cantidades residuales de *c-fos*, cuyo producto es parte de AP1 (Sassone-Corsi et al., 1988).

Algo que no habíamos contemplado en ese momento es que al reducir la concentración de suero fetal se activó más la transcripción de la LCR en vez de disminuirse, y esto provocara que finalmente se enmascarara el efecto del TPA; aunque más bien pareciera que se confirma el resultado negativo de Bauknecht y colaboradores (1992) en diferente tipo celular. Otros observaron activación en células NIH 3T3, pero con una concentración 10^3 veces más alta que la nuestra (Gius y Laimins, 1989).

La secuencia YY1 en ratones transgénicos

Se había reportado previamente que sólo la mutación M1 (no M2) tiene efecto en la unión a YY1, y de aquí, sobre la actividad transcripcional del VPH-18 *in vitro* (Bauknecht et al., 1995). Sin embargo, en los ensayos no parece haber diferencia apreciable entre ambas

mutaciones en lengua. Faltaría examinar los órganos genitales femeninos para conocer mejor su función.

Revisando las secuencias modificadas de YY1 se encontró que ambas afectan también a bases del GRE (Comparar Figuras 7B y 13), lo que pudo haber repercutido en el cambio de la transcripción basal viral y deberá ser evaluado en el futuro.

Las construcciones de la serie pLCR β gal

Mediante los fragmentos LCR-*lacZ* se pretende desarrollar ratones transgénicos.

Los ratones con sitios AP1 modificados servirían para comprobar si la importancia *in vitro* de AP1 también es *in vivo*: una supresión en la transcripción de VPH-18 mostraría la trascendencia de esta proteína. Al tener las dos mutaciones separadas o combinadas se verá el papel espacial que tienen estos sitios durante la proliferación y diferenciación del epitelio. Por medio de inmunohistoquímica incluso se podría determinar la influencia relativa de cada uno de los miembros de Jun/Fos presentes en ese momento y su correlación con la actividad viral.

Respecto a la construcción con la LCR del VPH-16, ayudaría a aclarar si el comportamiento hormonal visto con VPH-18 es similar en este otro tipo viral.

Los ensayos con retinoides

Aun sumando los riesgos separados de cofactores como anticonceptivos hormonales combinados, alto número de embarazos y tabaquismo, no se alcanza el total de casos de CaCU (Castellsagué y Muñoz, 2003). Esto indica que existen otros cofactores, fallas en el sistema inmunitario, susceptibilidad genética del individuo (como mutaciones en RARs) o tal vez deficiencia en vitamina A.

Es lógico suponer que en un epitelio normal deba haber mecanismos de represión transcripcional del VPH-18 para lidiar con la infección. Para el caso de retinoides, se ha reportado la regulación negativa de los niveles de mRNA del VPH-18 en células tratadas con RA (Bartsch et al., 1992), por lo que en nuestro sistema con ratones transgénicos también se podría esperar una inhibición parcial. Además, el RA todo *trans* se metaboliza *in vivo* a su esteroisómero RA 9-*cis*, el cual se une con alta afinidad y activa a RARs y RXR (Heyman et al., 1992), lo que podría ayudar en la respuesta a retinoides.

Después de los ensayos preliminares que se realizaron podemos ahora pasar a otros con un número mayor de ratones, para hacer las pruebas estadísticas. Por ejemplo, para evitar las variaciones del transgén durante el ciclo del estro, se podría ovariectomizar ratonas, tratarlas con E₂ junto con RA y analizar la respuesta en epitelio genital. Además, el ayuno previo quizá daría mejores resultados para aumentar la represión del tratamiento inyectado. Una dieta a largo plazo rica vs. una pobre en vitamina A sería deseable en estos ratones. El DMSO no fue un solvente óptimo y debería cambiarse a otro más eficiente (p. ej., etanol), pues en el caso del RA, éste quedó en suspensión.

En caso de que los resultados fuesen satisfactorios una explicación del mecanismo involucrado sería la posible interferencia mutua de AP1 y RARs por un mismo sitio (Schüle et al., 1990b) en la LCR o por una hipotética interacción proteína-proteína entre estas dos clases de factores (Schüle et al., 1991). Otra posibilidad sería la inhibición por RA del gen *c-fos* (Lafyatis et al., 1990).

Las ratonas VPH-18–hormonas

La diferenciación y proliferación celular están sujetas a mecanismos reguladores complejos. La pérdida o daño en el delicado balance de los mecanismos de control puede resultar en transformación neoplásica. La alta paridad y los anticonceptivos hormonales por largo tiempo son cofactores de riesgo que pudieran facilitar la progresión de lesiones premalignas a malignas. Faltaba buscar la vinculación molecular entre el VPH-18 y las hormonas o si éstos ejercen su efecto por separado.

Sólo un pequeño número de LCRs de VPH han sido estudiadas experimentalmente. La mayoría en células en cultivo, por lo que no ha sido posible a la luz de estos estudios conocer la regulación transcripcional real del virus y todos los factores que están involucrados, dado que estas condiciones son irreproducibles en un sistema *in vitro*. Con el sistema de ratones transgénicos se resuelve en parte el problema potencial de extrapolar resultados *in vitro* a *in vivo*. El modelo sistémico aquí descrito ha proporcionado información valiosa para nuestro entendimiento de la expresión genética viral temprana. En éste se dan de manera natural las funciones que existen *in vivo*, como el ciclo ovulatorio o el embarazo, comunes en la ratona y en la mujer. Las concentraciones endócrinas en sangre de ratonas sin ovariectomía son las fisiológicamente normales.

Un mecanismo adicional al aumento de la transcripción viral sería el ejemplificado por E₂ en la carcinogénesis cérvico-vaginal de ratones transgénicos que expresan a E6-E7 del VPH-16 usando el promotor de la queratina 14 (Arbeit et al., 1996), o sea a través de la cooperación entre oncoproteínas y la hormona.

Implicaciones de partos y del uso de anticonceptivos en el marco de los resultados

Los resultados involucran factores hormonales endógenos y exógenos: embarazos y uso de anticonceptivos orales, respectivamente.

Debido a los partos la zona de transición escamocilíndrica del cuello uterino se desplaza al conducto ectocervical, por lo que se ha sugerido que el VPH infectaría más fácilmente el tejido con el consecuente riesgo de desarrollar CaCU (Muñoz et al., 2002). Sin embargo, nuestros resultados apoyan que éstos son eventos independientes y que la elevación de hormonas (estrógenos, glucocorticoides) sería la responsable, al menos parcialmente, del aumento en el riesgo de CaCU a través de la mayor expresión del VPH. Los embarazos, por lo tanto, tendrían también el efecto independientemente de la inmunodepresión que se sabe ocurre en mujeres durante esta etapa o del traumatismo por parto. En Latinoamérica, que es una de las regiones con mayor índice de CaCU en el mundo, hay un alto número de nacimientos.

Por otro lado, se ha mencionado (Moreno et al., 2002) que la mayoría de mujeres toman anticonceptivos orales combinados (estrógeno y progestágeno) y menos del 5% toma anticonceptivos sólo con progestágeno. Asimismo, preparaciones combinadas inyectables han sido muy usadas en algunos países latinoamericanos. En métodos que utilizan sólo progestágeno (como la DMPA) se concluyó que el riesgo de la neoplasia no se elevó apreciablemente (La Vecchia, 1994; Thomas y Ray, 1995), lo que es congruente con la hipótesis de que el estrógeno es la hormona con mayor importancia en la activación del VPH.

Respecto a la edad, se ha observado que la mujer menor de 35 años es más sensible de ser afectada por los embarazos y los anticonceptivos orales para desarrollar CaCU (Thomas et al., 1996; Muñoz et al., 2002), o sea, en plenitud de la función reproductora.

Pero lo más decisivo deben ser las susceptibilidades genéticas al CaCU u otros cofactores, pues tampoco todas las mujeres con VPH y consumo de hormonas o alto número de embarazos lo desarrollan (Castellsagué y Muñoz, 2003).

Los resultados permitirían explicar porque aumenta el riesgo de contraer CaCU en mujeres multíparas y/o que toman anticonceptivos orales, y que al mismo tiempo tienen VPH (Moreno et al., 2002; Muñoz et al., 2002).

Argumentos a favor del efecto de E₂ en la activación del VPH-18

Ante la duda razonable de cuál es la hormona sexual clave, hay evidencias que parecen confirmar de manera convincente que el E₂ es el activador principal de la transcripción genética del VPH-18: 1) En el ciclo del estro se alcanzó una actividad máxima del transgén parecida a como cuando se inyectó exógenamente. 2) Al final del embarazo, el comportamiento del transgén corresponde más a la secreción reportada del estrógeno que a la de la progesterona. 3) La combinación de E₂ y progesterona no aumenta la activación de manera significativa comparada con la del E₂ solo. 4) El tamoxifeno, un bien caracterizado antagonista parcial de la acción de estrógenos, tiene efectos reductivos en la actividad transcripcional del VPH-18. 5) Anteriormente (Cid et al., 1993) se había observado que en el ovario de las transgénicas se tiñen intensamente los folículos maduros, los cuales producen grandes cantidades de estrógenos, pero sólo débilmente los cuerpos lúteos, que son lugar de altas cantidades de progesterona.

Además, en otros sistemas *in vivo* e *in vitro* se ha encontrado lo siguiente: 6) El RU-486, administrado junto con E₂, tiene un efecto antiestrogénico sobre el crecimiento del útero (Kraus y Katzenellenbogen, 1993), lugar de clara actividad específica de nuestro transgén y que sigue un comportamiento similar al de vagina en nuestros experimentos. Éste ha sido llamado efecto antiestrogénico no competitivo, pues el RU-486 no une al receptor de estrógenos, y podría explicar la represión que se obtuvo. 7) Para el caso de células en cultivo la activación por E₂ fue reprimida con RU-486 en presencia del receptor de progesterona (el cual se esperaría estuviera presente en las ratonas después de inyectar el estrógeno), entre varios tipos celulares y sin importar el contexto del promotor, posiblemente a través de un proceso de *quenching* (McDonnell y Goldman, 1994; Kraus et al., 1995). 8) En animales que sufrieron ovariectomía y que se les administró tiempo después sólo E₂ no se encontraron los cambios en el tracto genital propios del tratamiento combinado con progesterona, lo que mostró que la hormona endógena, si es que la hay, tiene influencia fisiológica y probablemente transcripcional poco detectable (Slayden et al., 1993).

De aquí que la conclusión de este trabajo sea que el E₂ (solo o en presencia de progesterona) es capaz de dirigir la regulación del VPH-18 *in vivo*.

Aunque el efecto se observó con el 17 β -estradiol, no puede descartarse que la activación haya sido llevada a cabo por alguno de sus metabolitos (estrona, 16 α -hidroxiestrona –que tiene la propiedad inusual de unir al receptor de estrógenos covalentemente–, estriol) al cual se haya convertido (revisado en de Villiers, 2003).

Así, los estrógenos sexuales femeninos podrían llegar a ser considerados como promotores del CaCU vía el VPH-18, si nuevas evidencias apoyaran esta propuesta. El mecanismo detrás y que favorece la asociación de lesiones malignas permanece oscuro todavía.

Posibles vías de activación del E₂

No conocemos el mecanismo por el cual el estradiol activa la LCR, aunque en principio es lógico suponer que debe ser mediante su receptor. Siendo así habría 4 posibles vías a través de las cuales el receptor de estrógenos debería actuar (Figura 16): A) Unión directa del receptor a la región reguladora del VPH-18. Como ejemplo, el receptor de estrógenos interactúa con el dominio de activación de NF- κ B para estimular a un promotor con ERE (Martínez et al., 1991). B) Funcionando sin unir a la LCR directamente sino actuando sólo por interacciones proteína-proteína. A este respecto, pudiera ser la unión del receptor a algún factor de transcripción, es decir, trabajando como un coactivador; *v. gr.* Sp1 y el receptor de estrógenos interactúan físicamente fuera del DNA incrementando la afinidad del primero a su sitio de reconocimiento en construcciones sin ERE, siendo la *trans*-activación dependiente de E₂ (Porter et al., 1997). Se sabe también que el receptor de estrógenos coopera con Jun/Fos para activar sinérgicamente el promotor del gen de ovoalbúmina, previo tratamiento con estradiol y sin necesidad de unión al DNA por parte del primero (Gaub et al., 1990). Interessantemente, la secuencia activadora involucrada (un medio ERE) tiene homología en 5 de 7 bases al sitio de unión AP1 en la LCR del VPH-18. C) Participando en el control de genes celulares cuyos productos regulen a su vez al promotor viral. Por ejemplo, el E₂ induce la expresión de *c-fos* y *c-jun*, cuyas proteínas son componentes de AP1 (revisado en Lamph, 1991). D) E incluso por la inhibición de genes que codifiquen represores para factores de la transcripción viral.

En los 2 últimos sentidos la respuesta sería más indirecta, como consecuencia de la evolución natural propia del epitelio estratificado, dirigida por los estrógenos, que pondrían en juego a factores necesarios para la transcripción del VPH-18. La diferenciación de las células en el epitelio sexual debe incluir la estimulación o inhibición de síntesis proteínica. En cambio, la progesterona secretada durante el ciclo menstrual no parece modificar el epitelio vaginal (Ham, 1975).

Algunas evidencias que apoyan que la diferenciación celular está involucrada, y no directamente el receptor de estrógenos. 1) No se ha reportado todavía un ERE en la LCR del VPH-18. Hay que puntualizar que la presencia de una secuencia de reconocimiento potencial no significa que ésta sea unida por el receptor. 2) Al castrar deja de haber estratificación epitelial en vagina (Ham, 1975). 3) La proliferación en el epitelio cérvico-vaginal (común en roedores y primates) puede ser mimetizada por terapia estrogénica. En un roedor que ha sufrido la ablación de los ovarios pero recibido por inyección una dosis elevada de estrógenos dos días antes, el epitelio vaginal está muy engrosado y las capas superficiales intensamente queratinizadas, parecido a lo observado en un estro normal (Ham, 1975). 4) Un antagonista de estrógeno puede suprimir los efectos de E₂ sobre la mitosis y queratinización cérvico-vaginal inducida en ratas (Anderson y Kang, 1975). 5) La distribución espacial de los receptores de estrógeno reportada en el epitelio estratificado cérvico-vaginal (Celli et al., 1996; Mowa e Iwanaga, 2000; Wang et al., 2000) parece no corresponder con la actividad de β -galactosidasa observada en las ratonas. Si esto se confirmara en las transgénicas reforzaría la idea de que debe haber la expresión inducida por E₂ de otros factores transcripcionales involucrados. La maduración epitelial también explicaría porque en otros órganos cuantificados (intestino delgado, riñón, testículo, etc.) no hay alta actividad de la LCR, pues en ellos no hay esta estratificación. Sin embargo, la estratificación no explicaría la regulación hormonal encontrada en útero, donde la actividad es en epitelio glandular y cilíndrico (Cid et al., 1993), lo que apunta a la participación del E₂ en 2 vías diferentes.

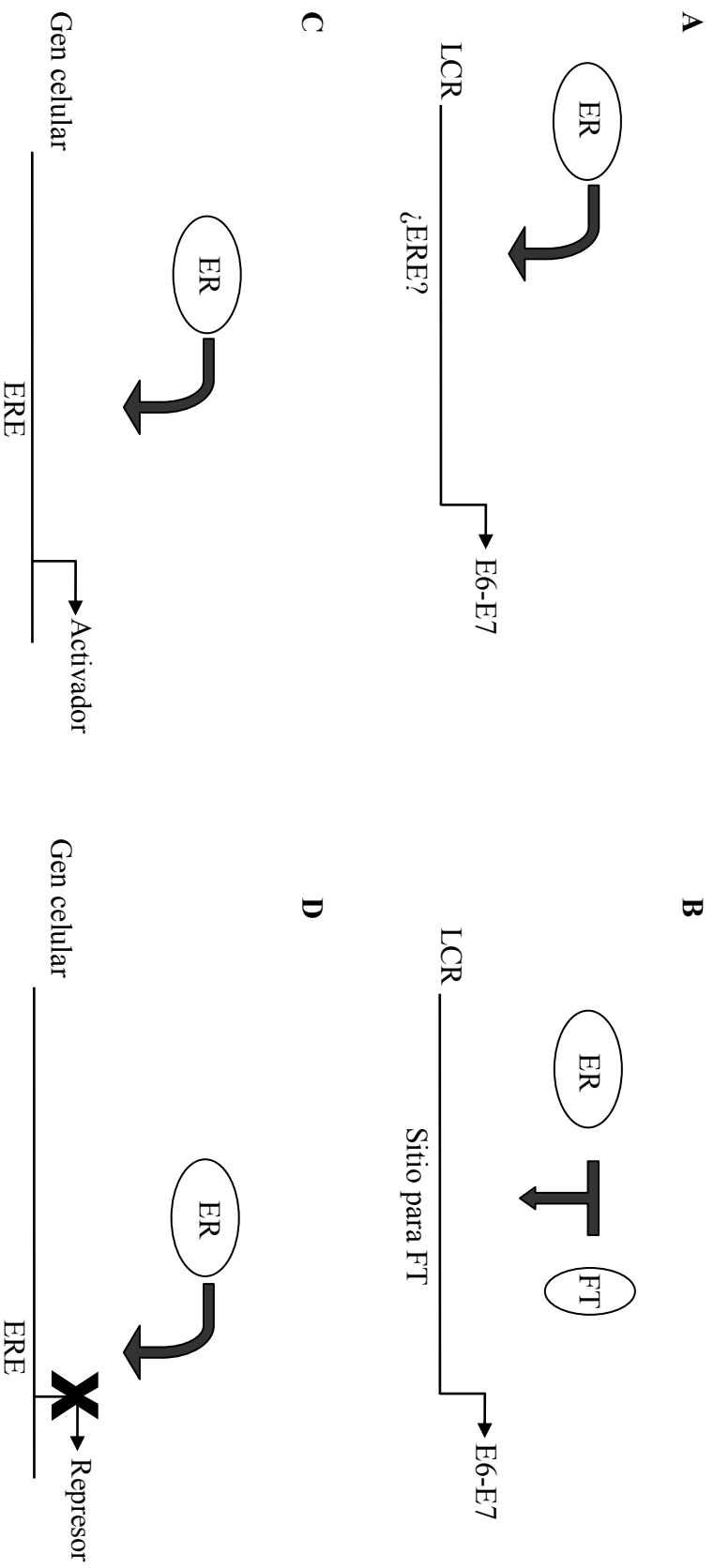


Figura 16. Modelos hipotéticos de algunas de las posibles vías de activación del receptor de estrógenos sobre el VPH-18.

- (A) Unión directa a secuencia en la LCR, activando, o compitiendo por sitio con un factor negativo superlapiado, desreprimiendo.
- (B) Enlace a algún factor de transcripción para coadyuvar a la unión de éste a su secuencia.
- (C) Activación de genes que codifiquen para factores de transcripción que actúen directa o indirectamente sobre la LCR.
- (D) Interferencia con la expresión de algún represor transcripcional para activadores del VPH-18.
- ER, receptor activado de estrógenos; ERE, elemento de respuesta a estrógenos; FT, factor de transcripción.

También es factible que el efecto en CaCU fuera una combinación donde el receptor y la diferenciación actúen de forma conjunta. Por ejemplo, en adenocarcinomas de cérvix hay una correlación entre el grado de diferenciación y la presencia del receptor de estrógenos (bien diferenciado > moderadamente diferenciado > pobremente diferenciado) (Masood et al., 1993). Esto también sugiere que el receptor tiene un rol para la diferenciación tanto en tejido normal como en maligno.

Para comprobar que la respuesta es directamente conferida por el receptor de estrógenos sobre un ERE en la LCR se necesitarían realizar ensayos con un gen reportero, primeramente en células en cultivo, cotransfectando con el plásmido que exprese la forma activada de aquél o agregando la hormona; probar con mutaciones en las posibles bases de unión; por ensayos de *shift-binding* o por *footprinting* y con extractos de células que tengan el receptor y expuestas previamente a E₂. Se inició transfectando células MCF7 (las cuales expresan el receptor de estrógenos) con el plásmido P₁₀₅-wt por el método de coprecipitación de fosfato de calcio, pero además de haber sido muy agresivo, lo que provocó una alta mortalidad celular, aparentemente no hubo activación alguna con E₂ (dato no mostrado). Se deberá intentar con otras células que tengan al receptor. La obtención de resultados negativos apoyaría que el efecto es a través de otros factores relacionados a la diferenciación epitelial.

Más interesante sería que, en estratos basales y parabasales, se encontraran presentes represores celulares de la transcripción del VPH (Figura 17). De esta manera, en las capas superiores ya no habría la represión y lo que vemos como actividad sería en realidad una “desrepresión” (ver más adelante).

Implicaciones biológicas e interpretaciones de los resultados

Al incrementar la actividad de la LCR, las concentraciones altas y prolongadas de hormonas esteroides (incluidos los glucocorticoides) en la mujer, ya sea de manera natural y/o inducida, constituirían un cofactor de riesgo en la carcinogénesis cervical. Esto se da en el órgano sexual femenino ya que aquí están las condiciones más favorables para la actividad del virus tales como tipo celular, receptores hormonales, diferenciación celular apropiada, etc. El epitelio estratificado que recubre el cuello uterino en la zona de transición, lugar donde comienza el CaCU, es parecido al que reviste la vagina y con el cual se continúa (Ham, 1975). Dados los resultados, parecería que necesariamente debe estar involucrado el E₂ por alguna vía.

Otra consecuencia de nuestros datos es la de apoyar que el mecanismo de acción de las hormonas en el CaCU es a través de la expresión del virus y no por influenciar su tasa de infección o replicación (Schneider et al., 1987; Moreno et al., 2002). Esto en base a los experimentos *in vitro* e *in vivo* donde hay una respuesta hormonal de la LCR dosis dependiente. Extrapolando los resultados pudiera ser concebible pensar que en el epitelio genital de la mujer la célula cancerosa sea en parte el producto de la suma acumulada de eventos hormonales repetidos en el tiempo (cada ciclo menstrual y/o estimulación extensiva durante el embarazo). Es decir, un efecto persistente sobre el epitelio. La respuesta de la región de control a hormonas sexuales podría ser responsable para el tropismo tisular viral ya que sólo ciertas células, particularmente las del tracto genital, son diana de ellas.

El papel de las hormonas sexuales debería también estar involucrado en que este cáncer se desarrollase en mujeres antes de la menopausia, aun cuando fuese detectado en edades posteriores en gran parte de los casos (WHO, 2008). Igualmente, los datos sugieren que una característica esencial de la mujer para el desarrollo del CaCU está relacionada a la

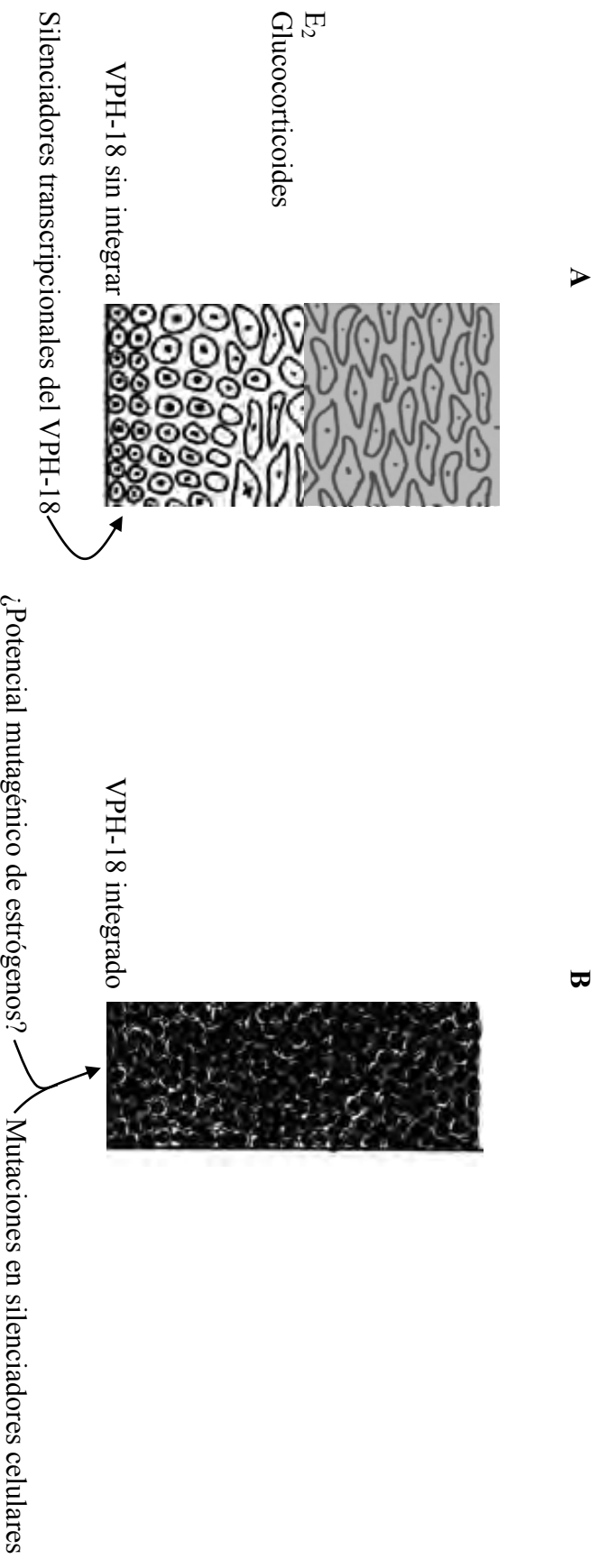


Figura 17. Esquema general de la actividad transcripcional del VPH-18 en el tejido genital.

(A) Epitelio premaligno. La expresión sólo se da en células diferenciadas del epitelio estratificado (parte sombreada). El estradiol (E_2) induce la diferenciación celular a través de la expresión de factores celulares. Los glucocorticoides también participan en la activación viral. Los silenciadores celulares impiden actividad del virus en estratos basal y parabasal.

(B) Carcinoma. La expresión ahora es a lo ancho de todo el epitelio debido a las mutaciones en los silenciadores transcripcionales. El rompimiento del genoma viral en el gen para su represor transcripcional E_2 aumenta aún más la actividad.

producción hormonal. Entre los casos de cáncer cervical estudiados en una población, la proporción de mujeres con cualquier anormalidad menstrual (en frecuencia, duración, cantidad o dolor) fue significativamente más baja que entre los controles (Kessler et al., 1974). El VPH-18 podría ser más dependiente de los esteroides sexuales que el VPH-16, como sugirió el hecho de que los cánceres con el primero ocurrieron en pacientes con una media de 37 años, y con el segundo a los 49 años (Barnes et al., 1988).

Algo sorprendente fue que las lecturas de hembras transgénicas con ovariectomía dieran un valor similar al de las no transgénicas. Esto muestra que el E₂ es un factor esencial para la transcripción *in vivo* del VPH-18, ya sea mediante el receptor hormonal interactuando en combinación con los otros factores transcripcionales sobre la LCR; o más probablemente, mediante factores expresados a través del fenotipo estratificado, con lo que habría una relación muy estrecha entre la regulación celular y viral. Los estrógenos serían una señal de *switch* para el virus, lo que debe ser un aspecto importante en la transición hacia la malignidad.

Si la activación estrogénica fuese sólo a través de un proceso intrínseco a la maduración epitelial involucraría que, en buena parte de los tumores, esta dependencia debe darse en estadios primarios de la lesión, pues ya después de esta etapa se presenta una resistencia a la diferenciación. Asimismo, implicaría que después de que se alcanzara el estado desdiferenciado ya no sería necesaria la hormona, es decir, el carcinoma sería independiente de ésta si en él hubieran los factores necesarios para la transcripción viral; o que simplemente la diferenciación terminal ya no fuese necesaria debido a la carencia de E₂ en el tumor.

Hay una pregunta que se plantea a partir de los resultados. Si la expresión del VPH-18 es en las capas superiores del epitelio, ¿cómo es que el estado transformado se extiende al resto de los estratos? Datos experimentales indican fuertemente que, junto a la presencia de VPH oncogénicos en el epitelio cervical, otros eventos clave son requeridos para la conversión maligna completa de células infectadas: genes celulares tienen que ser modificados pues interfieren con la inducción de E6 y E7. Se ha propuesto la necesidad de una falla en un mecanismo de vigilancia intracelular (presumiblemente modulado un factor humoral), para la expresión genética de VPH (zur Hausen, 1986). Así, un primer paso fundamental en la carcinogénesis del epitelio basal debe ser la pérdida o inactivación de controles celulares negativos, con la acompañada activación de E6 y E7. En este sentido posibles candidatos serían miembros de la familia C/EBP (α , β o LIP) u Oct-1, cuya sobreexpresión en HeLa se sabe reprimen la transcripción viral (Hoppe-Seyler et al., 1991; Bauknecht y Shi, 1998); el represor CDP, que se expresa en células epiteliales basales (O'Connor et al., 2000); pRb, el cual recluta a LIP a su sitio en la LCR (Darnell et al., 2005); para el caso de p53, que se encuentra sólo en capas inferiores (Gusterson et al., 1991), la proteína murina y la humana inhiben a la LCR en ensayos de transfección (Desaintes et al., 1995). La represión que ejerce la célula sobre la transcripción de VPH-18 *in vivo* estaría todavía activa en células en proliferación pero ya no en células en diferenciación.

Las alteraciones celulares podrían ser incluso sobre los genes de los receptores hormonales, volviéndolos transcripcionalmente más eficientes (independientes del ligando); o sobre el metabolismo de estrógenos en el epitelio genital, con lo que ya no sería necesario mayores concentraciones circulantes (Auborn et al., 1991). Poco estudiado, pero muy atractivo, es que los estrógenos participaran también con su potencial mutagénico sobre el DNA de la hospedera (revisado en Cavalieri et al., 2006).

Aquí, a diferencia de reportes en lesiones de bajo grado (Stoler et al., 1992), podemos descartar a E2, y es una prueba de que la inactividad de la LCR en las células basales y parabasales es debida a reguladores celulares. Las mujeres que presenten susceptibilidad a ser dañadas en este mecanismo de regulación serían propensas a que avance la lesión.

Finamente, la influencia estrogénica indicaría una desventaja en la mujer y pudiera ser una razón de que los hombres infectados por el virus no desarrollen cáncer genital en número importante, a pesar de que la prevalencia de VPH pareciera ser similar en ambos (Bosch, 2003).

El presente estudio ha demostrado también que nuestro modelo *in vivo* puede ser útil para probar diferentes anticonceptivos hormonales sobre la transcripción del VPH, así como para evaluar medicamentos terapéuticos o preventivos, previo a su uso en humanos, u otros compuestos sintéticos (*e. g.*, Villanueva et al., 2006).

El posible papel de las hormonas esteroides sexuales *in vivo*

Los estrógenos deben ser muy importantes sobre todo en estadios premalignos, donde el DNA del VPH-18 se encuentra en estado episomal y controlado transcripcionalmente por E2, y que aquí sirvieran para desinhibir parcialmente este estado reprimido (ver modelo de Figura 17A); y que en células malignas tal vez ya no hicieran falta las hormonas, por no haber E2 (Figura 17B). A favor de esta hipótesis, en la lesión intraepitelial cervical de bajo grado E6-E7 están presentes en los estratos medio y superior aún con producción de E2 (Stoler et al., 1992). Otra posible prueba es que se tiene un reporte donde glucocorticoides y progesterona inducen la expresión de VPH-16 episomal (Mittal et al., 1993).

Es probable que el papel de los estrógenos sea desde estados precancerosos y no necesariamente para el mantenimiento del estado transformado, ya que: 1) en nuestro modelo *in vivo* las células son normales, sin cambios hacia una neoplasia; el comportamiento del transgén en el epitelio parece ser más bien representativo de una infección inicial (como en la NIC I) y se sabe que el patrón espacial de la expresión de E6-E7 cambia conforme progresa el grado de la lesión (Stoler et al., 1992); 2) el efecto de anticonceptivos orales es desde lesiones previas al cáncer invasivo (Stern et al., 1977); 3) la presencia de receptores a esteroides sexuales (incluyendo el de estrógenos) disminuye notablemente en CaCU escamoso respecto a estadios premalignos (Monson et al., 1991); 4) no todos los tumores cervicales presentan receptores de hormonas sexuales (Ford et al., 1983; Masood et al., 1993); 5) mujeres con aparentemente muchos años después de la menopausia aparecen en las estadísticas de mortalidad por este cáncer (WHO, 2008). Posteriormente podría haber una independencia de la hormona y la expresión constante de los oncogenes del VPH a escala suficiente para mantener el crecimiento de las células infectadas, sin importar los bajos niveles esteroides en el climaterio (ver Implicaciones biológicas e interpretaciones de los resultados). De aquí también se desprende la idea de que las mujeres en premenopausia pueden tener un mayor riesgo de desarrollar CaCU después de la infección al VPH-18 que las posmenopáusicas.

El resultado de la pobre estimulación con progesterona en hembras castradas es coherente con la activación reportada en células transfectadas con la LCR del VPH-18 y tratadas con la misma hormona (Chan et al., 1989). Este reporte indica que el PRE es aparentemente más relevante en la LCR del VPH-16.

Las glándulas suprarrenales normalmente secretan cantidades tanto de estrógeno como de progesterona, aunque demasiado pequeñas para que ejerzan acción importante sobre la economía (Guyton, 1984), por lo que en la mujer no embarazada éstas aparentemente

tampoco serían suficientes para activar la LCR, como sugiere su nula actividad después de la ovariectomía en las transgénicas.

Faltaría determinar si el mayor riesgo para desarrollar carcinomas de origen glandular por la infección de VPH-18, respecto al VPH-16 (Castellsagué et al., 2006), tiene algún significado biológico para el virus tomando en cuenta a las hormonas. Se ha reportado que en mujeres que han usado preparaciones orales, el riesgo de carcinoma adenomatoso (que incluye al adenocarcinoma y al carcinoma adenoescamoso) es mayor con progestinas de potencia alta y dosis de estrógeno bajas, y menor en consumidoras de progestinas con potencia baja y dosis de estrógeno alta (Thomas et al., 1996), sugiriendo que la progesterona es la principal hormona involucrada en el riesgo de esta clase de tumores. Otro reporte, en cambio, sugiere que las consumidoras de largo plazo de píldoras con potencia estrógena alta tienen mayor riesgo de adenomatosos que los de potencia baja (Brinton et al., 1986), por lo que está por determinarse la participación de cada hormona sobre cada tipo histológico y/o de VPH. Además, los adenocarcinomas bien diferenciados de cérvix contienen comúnmente al receptor de estrógenos y de progesterona, mientras que los pobremente diferenciados no los tienen (Ford et al., 1983), complicando todavía más el panorama.

Más investigación es necesaria para describir en que paso los cofactores hormonales de riesgo están trabajando, definir el mecanismo biológico, tipos y subtipos tisulares de carcinomas sobre los que actúan, y cómo afectan a cada genotipo de VPH oncogénico, para identificar su influencia sobre la progresión a cáncer. Además, para saber cuáles de las formulaciones hormonales anticonceptivas, tanto las ya existentes en el mercado como las nuevas, promueven la carcinogénesis cervicouterina.

Para intentar elucidar el papel de los esteroides sexuales en el carcinoma cervical una posibilidad sería medir la concentración de estas hormonas en mujeres con CaCU, buscando diferencias significativas con controles. También, buscar enzimas formadoras de estrógenos en el tejido maligno, tratando de relacionarlas con la progresión. Otro estudio epidemiológico factible sería examinar la incidencia de CaCU en mujeres que tienen problemas prematuros de hormonas y que no las producen, por razones naturales o inducidas (ovariotomía o medicamentos), y comparar con mujeres sin éstos.

En conclusión, el E₂ debe ser un cofactor necesario, aunque no suficiente, para la carcinogénesis cervical.

Perspectivas clínicas

Hasta ahora el conocimiento de la biología del VPH no ha sido llevado a la clínica y traducido en el tratamiento del cáncer cervical o sus lesiones precursoras. Lo presentado aquí son apenas meras pistas para la aproximación a una terapia endócrina en pacientes.

Un razonamiento que se desprende de los resultados es la probable utilización de drogas que interfieran con la actividad esteroidea, para intentar controlar la expresión viral en pacientes con lesiones premalignas o cancerosas tempranas. Como ejemplo, el tamoxifeno es usado para el tratamiento de cáncer mamario dependiente de hormona, con hasta 60% de pacientes que responden favorablemente (Parker y Bakker, 1991). Para el caso del CaCU, ya que el tamoxifeno (que dio una reducción de la activación del transgén a la mitad) es un antagonista parcial, suena razonable que un antiestrógeno puro como ICI 164 384 pueda ser más efectivo. Sin embargo, el tratamiento con tamoxifeno tiene pocos efectos adversos en comparación con el ICI 164 384, como es la osteoporosis. Las pacientes resistentes a tamoxifeno que surgieran podrían posteriormente tratarse con el antiestrógeno puro.

Asimismo, no hay que soslayar el potencial uso terapéutico del RU-486. La unión del complejo GR–RU-486 al GRE del VPH-18, el cual traslapa con el *ori* (Desaintes y Demeret, 1996), pudiera evitar la replicación viral (en lesiones premalignas), al mismo tiempo que la transcripción. Aunado a la regulación transcripcional negativa del VPH-18, el RU-486 tiene un efecto antiproliferativo y provoca un incremento en la tasa de apoptosis en epitelio genital (Slayden et al., 1993). El RU-486 o el tamoxifeno serían menos agresivos que otros tratamientos con quimioterapia.

Tradicionalmente no se considera que los carcinomas cervicales respondan a tratamiento endócrino. El punto en cuestión sería qué pacientes pudieran ser beneficiadas. En principio, candidatas a tomar en cuenta podrían ser (1) premenopáusicas (2) con carcinomas bien diferenciados (ya que éste es el grado histológico que correspondería a nuestras observaciones) (3) en los que se encuentre el VPH-18 y (4) donde los receptores a estrógeno y progesterona se expresen.

Adicionalmente, se puede combinar el tratamiento antihormonal junto con retinoides. Antagonistas hormonales y retinoides también podrían ser útiles en pacientes con riesgo de desarrollar un segundo tumor después de la remoción del primario. Tumores con VPH-18 tienen un mayor porcentaje de recurrencia que los que contienen VPH-16 (Walker et al., 1989).

La expectativa de éxito está basada en que la inhibición de los oncogenes virales E6-E7 revierte el fenotipo maligno *in vitro* (von Knebel Doeberitz et al., 1991, 1994), por lo que su represión podría modular las propiedades de lesiones malignas cervicales y ser de utilidad. Igualmente, los antagonistas podrían servir como un tratamiento en las etapas premalignas genitales. Inhibidores de estrógenos ya han sido usados en la clínica para este fin (Kitasato et al., 1989).

Finalmente, algo importante por remarcar es que las consumidoras de píldoras anticonceptivas con lesiones cervicales positivas a VPH están en un riesgo mayor de progresión a CaCU y deberían estar bajo vigilancia clínica y manejo más estricto.

Consideraciones finales

Hay varios aspectos que se deben considerar todavía y que no se han contemplado en este trabajo. (i) No tenemos presencia de proteínas virales en nuestro modelo *in vivo* (*i. e.*, E5, E6 o E7), las cuales interfieren con funciones celulares normales, y particularmente de E2, que es el represor viral. (ii) Se ha mencionado la probable existencia de al menos otros tres sitios de inicio transcripcional además de P₁₀₅: P₂₈ (Thierry et al., 1987a,b), P₅₆ (Steger et al., 2001) y otro dentro del gen E7 (Desaintes y Demeret, 1996), los cuales podrían tener un papel en la expresión viral y que no han sido suficientemente estudiados. (iii) Aquí sólo examinamos la expresión del promotor de VPH-18 con genes reporteros, pero hay eventos postranscripcionales que deben ser igual o más trascendentales que el inicio de la transcripción en la regulación viral. (iv) Nosotros estudiamos la LCR prototipo (Cole y Danos, 1987) pero en pacientes puede haber mutaciones en elementos importantes con la consiguiente elevación en la transcripción (*v. gr.* Sp1; Rose et al., 1998). (v) El sitio de la integración viral en el genoma podría dar un efecto diferencial a las hormonas, como se ha propuesto para el caso de líneas celulares (von Knebel Doeberitz et al., 1991), y hasta evitar el requerimiento de aquéllas. (vi) El fondo genético y factores exógenos (alimentación, tabaquismo) pueden favorecer la predisposición en algunas mujeres, lo que no se considera aquí. Todo lo anterior influiría en el proceso carcinogénico conjunto VPH-hormona.

Los resultados *in vivo* muestran que la transcripción del VPH es regulada en respuesta al tipo de tejido, el estado de diferenciación del epitelio y el momento fisiológico de la hospedera. El efecto biológico último de la infección por VPH debe ser dependiente de la interacción de factores virales, celulares, hormonales, inmunológicos, elementos que actúen en *cis*, y diferencias cuantitativas y cualitativas en activadores transcripcionales.

Los ensayos realizados en este estudio contribuyen a un mejor entendimiento de la modulación de la transcripción temprana del VPH-18 y a una propuesta del papel de las hormonas en el desarrollo del CaCU. También es un buen ejemplo de la intrincada relación entre un parásito y su huésped, que puede estar correlacionada con los cambios hormonales de la última.

Todo lo presentado aquí es una muestra de lo extraordinariamente complejo que es el mecanismo de regulación de un gen eucarionte sólo a nivel del inicio transcripcional. Así, la transcripción depende tanto de factores intracelulares como de señales extracelulares. Los resultados dan pistas sobre la interconexión entre estos dos circuitos de control en el desarrollo del carcinoma. Además, ponen de manifiesto lo diferente que pueden ser los modelos *in vitro* e *in vivo*, e incluso en diferentes células del mismo organismo. También evidencian que aunque el VPH es necesario para la conversión maligna, al igual que otros tipos de cánceres, el CaCU es resultado de un proceso multifactorial.

Nuestro entendimiento completo de la regulación de un solo gen eucarionte está todavía lejano...Reconocer esto es el primer gran paso para avanzar.

CONCLUSIONES

“Mientras vivas, sigue aprendiendo a vivir”.
Séneca

- **Las hormonas esteroides activan la transcripción temprana del VPH-18.**

La región reguladora responde tanto en células en cultivo como en ratones transgénicos. Esto muestra el papel de las hormonas sobre la transcripción viral y postula que son cofactores necesarios en el proceso carcinogénico.

- **Un GRE, próximo a la caja TATA, es responsable de la respuesta a glucocorticoides.**

El mecanismo de activación es a través de la unión de su receptor sobre la región larga de control.

- **La integridad del GRE es requerida para conservar la transcripción basal y la respuesta a esta hormona.**

Una transversión evitó al receptor de glucocorticoides unirse y confirmó que otros GREs potencialmente presentes en la región de control transcripcional no contribuyen significativamente a la inducción hormonal.

- **El receptor de glucocorticoides puede cooperar de manera aditiva con los factores AP1 o hbrm en la respuesta transcripcional.**

Sin embargo, la activación por el receptor es dependiente de AP1 y mutuamente independiente de hbrm.

- **La transcripción del virus *in vivo* es dependiente de 17 β -estradiol.**

En ratonas transgénicas el E₂ actúa sobre la LCR independientemente de progesterona.

- **El 17 β -estradiol regula *in vivo* la transcripción viral tanto bajo condiciones naturales como inducidas.**

La regulación se da específicamente en epitelio genital.

Adicionalmente se encontró que la vagina es un órgano ideal para estudiar la expresión del transgén en nuestro modelo, dado su bajo fondo endógeno y alta actividad específica.

- ***In vivo* el 17 β -estradiol es la hormona esteroide más importante en la regulación transcripcional del VPH-18.**

No hubo respuesta importante por los glucocorticoides endógenos después de la ovariectomía. La progesterona exógena no basta para activar completamente al promotor viral y combinada con el estradiol no aumenta el efecto de éste.

- **Antihormonales pueden interferir con la respuesta a 17 β -estradiol.**

Esto sugiere que serían herramientas útiles en el tratamiento de mujeres portadoras del VPH-18 con lesiones premalignas o cáncer cervical.

REFERENCIAS

“(…) ni la sentencia,
que tanto alcanza,
es para un tonto
sin esperanza”.
Pitipitipín

Andersen, B., Schonemann, M. D., Flynn, S. E., Pearse II, R. V., Singh, H., and Rosenfeld, M. G. (1993). Skn-1a and Skn-1i: two functionally distinct Oct-2-related factors expressed in epidermis. *Science* 260, 78-82.

Anderson, W. A., and Kang, Y. H. (1975). Estrogen and antagonist-induced structural changes in the cervico-vaginal epithelium of immature rats. *Am. J. Anat.* 144, 197-207.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.

Arbeit, J. M., Howley, P. M., and Hanahan, D. (1996). Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2930-2935.

Archer, T. K., Zaniwski, E., Moyer, M. L., and Nordeen, S. K. (1994). The differential capacity of glucocorticoids and progestins to alter chromatin structure and induce gene expression in human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 8, 1154-1162.

Arends, M. J., Donaldson, Y. K., Duvall, E., Wyllie, A. H., and Bird, C. C. (1993). Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. *Hum. Pathol.* 24, 432-437.

Auborn, K. J., Woodworth, C., DiPaolo, J. A., and Bradlow, H. L. (1991). The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 49, 867-869.

Barbosa, M. S., and Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage *in vitro* transformation of human keratinocytes. *Oncogene* 4, 1529-1532.

Barnes, W., Delgado, G., Kurman, R. J., Petrilli, E. S., Smith, D. M., Ahmed, S., Lorincz, A. T., Temple, G. F., Jenson, A. B., and Lancaster, W. D. (1988). Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 29, 267-273.

Bartsch, D., Boye, B., Baust, C., zur Hausen, H., and Schwarz, E. (1992). Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand

regulation of the retinoic acid receptor β gene in non-tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells. *EMBO J.* 11, 2283-2291.

Bauknecht, T., and Shi, Y. (1998). Overexpression of C/EBP β represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein. *J. Virol.* 72, 2113-2124.

Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.-D., and zur Hausen, H. (1992). Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* 11, 4607-4617.

Bauknecht, T., Jundt, F., Herr, I., Oehler, T., Delius, H., Shi, Y., Angel, P., and zur Hausen, H. (1995). A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J. Virol.* 69, 1-12.

Bauknecht, T., See, R. H., and Shi, Y. (1996). A novel C/EBP β -YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* 70, 7695-7705.

Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.

Beato, M., Chalepakis, G., Schauer, M., and Slater, E. P. (1989). DNA regulatory elements for steroid hormones. *J. steroid Biochem.* 32, 737-747.

Bedell, M. A., Jones, K. H., and Laimins, L. A. (1987). The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and Rat-1 cells. *J. Virol.* 61, 3635-3640.

Bedell, M. A., Jones, K. H., Grossman, S. R., and Laimins, L. A. (1989). Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J. Virol.* 63, 1247-1255.

Bednarek, P. H., Lee, B. J., Gandhi, S., Lee, E., and Phillips, B. (1998). Novel binding sites for regulatory factors in the human papillomavirus type 18 enhancer and promoter identified by *in vivo* footprinting. *J. Virol.* 72, 708-716.

Beral, V., Hannaford, P., and Kay, C. (1988). Oral contraceptive use and malignancies of the genital tract. Results from the Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *Lancet ii*, 1331-1335.

Bernard, B. A., Bailly, C., Lenoir, M.-C., Darmon, M., Thierry, F., and Yaniv, M. (1989). The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J. Virol.* 63, 4317-4324.

Bosch, F. X. (2003). Epidemiology of human papillomavirus infections: New options for cervical cancer prevention. *Salud Publica Mex* 45, suppl 3, S326-S339.

Bosch, F. X., Schwarz, E., Boukamp, P., Fusenig, N. E., Bartsch, D., and zur Hausen, H. (1990). Suppression *in vivo* of human papillomavirus type 18 E6-E7 gene expression in nontumorigenic HeLa x fibroblast hybrid cells. *J. Virol.* 64, 4743-4754.

Bosch, F. X., Muñoz, N., de Sanjosé, S., Izarzugaza, I., Gili, M., Viladiu, P., Tormo, M. J., Moreo, P., Ascunce, N., Gonzalez, L. C., Tafur, L., Kaldor, J. M., Guerrero, E., Aristizabal, N., Santamaria, M., Alonso de Ruiz, P., and Shah, K. (1992). Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer* 52, 750-758.

Bosch, F. X., Manos, M. M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K. V., and International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 796-802.

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3, 1151-1157.

Boyer, S. N., Wazer, D. E., and Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 56, 4620-4624.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brinton, L. A., Huggins, G. R., Lehman, H. F., Mallin, K., Savitz, D. A., Trapido, E., Rosenthal, J., and Hoover, R. (1986). Long-term use of oral contraceptives and risk of invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer* 38, 339-344.

Brinton, L. A., Hamman, R. F., Huggins, G. R., Lehman, H. F., Levine, R. S., Mallin, K., and Fraumeni, J. F. (1987). Sexual and reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 79, 23-30.

Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., Herrero, R., de Britton, R. C., Gaitan, E., Tenorio, F., Garcia, M., and Rawls, W. E. (1989). Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am. J. Epidemiol.* 130, 486-496.

Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., Herrero, R., de Britton, R. C., Gaitan, E., Tenorio, F., Garcia, M., and Rawls, W. E. (1990). Oral contraceptive use and risk of invasive cervical cancer. *Int. J. Epidemiol.* 19, 4-11.

Brisson, J., Morin, C., Fortier, M., 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.

Brüggemeier, U., Kalff, M., Franke, S., Scheidereit, C., and Beato, M. (1991). Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the MMTV promoter through synergistic interaction with hormone receptors. *Cell* 64, 565-572.

Butz, K., and Hoppe-Seyler, F. (1993). Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* 67, 6476-6486.

Castellsagué, X., and Muñoz, N. (2003). Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31, 20-28.

Castellsagué, X., Bosch, F. X., and Muñoz, N. (2003). The male role in cervical cancer. *Salud Publica Mex* 45, suppl 3, S345-S353.

Castellsagué, X., Díaz, M., de Sanjosé, S., Muñoz, N., Herrero, R., Franceschi, S., Peeling, R. W., Ashley, R., Smith, J. S., Snijders, P. J. F., Meijer, C. J. L. M., Bosch, F. X.; for the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. (2006). Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 303-315.

Cavalieri, E., Chakravarti, D., Guttenplan, J., Hart, E., Ingle, J., Jankowiak, R., Muti, P., Rogan, E., Russo, J., Santen, R., and Sutter, T. (2006). Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochim. Biophys. Acta* 1766, 63-78.

Celli, G., Darwiche, N., and De Luca, L. M. (1996). Estrogen induces retinoid receptor expression in mouse cervical epithelia. *Exp. Cell Res.* 226, 273-282.

Chan, W.-K., Klock, G., and Bernard, H.-U. (1989). Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol.* 63, 3261-3269.

Cid, A., Auewarakul, P., Garcia-Carranca, A., Ovseiovich, R., Gaissert, H., and Gissmann, L. (1993). Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J. Virol.* 67, 6742-6752.

Cid-Arregui, A., **Morales-Peza, N.**, Auewarakul, P., Garcia-Iglesias, M. J., Juarez, M. V., Diaz, G., and Garcia-Carranca, A. (1998a). Transgenic mouse strategies in virus research. En *Microinjection and Transgenesis: Strategies and Protocols*, A. Cid-Arregui and A. García-Carrancá, eds. (Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 477-504.

Cid-Arregui, A., Santana, C., Guido, M., **Morales-Peza, N.**, Juarez, M. V., Wepf, R., and Garcia-Carranca, A. (1998b). Protocols for the manual and automatic microinjection of somatic cells in culture and for the analysis of microinjected cells. En *Microinjection and*

Transgenesis: Strategies and Protocols, A. Cid-Arregui and A. García-Carrancá, eds. (Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 3-30.

Cole, S. T., and Danos, O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J. Mol. Biol.* *193*, 599-608.

Crum, C. P., Nuovo, G., Friedman, D., and Silverstein, S. J. (1988). Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *J. Virol.* *62*, 84-90.

Cullen, A. P., Reid, R., Campion, M., and Lörincz, A. T. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* *65*, 606-612.

Darnell, G. A., Antalis, T. M., Rose, B. R., and Suhrbier, A. (2005). Silencing of integrated human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cells expressing SerpinB2. *J. Virol.* *79*, 4246-4256.

de Villiers, E.-M. (1989). Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J. Virol.* *63*, 4898-4903.

de Villiers, E.-M. (2003). Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int. J. Cancer* *103*, 705-708.

de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* *324*, 17-27.

Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M., and Thierry, F. (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* *71*, 9343-9349.

Desaintes, C., and Demeret, C. (1996). Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin. Cancer Biol.* *7*, 339-347.

Desaintes, C., Hallez, S., Van Alphen, P., and Burny, A. (1992). Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* *66*, 325-333.

Desaintes, C., Hallez, S., Detremmerie, O., and Burny, A. (1995). Wild-type p53 down-regulates transcription from oncogenic human papillomavirus promoters through the epithelial specific enhancer. *Oncogene* *10*, 2155-2161.

Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* *243*, 934-937.

Ebeling, K., Nischán, P., and Schindler, Ch. (1987). Use of oral contraceptives and risk of invasive cervical cancer in previously screened women. *Int. J. Cancer* 39, 427-430.

Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., and Orth, G. (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J. Virol.* 21, 1205-1209.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.

Findling, J. W., Aron, D. C., y Tyrrell, J. B. (1998). Glucocorticoides y andrógenos suprarrenales. En *Endocrinología Básica y Clínica*, F. S. Greenspan y G. J. Stewler, eds., 4a. ed. (México: El Manual Moderno), pp. 361-410.

Ford, L. C., Berek, J. S., Lagasse, L. D., Hacker, N. F., Heins, Y. L., and DeLange, R. J. (1983). Estrogen and progesterone receptor sites in malignancies of the uterine cervix, vagina, and vulva. *Gynecol. Oncol.* 15, 27-31.

Freeman, M. E. (1988). The ovarian cycle of the rat. En *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. Neill et al., eds. (New York: Raven Press), pp. 1893-1928.

García-Carranca, A., Thierry, F., and Yaniv, M. (1988). Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62, 4321-4330.

Gaub, M.-P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P., and Sassone-Corsi, P. (1990). Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the Fos-Jun complex. *Cell* 63, 1267-1276.

Gius, D., and Laimins, L. A. (1989). Activation of human papillomavirus type 18 gene expression by herpes simplex virus type 1 viral transactivators and a phorbol ester. *J. Virol.* 63, 555-563.

Gius, D., Grossman, S., Bedell, M. A., and Laimins, L. A. (1988). Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62, 665-672.

Gloss, B., Yeo-Gloss, M., Meisterernst, M., Rogge, L., Winnacker, E. L., and Bernard, H.-U. (1989). Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res.* 17, 3519-3533.

Goldfien, A., y Monroe, S. E. (1998). Ovarios. En *Endocrinología Básica y Clínica*, F. S. Greenspan y G. J. Stewler, eds., 4a. ed. (México: El Manual Moderno), pp. 497-554.

Gusterson, B. A., Anbazhagan, R., Warren, W., Midgely, C., Lane, D. P., O'Hare, M., Stamps, A., Carter, R., and Jayatilake, H. (1991). Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 6, 1785-1789.

Guyton, A. C. (1984). Endocrinología y reproducción. En *Tratado de Fisiología Médica* (Parte XIII), 6a. ed. (México: Interamericana), pp. 1081-1235.

Ham, A. W. (1975). Sistema reproductor femenino. En *Tratado de Histología*, 7a. ed. (México: Interamericana), pp. 789-837.

Harris, R. W. C., Brinton, L. A., Cowdell, R. H., Skegg, D. C. G., Smith, P. G., Vessey, M. P., and Doll, R. (1980). Characteristics of women with dysplasia or carcinoma *in situ* of the cervix uteri. *Br. J. Cancer* 42, 359-369.

Hashida, T., and Yasumoto, S. (1991). Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J. Gen. Virol.* 72, 1569-1577.

Havre, P. A., Yuan, J., Hedrick, L., Cho, K. R., and Glazer, P. M. (1995). p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.* 55, 4420-4424.

Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8, 3905-3910.

Heap, R. B. (1982). Papel de las hormonas en el embarazo. En *Procesos de Reproducción en los Mamíferos 3: Hormonas en la Reproducción*, C. R. Austin y R. V. Short, coordinadores (México: La Prensa Médica Mexicana), pp. 72-104.

Herrero, R., Brinton, L. A., Reeves, W. C., Brenes, M. M., de Britton, R. C., Tenorio, F., and Gaitan, E. (1990). Injectable contraceptives and risk of invasive cervical cancer: evidence of an association. *Int. J. Cancer* 46, 5-7.

Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., and Thaller, C. (1992). 9-*cis* retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406.

Hoppe-Seyler, F., and Butz, K. (1992). Activation of human papillomavirus type 18 E6-E7 oncogene expression by transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Res.* 20, 6701-6706.

Hoppe-Seyler, F., and Butz, K. (1993). A novel *cis*-stimulatory element maps to the 5' portion of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region and is functionally dependent on a sequence-aberrant Sp1 binding site. *J. Gen. Virol.* 74, 281-286.

Hoppe-Seyler, F., Butz, K., and zur Hausen, H. (1991). Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J. Virol.* 65, 5613-5618.

Hudson, J. B., Bedell, M. A., McCance, D. J., and Laimins, L. A. (1990). Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes *in vitro* by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 64, 519-526.

Hurlin, P. J., Kaur, P., Smith, P. P., Perez-Reyes, N., Blanton, R. A., and McDougall, J. K. (1991). Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 570-574.

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. (2007). Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 370, 1609-1621.

Jensen, E. V. (1991). Overview of the nuclear receptor family. En *Nuclear Hormone Receptors*, M. G. Parker, ed. (San Diego: Academic Press Limited), pp. 1-13.

Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.

Kaur, P., and McDougall, J. K. (1988). Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62, 1917-1924.

Kessler, I. I., Kulčar, Z., Zimolo, A., Grgurević, M., Strnad, M., and Goodwin, B. J. (1974). Cervical cancer in Yugoslavia. II. Epidemiologic factors of possible etiologic significance. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 51-60.

Kitasato, H., Fabiani, B., Busuttil, M., Reynes, M., Hillova, J., Hill, M., and Mathé, G. (1989). Regression of the malignant aspects of intraepithelial neoplasias following an LH-RH agonist treatment and detection of human papillomavirus by molecular hybridization. *Biomed. Pharmacother.* 43, 183-185.

Kjellberg, L., Hallmans, G., Åhren, A.-M., Johansson, R., Bergman, F., Wadell, G., Ångström, T., and Dillner, J. (2000). Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br. J. Cancer* 82, 1332-1338.

Kraus, W. L., and Katzenellenbogen, B. S. (1993). Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132, 2371-2379.

Kraus, W. L., Weis, K. E., and Katzenellenbogen, B. S. (1995). Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1847-1857.

Krüger-Kjær, S., van den Brule, A. J. C., Svare, E. I., Engholm, G., Sherman, M. E., Poll, P. A., Walboomers, J. M. M., Bock, J. E., and Meijer, C. J. L. M. (1998). Different risk factor patterns for high-grade and low-grade intraepithelial lesions on the cervix among HPV-positive and HPV-negative young women. *Int. J. Cancer* 76, 613-619.

Kyo, S., Klumpp, D. J., Inoue, M., Kanaya, T., and Laimins, L. A. (1997). Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J. Gen. Virol.* 78, 401-411.

La Vecchia, C. (1994). Depot-medroxyprogesterone acetate, other injectable contraceptives, and cervical neoplasia. *Contraception* 49, 223-230.

La Vecchia, C., Decarli, A., Fasoli, M., Franceschi, S., Gentile, A., Negri, E., Parazzini, F., and Tognoni, G. (1986). Oral contraceptives and cancers of the breast and of the female genital tract. Interim results from a case-control study. *Br. J. Cancer* 54, 311-317.

Lafyatis, R., Kim, S. J., Angel, P., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Karin, M., and Wilder, R. L. (1990). Interleukin-1 stimulates and all-trans-retinoic acid inhibits collagenase gene expression through its 5' activator protein-1-binding site. *Mol. Endocrinol.* 4, 973-980.

Lamph, W. W. (1991). Cross-coupling of AP-1 and intracellular hormone receptors. *Cancer Cells* 3, 183-185.

Leavitt, W. W., Toft, D. O., Strott, C. A., and O'Malley, B. W. (1974). A specific progesterone receptor in the hamster uterus: physiologic properties and regulation during the estrous cycle. *Endocrinology* 94, 1041-1053.

Ley, C., Bauer, H. M., Reingold, A., Schiffman, M. H., Chambers, J. C., Tashiro, C. J., and Manos, M. M. (1991). Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 997-1003.

Liu, X., Han, S., Baluda, M. A., and Park, N.-H. (1997). HPV-16 oncogenes E6 and E7 are mutagenic in normal human oral keratinocytes. *Oncogene* 14, 2347-2353.

Los Alamos National Laboratory (1996). Group C sequences. En *Human Papillomaviruses 1996: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*, G. Myers, C. Baker, C. Wheeler, A. Halpern, A. McBride, J. Doorbar, eds. (New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics), pp. I-C-1-I-C-7. http://hpv-web.lanl.gov/COMPENDIUM_PDF/94PDF/1/smlc.pdf [Consulta: 16 septiembre 2009].

Mack, D. H., and Laimins, L. A. (1991). A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9102-9106.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

Martin, L. G., Demers, G. W., and Galloway, D. A. (1998). Disruption of the G₁/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J. Virol.* 72, 975-985.

Martinez, E., Dusserre, Y., Wahli, W., and Mermoud, N. (1991). Synergistic transcriptional activation by CTF/NF-I and the estrogen receptor involves stabilized interactions with a limiting target factor. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2937-2945.

Masood, S., Rhatigan, R. M., Wilkinson, E. W., Barwick, K. W., and Wilson, W. J. (1993). Expression and prognostic significance of estrogen and progesterone receptors in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 72, 511-518.

McDonnell, D. P., and Goldman, M. E. (1994). RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 269, 11945-11949.

McDougall, J. K. (1994). immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 186, 101-119.

Medina-Martinez, O., **Morales-Peza, N.**, Yaniv, M., García-Carrancá, A., and Thierry, F. (1996). A single element mediates glucocorticoid hormone response of HPV18 with no functional interactions with AP1 or hbrm. *Virology* 217, 392-396.

Mittal, R., Tsutsumi, K., Pater, A., and Pater, M. M. (1993). Human papillomavirus type 16 expression in cervical keratinocytes: role of progesterone and glucocorticoid hormones. *Obstet. Gynecol.* 81, 5-12.

Monsonogo, J., Magdelenat, H., Catalan, F., Coscas, Y., Zerat, L., and Sastre, X. (1991). Estrogen and progesterone receptors in cervical human papillomavirus related lesions. *Int. J. Cancer* 48, 533-539.

Moon, R. C., and Mehta, R. G. (1991). Vitamin A and the prevention of cancer. In *Retinoids in Cutaneous Malignancy*, R. Marks, ed. (Cambridge: Blackwell Scientific Publications), pp. 1-15.

Moreno, V., Bosch, F. X., Muñoz, N., Meijer, C. J. L. M., Shah, K. V., Walboomers, J. M. M., Herrero, R., Franceschi, S., for the International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study Group. (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359, 1085-1092.

Morimoto, S., Fernandez-Mejia, C., Romero-Navarro, G., **Morales-Peza, N.**, and Díaz-Sánchez, V. (2001). Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat. *Endocrinology* 142, 1442-1447.

Mowa, C. N., and Iwanaga, T. (2000). Differential distribution of oestrogen receptor- α and - β mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by *in situ* hybridization. *J. Endocrinol.* 165, 59-66.

Muchardt, C., and Yaniv, M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* *SNF2/SWI2* and *Drosophila brm* genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 12, 4279-4290.

Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., and Schlegel, R. (1989a). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63, 4417-4421.

Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., and Howley, P. M. (1989b). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8, 4099-4105.

Muñoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J. S., Shah, K. V., Meijer, C. J. L. M., Bosch, F. X., for the International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study Group. (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359, 1093-1101.

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., and Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518-527.

National Center for Biotechnology Information (2009). *Papillomaviridae*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=151340> [Consulta: 16 septiembre 2009].

Negrini, B. P., Schiffman, M. H., Kurman, R. J., Barnes, W., Lannom, L., Malley, K., Brinton, L. A., Delgado, G., Jones, S., Tchabo, J.-G., and Lancaster, W. D. (1990). Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Res.* 50, 4670-4675.

Nuovo, G. J., MacConnell, P., Forde, A., and Delvenne, P. (1991). Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 139, 847-854.

O'Connor, M., Chan, S.-Y., and Bernard, H.-U. (1995). Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. *En Human Papillomavirus 1995*, pp. III-21-III-40. http://hvp-web.lanl.gov/COMPENDIUM_PDF/95PDF/3/oconnor.pdf [Consulta: 16 septiembre 2009].

O'Connor, M. J., Stünkel, W., Koh, C.-H., Zimmermann, H., and Bernard, H.-U. (2000). The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J. Virol.* 74, 401-410.

Offord, E. A., and Beard, P. (1990). A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J. Virol.* 64, 4792-4798.

Ovseiovich, R., **Morales, N.**, y García Carrancá, A. (1994). Modelos animales para el estudio de la expresión de los papilomavirus humanos. En *Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM*, (México: Universidad Nacional Autónoma de México), pp. 157-159.

Parazzini, F., La Vecchia, C., Negri, E., Cecchetti, G., and Fedele, L. (1989). Reproductive factors and the risk of invasive and intraepithelial cervical neoplasia. *Br. J. Cancer* 59, 805-809.

Parazzini, F., Chatenoud, L., La Vecchia, C., Negri, E., Franceschi, S., and Bolis, G. (1998). Determinants of risk of invasive cervical cancer in young women. *Br. J. Cancer* 77, 838-841.

Parker, M. G., and Bakker, O. (1991). Nuclear hormone receptors: concluding remarks. En *Nuclear Hormone Receptors*, M. G. Parker, ed. (San Diego: Academic Press Limited), pp. 377-395.

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, 229-235.

Pecoraro, G., Lee, M., Morgan, D., and Defendi, V. (1991). Evolution of *in vitro* transformation and tumorigenesis of HPV16 and HPV18 immortalized primary cervical epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 138, 1-8.

Peritz, E., Ramcharan, S., Frank, J., Brown, W. L., Huang, S., and Ray, R. (1977). The incidence of cervical cancer and duration of oral contraceptive use. *Am. J. Epidemiol.* 106, 462-469.

Phelps, W. C., Yee, C. L., Münger, K., and Howley, P. M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53, 539-547.

Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J., and DiPaolo, J. A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 61, 1061-1066.

Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., and Safe, S. (1997). Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 11, 1569-1580.

Romanczuk, H., Villa, L. L., Schlegel, R., and Howley, P. M. (1991). The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J. Virol.* 65, 2739-2744.

Rose, B., Steger, G., Dong, X.-P., Thompson, C., Cossart, Y., Tattersall, M., and Pfister, H. (1998). Point mutations in Sp1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J. Gen. Virol.* 79, 1659-1663.

Rotkin, I. D. (1973). A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res.* 33, 1353-1367.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. *En Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 7.18-7.22.

Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C., and Verma, I. M. (1988). Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos*. *Nature* 334, 314-319.

Schatt, M. D., Rusconi, S., and Schaffner, W. (1990). A single DNA-binding transcription factor is sufficient for activation from a distant enhancer and/or from a promoter position. *EMBO J.* 9, 481-487.

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136.

Scheffner, M., Romanczuk, H., Münger, K., Huibregtse, J. M., Mietz, J. A., and Howley, P. M. (1994). Functions of human papillomavirus proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 186, 83-99.

Schiffman, M. H., Bauer, H. M., Hoover, R. N., Glass, A. G., Cadell, D. M., Rush, B. B., Scott, D. R., Sherman, M. E., Kurman, R. J., Wacholder, S., Stanton, C. K., and Manos, M. M. (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 958-964.

Schlegel, R., Phelps, W. C., Zhang, Y.-L., and Barbosa, M. (1988). Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J.* 7, 3181-3187.

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.

Schüle, R., Muller, M., Kaltschmidt, C., and Renkawitz, R. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 242, 1418-1420.

Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M., and Evans, R. M. (1990a). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.

Schüle, R., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., Bolado, J., Pike, J. W., and Evans, R. M. (1990b). Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* 61, 497-504.

Schüle, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Verma, I. M., and Evans, R. M. (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6092-6096.

Schwarz, E., and Schneider-Gädick, A. (1986). Expression of human papillomavirus type-18 DNA in cervical carcinoma cell lines. En *Cancer Cells 4: DNA Tumor Viruses*, M. Botchan, T. Grodzicker and P. A. Sharp, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 581-587.

Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314, 111-114.

Schwarz, E., Schneider-Gädick, A., Roggenbuck, B., Mayer, W., Gissmann, L., and zur Hausen, H. (1986). Expression of human papillomavirus DNA in cervical carcinoma cell lines. En *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, R. Peto and H. Zur Hausen, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 281-290.

Seagon, S., and Dürst, M. (1994). Genetic analysis of an *in vitro* model system for human papillomavirus type 16-associated tumorigenesis. *Cancer Res.* 54, 5593-5598.

Sedman, S. A., Barbosa, M. S., Vass, W. C., Hubbert, N. L., Hass, J. A., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J. Virol.* 65, 4860-4866.

Severne, Y., Wieland, S., Schaffner, W., and Rusconi, S. (1988). Metal binding „finger” structures in the glucocorticoid receptor defined by site-directed mutagenesis. *EMBO J.* 7, 2503-2508.

Short, R. V. (1982). Papel de las hormonas en los ciclos sexuales. En *Procesos de Reproducción en los Mamíferos 3: Hormonas en la Reproducción*, C. R. Austin y R. V. Short, coordinadores (México: La Prensa Médica Mexicana), pp. 41-71.

Slayden, O. D., Hirst, J. J., and Brenner, R. M. (1993). Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys during antiprogesterone treatment. *Endocrinology* 132, 1845-1856.

Smith, F. R. (1931). Etiologic factors in carcinoma of the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 21, 18-25.

Smith, J. S., Green, J., Berrington de Gonzalez, A., Appleby, P., Peto, J., Plummer, M., Franceschi, S., and Beral, V. (2003). Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 361, 1159-1167.

Spalholz, B. A., and Howley, P. M. (1989). Papillomavirus-host cell interactions. En *Advances in Viral Oncology*, Vol. 8, G. Klein, ed. (New York: Raven Press), pp. 27-53.

Steger, G., Rehtanz, M., and Schnabel, C. (2001). Identification of a promoter in position 56 within the long control region of human papillomavirus type 18. *Arch. Virol.* 146, 2069-2084.

Stern, E., Forsythe, A. B., Youkeles, L., and Coffelt, C. F. (1977). Steroid contraceptive use and cervical dysplasia: increased risk of progression. *Science* 196, 1460-1462.

Stoler, M. H., Mills, S. E., Gersell, D. J., and Walker, A. N. (1991). Small-cell neuroendocrine carcinoma of the cervix. A human papillomavirus type 18-associated cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* 15, 28-32.

Stoler, M. H., Rhodes, C. R., Whitbeck, A., Wolinsky, S. M., Chow, L. T., and Broker, T. R. (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol.* 23, 117-128.

Stünkel, W., and Bernard, H.-U. (1999). The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J. Virol.* 73, 1918-1930.

Tan, S.-H., Leong, L. E.-C., Walker, P. A., and Bernard, H.-U. (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* 68, 6411-6420.

Tan, T. M. C., and Ting, R. C. Y. (1995). *In vitro* and *in vivo* inhibition of human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes. *Cancer Res.* 55, 4599-4605.

Taylor, R. N., y Martin, M. C. (1998). Endocrinología del embarazo. En *Endocrinología Básica y Clínica*, F. S. Greenspan y G. J. Strewler, eds., 4a. ed. (México: El Manual Moderno), pp. 623-653.

Thierry, F., Carranca, A. G., and Yaniv, M. (1987a). Elements that control the transcription of genital human papillomavirus type 18. En *Cancer Cells 5: Papillomaviruses*, B. M. Steinberg, J. L. Brandsma and L. B. Taichman, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 23-32.

Thierry, F., Heard, J. M., Dartmann, K., and Yaniv, M. (1987b). Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J. Virol.* 61, 134-142.

Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M., and Howley, P. (1992). Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J. Virol.* 66, 3740-3748.

Thomas, D. B., and Ray, R. M. (1995). Depot-medroxyprogesterone acetate (DMPA) and risk of invasive adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas of the uterine cervix. WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Contraception* 52, 307-312.

Thomas, D. B., Ray, R. M., and The World Health Organization Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. (1996). Oral contraceptives and invasive adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas of the uterine cervix. *Am. J. Epidemiol.* 144, 281-289.

Thummel, C. S., Boulet, A. M., and Lipshitz, H. D. (1988). Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* 74, 445-456.

Vessey, M. P. (1986). Epidemiology of cervical cancer: Role of hormonal factors, cigarette smoking and occupation. En *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*, R. Peto and H. zur Hausen, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 29-43.

Vessey, M. P., Lawless, M., McPherson, K., and Yeates, D. (1983). Neoplasia of the cervix uteri and contraception: a possible adverse effect of the pill. *Lancet* *ii*, 930-934.

Villanueva, R., **Morales-Peza, N.**, Castelán-Sánchez, I., García-Villa, E., Tapia, R., Cid-Arregui, A., García-Carrancá, A., López-Bayghen, E., and Gariglio, P. (2006). Heparin (GAG-hed) inhibits LCR activity of human papillomavirus type 18 by decreasing AP1 binding. *BMC Cancer* 6:218. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/218>

Vogt, P. K., and Bos, T. J. (1990). *jun*: oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* 55, 1-35.

von Knebel Doeberitz, M., Oltersdorf, T., Schwarz, E., and Gissmann, L. (1988). Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* 48, 3780-3786.

von Knebel Doeberitz, M., Bauknecht, T., Bartsch, D., and zur Hausen, H. (1991). Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1411-1415.

von Knebel Doeberitz, M., Rittmüller, C., zur Hausen, H., and Dürst, M. (1992). Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int. J. Cancer* 51, 831-834.

von Knebel Doeberitz, M., Rittmüller, C., Aengeneyndt, F., Jansen-Dürr, P., and Spitkovsky, D. (1994). Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. *J. Virol.* 68, 2811-2821.

Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer, C. J. L. M., and Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12-19.

Walker, J., Bloss, J. D., Liao, S. Y., Berman, M., Bergen, S., and Wilczynski, S. P. (1989). Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet. Gynecol.* 74, 781-785.

Wang, H., Eriksson, H., and Sahlin, L. (2000). Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 63, 1331-1340.

Watanabe, S., and Yoshiike, K. (1988). Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus type-18 DNA. *Int. J. Cancer* 41, 896-900.

Watanabe, S., Kanda, T., and Yoshiike, K. (1989). Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J. Virol.* 63, 965-969.

Welter, J. F., and Eckert, R. L. (1995). Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncogene* 11, 2681-2687.

Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-79.

White, A. E., Livanos, E. M., and Tlsty, T. D. (1994). Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev.* 8, 666-677.

WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. (1993). Invasive squamous-cell cervical carcinoma and combined oral contraceptives: results from a multinational study. *Int. J. Cancer* 55, 228-236.

Woodworth, C. D., Doniger, J., and DiPaolo, J.A. (1989). Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J. Virol.* 63, 159-164.

World Health Organization. (2000). Statistical Annex. En The World Health Report 2000: Health Systems: Improving Performance, (France), pp. 143-203. http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_annex_en.pdf [Consulta: 17 septiembre 2009].

World Health Organization. (2001). 50 Facts: Global health situation and trends 1955-2025. http://www.who.int/whr/1998/media_centre/50facts [Consulta: 14 septiembre 2009].

World Health Organization. (2006). Table 1: Numbers and rates of registered deaths. (Mexico). <http://apps.who.int/whosis/database/mort/table1.cfm> [Consulta: 11 septiembre 2009].

World Health Organization. (2008). Annex A: Deaths and DALYs 2004: Annex tables. En *The Global Burden of Disease: 2004 Update*, (Switzerland), pp. 53-95. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_AnnexA.pdf [Consulta: 21 septiembre 2009].

Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R., and Howley, P. M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* 119, 361-366.

Yukawa, K., Butz, K., Yasui, T., Kikutani, H., and Hoppe-Seyler, F. (1996). Regulation of human papillomavirus transcription by the differentiation-dependent epithelial factor Epoc-1/skn-1a. *J. Virol.* 70, 10-16.

Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1989). Cloning of murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor γ predominantly expressed in skin. *Nature* 339, 714-717.

zur Hausen, H. (1986). Intracellular surveillance of persisting viral infections: Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet ii*, 489-491.

zur Hausen, H. (1991). Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184, 9-13.

zur Hausen, H. (1999). immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin. Cancer Biol.* 9, 405-411.

zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 690-698.

zur Hausen, H., and de Villiers, E.-M. (1994). Human papillomaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 427-447.

APÉNDICE 1

—Ser uno mismo es, siempre, llegar a ser ese otro que somos y que llevamos escondido en nuestro interior, más que nada como promesa o posibilidad de ser”.
Octavio Paz, *El laberinto de la soledad*

TRANSGENIC MOUSE STRATEGIES IN VIRUS RESEARCH

Cid-Arregui, A., Morales-Peza, N., Auewarakul, P., Garcia-Iglesias, M. J.,
Juarez, M. V., Diaz, G., and Garcia-Carranca, A.

En Microinjection and transgenesis: strategies and protocols, Springer Lab Manual.

Transgenic Mouse Strategies in Virus Research

ANGEL CID-ARREGUI^{1*}, NESTOR MORALES-PEZA²,
PRASERT AUEWARAKUL³, MARIA JOSE GARCIA-IGLESIAS⁴,
MARIA VICTORIA JUAREZ⁵, GINA DIAZ²,
AND ALEJANDRO GARCIA-CARRANCA²

Introduction

The use of viruses and viral genes for infection and microinjection experiments with mouse embryos has greatly contributed to the development of transgenic technologies. Likewise, these techniques have proved very useful in providing insights into basic aspects of virus research, specially into those related to viral pathogenesis and virus-host interactions. Indeed, an impressive number of studies involving transgenic mice carrying viral sequences have been reported during the past 10 years (nearly 900 records can be retrieved from the Medline databases under the entries transgenic mouse and virus). The following is a summary of the main topics on virus research using transgenic mice, including some illustrative references:

- Studies on the oncogenic activity of viral proteins (see for review Adams and Cory 1991; Merlino 1994). Oncogenes of the so-called tumor viruses (zur Hausen 1991) have been expressed in mouse tissues from either homologous or heterologous viral control regions, or with the help of eukaryotic promoters. In the latter case, promoters of

* corresponding author: phone: +49-6221-548321; fax: +49-6221-548301;
e-mail: cid@urz.uni-heidelberg.de

¹ Dept. of Neurobiology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364,
D-69120 Heidelberg, Germany

² Dept. of Molecular Biology, Institute for Biomedical Research, 04510 Mexico City,
Mexico

³ Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Mahidol University, 10700 Bangkok,
Thailand

⁴ Dept. of Animal Pathology: Animal Medicine. Faculty of Veterinary Science,
University of Leon, 24071-Leon, Spain

⁵ European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg,
Germany

genes expressed selectively in specific tissues have been preferred. Thus, for instance, the α -A crystallin promoter and the keratin 10 promoters have been used to target transgene expression to lens and skin, respectively (e.g., Griep et al. 1993; Auewarakul et al. 1994). In some cases, two or more viral oncogenes were combined in transgenic mice for studies on oncogene cooperation (e.g., van Lohuizen et al. 1991; see also Berns 1991), as was done previously in studies in vitro. In addition, transgenes containing tissue-specific promoters fused to viral oncogenes (most frequently the SV40 large T-antigen), have been used to assess many aspects of tumorigenesis, apoptosis, and cell cycle control. Recently, male germ cells have been reported to undergo transmeiotic differentiation in vitro by expression of the SV40 large T-antigen (see Rassoulzadegan et al., Chap. 12, this Vol.).

- Immunology research using viral genes. A great number of studies have used expression of viral proteins in transgenic mice to assess different aspects of immunology, such as antigen presentation, auto-antibody production, peptide-induced tolerance, ablation of tolerance, T-cell selection, T-cell trafficking into the central nervous system, etc. (see, e.g., Ohashi et al. 1991; Oldstone and Southern 1993; Ashton-Rickardt et al. 1994; see also Moreno et al. Chap. 27, this Vol.). As an example, mice expressing viral proteins in the β -islets of pancreas have proved useful to study autoimmune diabetes since they have allowed to test induction of T-cell tolerance by peptides (Aichele et al. 1994).
- Specific cell ablation using viral products. Induction of lineage ablation was first accomplished by means of the cell-type-specific expression of a herpes simplex thymidine kinase gene in transgenic mice followed by treatment of animals with acyclovir (Borrelli et al. 1988). In other studies, tumor ablation has been achieved in transgenic mice using antisense inhibition of factors required for viral gene expression (e.g., Kitajima et al. 1992). Further, recombinant retroviruses can be used for cell-lineage studies in embryos (Sanes et al. 1986).
- Mouse models for human viral diseases. Transgenic mice are providing invaluable information on the mechanisms of viral pathogenesis. Thus, for instance, dozens of different transgenic mice carrying hepatitis B virus sequences have been generated which have provided new insights into the disease (see Chisari 1995 for a review). Mice transgenic for human immunodeficiency virus (HIV-1) have been useful in understanding the pathogenesis in the central nervous system which,

in the form of dementia, occurs in some patients suffering from acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), while the virus itself is hardly detectable in the brain (reviewed in Klotman et al. 1995).

Transgenesis is a unique tool for *in vivo* studies on viruses that, challenging the Koch postulates, cannot be propagated *in vitro* or in laboratory animals. For example, the multistep carcinogenesis induced by specific types of human papillomaviruses in the uterine cervix is being addressed in transgenic mice expressing the viral oncogenes (see below). Transgenic mice have also provided important clues into the pathogenesis of the still poorly understood prion diseases (Prusiner 1993; Collinge et al. 1996).

Further the identification of cellular receptors for viruses is opening new avenues in virus research. Thus, for instance, the expression of the cellular receptor for poliovirus in the nervous system of transgenic mice has made it possible to generate an animal model for this disease (Koike et al. 1991).

- Vaccine and gene therapy studies. Although no transgenic mouse that will allow vaccine development has been generated to date, transgenic mice may be useful to test viral vaccine vectors (e.g., Andino et al. 1994) as well as new strategies for antiviral therapy, like the use of antisense oligodeoxynucleotides as inhibitors of viral gene expression (see Güimil Garcia and Eritja, Chap. 5, this Vol.).
- Studies on the regulation of viral gene expression. Transgenic mice can be used to dissect *in vivo* the mechanisms involved in tissue specificity, hormonal regulation, enhancement of expression by physical or chemical agents, and interaction with nuclear proteins essential during early development (e.g., Cid et al. 1993; see also Chap. 20, this Vol.).

In summary, a great variety of strategies involving transgenic mice have been devised during the past few years, and new ones are emerging, which will help improve our understanding of the mechanisms of viral pathogenesis and virus-host interactions in aspects that cannot be addressed *in vitro*. Here, we describe the strategies we have used to develop animal models for the oncogenesis by human papillomaviruses (HPVs), together with detailed descriptions of the protocols.

HPV-Transgenic Mouse Models

HPVs are small nonenveloped DNA viruses (72 capsomers, 55 nm diameter), of the papovaviridae family. Their genome consists of a circular double-stranded DNA molecule of about 8 kb (MW 5×10^6). To date, more than 70 HPV types have been isolated from benign and malignant epithelial neoplasias of the genital mucosae and the skin.

Concerning cervical cancer, which is an important cause of mortality in women worldwide, a large number of epidemiological and clinical studies implicate HPV 16 and 18 in its etiology (see zur Hausen and de Villiers 1994 for a review). HPV 16 and 18 are present in more than 90 % of primary cervical carcinomas, and also in their metastases and in cell lines derived from them, like HeLa cells, which carry multiple copies of the HPV18 DNA stably integrated into their genome. Interestingly, integration of the HPV DNA into the host genome leads to enhanced expression of the early viral genes E6 and E7 from their common upstream regulatory region (URR).

Many different in vitro studies have demonstrated that E6 and E7 are oncogenes (zur Hausen 1991). Although the mechanisms by which the E6 and E7 oncoproteins induce cellular transformation are not fully understood, this appears to be the consequence of E6 binding the tumor suppressor p53, thereby promoting its degradation via a ubiquitin-dependent pathway (Werness et al. 1990, Scheffner et al. 1990), and E7 interacting with pRB (the retinoblastoma susceptibility protein) which loses its capacity to functionally inactivate the cellular transcription factor E2F (Dyson et al. 1989; Chellappan 1992). It is, however, intriguing why the precursor lesions infected by HPVs need long latency periods of years or decades to develop cervical cancers, despite the fact that the E6 and E7 genes are expressed in these lesions. In fact, in vitro experiments have shown that E6 and E7 are able to immortalize human cells, but malignant transformation requires additional expression of other oncogenes, such as v-ras.

The study of these viruses has been complicated by the fact that they do not fulfill the Koch postulates, since they cannot be propagated in vitro. However, transgenic mouse technology has proved useful in providing a system in which these aspects of HPV pathogenesis can be addressed. Recently, we and others have demonstrated the oncogenic potential of the E6 and E7 genes and the expression capability of the HPV URR in transgenic mouse tissues (see Cid et al. 1993; Auewarakul et al. 1994 and references therein). To this end, we pursued a double strategy:

- Test expression from the HPV 16 and 18 promoters in mice harboring fusions of the respective URRs to heterologous reporter genes, namely the bacterial β -galactosidase (lacZ) and the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) genes, both enzymes known to be innocuous for the animals and readily detectable in expressing tissues.
- Target expression of the HPV-16 E6/E7 genes to the epidermis. The E6/E7 open reading frame, which is expressed as a polycistronic mRNA in infected cells, was fused to the cytokeratin 10 (K10) promoter to target its expression to the suprabasal (terminally differentiated) cells of the epidermis, which resemble the natural hosts of these viruses.

Materials

– DNA and RNA work

Materials for plasmid propagation and purification (there is no need for CsCl gradient purification, commercial kits like Qiagen or Gene-clean can be used instead to purify DNA for microinjection experiments), electrophoresis chambers and glass plates for agarose and acrylamide gels, power supply, UV transilluminators (250 and 355 nm) coupled to an adequate photography system (e.g., Polaroid), microwave oven, thermoblock, UV cross-linker, slot blot apparatus, nitrocellulose or nylon membranes

– Tissue and embryo culture, biological safety cabinet, CO₂ incubator, inverted microscope, plastic dishes (3 and 6 cmØ)

– Production and analysis of transgenic mice

Alcohol burner or small bunsen burner

Surgical instruments: fine dissection forceps and scissors, blunt fine forceps, two pairs of watchmaker's no. 5 forceps, serrefine, surgical silk suture (size 5×0), curved surgical needle, wound clips, metal ear tags

Microinjection setup (see Fig. 1.1A, Chap. 1, this Vol.): inverted microscope (Nikon TMS and Diaphot 300/2; Zeiss Axiovert 135), left and right-side Leitz micromanipulators, Eppendorf microinjector (Mod. 5242), micropipette puller, glass capillaries (see Materials in Chap. 1), microforge, holding pipettes

Leitz stereomicroscope

Fiber optic illumination

Equipment

Embryo transfer pipettes, prepared with the burner by pulling Pasteur pipettes at their narrow side at some point 3–4 cm distant from the opening. It is convenient to polish the tips of the transfer pipettes by flaming them briefly.

Small container (1–2 l) for liquid nitrogen, cork sheet, tissue homogenizer (Polytron or similar), cryostat (Reichert-Jung)

Racks for slides, glass beakers, slide jars. Water bath with shaker tray
Glass slides. It is necessary to coat slides with silane or poly-L-lysine to ensure that tissue sections adhere firmly to their surface and do not become detached while performing X-Gal staining or in situ hybridizations. TESPA coating is advisable because it is easy to perform and the treated slides can be stored for several months (see below).

Reagents and solutions

- DNA and RNA work
Injection buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.25 M EDTA
Reagents and solutions for DNA and RNA extraction, purification, restriction enzyme digestions, Southern and Northern blots. Plasmids and reagents for preparation of antisense riboprobes
- Production of transgenic mice (see Hogan et al. 1994)
Hormones for superovulation; hyaluronidase; media for embryo handling and culture (M2 and M16); paraffin liquid (Merck 7161.0500) anesthetics (Ketavet 100 mg/ml, Parke-Davis; Rompun 2 %, Bayer; inject i.p. 0.1 mg of each per g of body weight)
- Tissue handling
Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS): 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄. Adjust pH with HCl to 7.2 (if it is for tissue culture and biopsies) or 7.3–7.4 (for histochemistry and in situ hybridization). Make up to 1 l with deionized water
70 % ethanol, liquid nitrogen, isopentane
Embedding medium: tissue freezing medium, Leica Instruments GmbH, cat. no. 0201 08926; or Tissue Tek, OCT compound, Miles Inc., cat. no. 4583.
TESPA: 3-aminopropyl triethoxy-silane (Sigma A-3648). Store at 4 °C for up to 1 year. **Note:** Discard when it becomes yellow! Working solution: 2 % TESPA (v/v) in 100 % acetone. Prepare immediately before use!
- Slides
Coat glass slides as follows:
 1. Cleaning: wash slides by consecutive immersion for 1–5 min into each of the following solutions:
 - a) 10 % HCl, 70 % ethanol in deionized H₂O

- b) deionized H₂O
- c) 95 % ethanol.

Drain and incubate slides at 80 °C for 15 min. Then let them cool down to room temperature in a dust-free container. Alternatively, slides for in situ hybridization can be treated with DEPC as described below.

2. Coating: immerse slides for 10 s into each:

- a) 2 % TESPA solution (see Reagents and Solutions, below)
- b) 2 × 100 % acetone
- c) 1 × deionized H₂O.

Dry at 37–42 °C (maximum) for 4 h or overnight at room temperature. Keep subbed slides in a clean plastic box until needed. If they remain stored for longer than 3 months, repeat coating before use

– β -Galactosidase histochemistry:

PBS pH 7.3

Fixative: 2 % paraformaldehyde (PFA), 0.2 % glutaraldehyde, 2 mM MgCl₂, in PBS pH 7.3.

Always use freshly prepared fixative. Dissolve 1 g of PFA in 50 ml PBS in a fume hood, with stirring and heating at 60 °C. Add 15 μ l of 10 N NaOH per min until the solution clears. Chill on ice. Add 0.1 ml of MgCl₂ and 0.4 ml of 25 % glutaraldehyde (Merck)

Stock solutions: 50 mM potassium ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆]) and 50 mM potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]), both in PBS pH 7.3. Store at 4 °C protected from the light. They are stable for several months

Wash solution: 0.01 % sodium deoxycholate, 0.02 % NP-40, 2 mM MgCl₂, in PBS pH 7.3

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside; Sigma B-4252). Use glass pipettes. Dissolve to 20 mg/ml in N,N-dimethylformamide and store in a glass container (never polycarbonate or polystyrene) at –20 °C in the dark

X-Gal staining solution: 1 mg/ml X-Gal, 2 mM MgCl₂, 0.01 % sodium deoxycholate, 0.02 % NP-40, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, in PBS pH 7.3 (for long incubations, add Tris pH 7.3 to 50 mM). Can be reused for months if stored at 4 °C protected from light (filter through 0.22 μ m membranes after use)

- Bromodeoxyuridine (BrdU) labeling. Stock solution of BrdU 5 mg/ml in PBS. Anti-BrdU-fluorescein (Boehringer, Mannheim, cat. no. 1202 693)
- In situ hybridization

Diethyl pyrocarbonate (DEPC; Sigma D-5758). DEPC is a strong denaturing agent. It should be handled with care as it is suspected of being a carcinogen. DEPC is inactivated by autoclaving solutions or baking glassware. Handle it in a fume hood and wear gloves. Treat solutions (except those containing Tris, because DEPC reacts with Tris) with 0.1 % DEPC, incubate for at least 1 h at room temperature and then autoclave. Treat glassware with 0.1 % DEPC in water for 1 h, pour water off into a glass bottle for autoclaving, and bake glassware at 220 °C for 2 h

Fixative (prepare fresh): 4 % paraformaldehyde in PBS pH 7.4

20× SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)

Fixogum glue or similar

Proteinase K (Merck 7393.0010, 20 mg/ml)

1 M glycine

Deionized formamide (stored at −20 °C)

Triethanolamine hydrochloride: 0.1 M solution, pH 8

Acetic anhydride

– Hybridization solution:

Stock Solution	Final conc.	For 1 ml
Deionized formamide	50 %	0.5 ml
20× SSC	2×	0.1 ml
Dextran sulfate (MW = 50,000)	10 % (w/v)	0.1 g
1 M Tris.HCl (pH 7.5)	10 mM	10 µl
50× Denhardt's	1×	20 µl
1 % t-RNA	0.5 mg/ml	50 µl
5 mg/ml salmon sperm DNA	100 µg/ml	20 µl
10 % SDS	0.1 %	10 µl
Deionized water	to 1 ml	

Filter through a 0.22-µm membrane.

- FMS solution: 50 % formamide, 20 mM β-mercaptoethanol (β-ME), 2× SSC
- NTE buffer: 0.5 M NaCl, 10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8
- Kodak NTB-2 emulsion, D19 developer
- 30 % sodium thiosulfate or Kodak Agefix
- 0.02 % toluidine blue (Sigma T-3260)
- Giemsa stock solution: 0.85 g Giemsa, 50 % glycerol, 50 % methanol (store at room temperature). Staining solution (prepare just before

- use): 4 ml Giemsa stock solution, 2 ml 0.2 M sodium phosphate pH 6, to 100 ml with dionized water
- Xylene or Histoclear (National Diagnostics)
 - DPX (BDH) or Permount (Fisher Scientific) mounting medium.

Procedures

[**Note:** for detailed descriptions of the molecular biology and transgenic mouse techniques and protocols, the reader should consult Sambrook et al. (1989), Wassarman and DePamphilis (1993), and Hogan et al. (1994)].

26.1

Preparation and Analysis of DNA and RNA for Transgenesis Experiments

The correct design and preparation of the DNA constructs to be micro-injected into embryos is crucial for the success of transgenesis experiments. Whenever possible, it is quite convenient to test such constructs, by transfection into suitable cultured cells, before using them to produce transgenic mice.

Further, appropriate RNA studies should allow quantitative determination of the levels of transgene expression in different tissues and, more importantly, identification of the mRNA species that are transcribed from the transgene. This is of particular importance when transgenes are composed of viral sequences which express polycistronic mRNAs, as is the case of HPVs.

In our studies we have used the following constructs:

- Plasmid pURR18LacZ (Cid et al. 1993), obtained by insertion of the HPV-18 URR (1050 bp) into the SmaI site of a promoterless lacZ expression vector. A similar construct containing the HPV-18 URR in front of the bacterial CAT gene was also used
- Plasmid pK10E6E7 (Auewarakul et al. 1994). This plasmid was obtained by inserting a XhoI-EcoRI fragment of the HPV16 DNA (nucleotides 58 to 867), carrying the E6 and E7 oncogenes, into the plasmid pBKVI (Blessing et al. 1989), which contains the bovine homolog of the human keratin 10 (K10) promoter. An SV40 poly(A)

Design of DNA constructs

sequence follows the 3' end of the E6/E7 fragment. The K10 sequence contains a TATA box but no cap site, which is provided by the E6/E7 sequence.

These constructs were partially sequenced to uncover possible mutations that might have been introduced accidentally during the subcloning procedure. We tested the pURR18lacZ plasmid for expression *in vitro*. However, it was not possible to test the pK10E6E7 plasmid, because the K10 promoter drives expression exclusively in terminally differentiated keratinocytes of the epidermis, which cannot be cultured.

Preparation of DNA samples for microinjection

DNA fragments for transgenic mouse experiments should contain the promoter and gene of interest devoid of bacterial sequences of the vector, because they might interfere with transgene expression (see Hogan et al. 1994). In our experiments, the URR18LacZ and K10E6E7 fragments were excised from the respective plasmids (see Fig. 26.1), separated electrophoretically and purified from agarose gels using glass powder. Finally, they were eluted with injection buffer and diluted to a concentration of 1–2 µg/ml for injection.

DNA isolation

At the age of 3–4 weeks, the mice are labeled with numbered ear tags and small biopsies of their tail tips (0.5–1 cm) taken and introduced into microfuge tubes labeled with the same numbers as the ear tags. This tissue is used for extraction of genomic DNA using a simplified but reliable protocol for genomic DNA extraction from mouse tissues described in detail by Murphy et al. (Chap. 15, Sect. 15.4, this Vol.). The extracted DNA is used to detect the presence of foreign injected sequences by Southern blot analysis. In general, 10–25 % of the offspring carry the transgene (see Hogan et al. 1994). Digestion of the genomic DNA with a restriction enzyme which does not cut within the transgene sequence allows estimate in the blots the number of copies integrated into the genome and assess if it is integrated at more than one site. The use of an enzyme which cuts into the transgene discloses rearrangements of the transgene which may occur during integration into the genome.

RNA isolation

Among the various methods for total RNA isolation from tissues we recommend those using chaotropic agents, because both purity and quantity of the recovered RNA are high. In particular, we recommend the purification of RNA from tissues extracted with guanidinium thiocyanate by centrifugation onto a highly dense solution of CsCl (see Sambrook et al. 1989). Since this method requires ultracentrifugation of

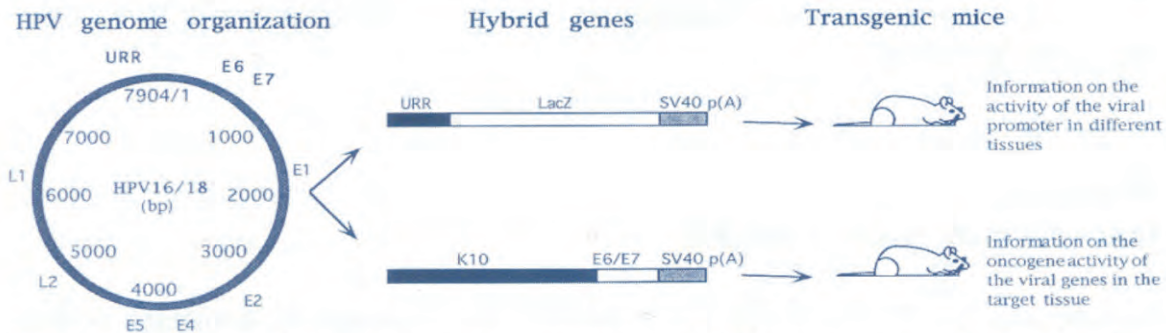


Fig. 26.1. Scheme of the genomic organization of HPV genomes and a double strategy to study HPV expression and tumorigenesis in transgenic mice. *Left* Genomic organization of HPVs. The viral genome consists of a circular double-stranded DNA of approximately 8 kb. It consists of a late region coding for capsid proteins (*L1*, *L2*), and an early region (*E1* to *E7* genes) coding for oncogenic (*E6*, *E7*) and regulatory proteins (*E1*, *E2*). A region of about 1 kb, known as URR, controls early gene expression. It harbors several DNA motifs recognized by cellular and viral factors. *Right* Representation of two different strategies used to generate transgenic mouse models carrying either the HPV URR fused to reporter genes (*LacZ* or *CAT*), or the *E6* and *E7* oncogenes under the control of the *K10* promoter

samples for several hours, it may not be advisable for large numbers of samples. For this purpose, more simple methods should be tried (e.g., see Chomczynski and Sacchi 1987).

26.2

Production of Transgenic Mice

We have used the protocols described by Hogan et al. (1994) for the production of transgenic mice by means of DNA injection into the pronuclei of fertilized eggs. For our experiments, mouse fertilized eggs were obtained from superovulated (C57BL/6×C3H) F_1 females that were mated to (C57BL/6×C3H) F_1 males. Typically, 60–70 % of embryos survived injection and were transferred into the oviducts of pseudopregnant NMRI or CD1 recipient females on day 1 of gravidity. About 10–20 % of the transferred embryos developed normally to terminus, 15–25 % of these carrying one or more copies of the transgene. Permanent lines were established and maintained by crossing the founder animals and their progeny to F_1 nontransgenic hybrids. In about 50 founder mice obtained for 12 different constructs, 1 carried the transgene into the X chromosome and 2 had transgene concatemers integrated in two different sites. In one case, transgene integration occurred in two

different chromosomes, resulting in two different transgenic lines from the same founder.

26.3

Processing of Tissue Samples

Expression or histopathological studies on transgenic animals is performed using whole organs or small samples of different tissues which, in most cases, are taken from mice sacrificed for the purpose. Samples may also be taken from organs of anesthetized mice if it is absolutely necessary to keep them alive for breeding or further examination. The latter, however, requires the assistance of a veterinary surgeon or experienced person.

Tissue sample preparation

Organs and tissues for RNA extractions and biochemical studies should be cut with the help of fine forceps and a scalpel into small pieces of about 0.5 cm^3 , which are introduced separately into cryotubes labeled with the number of the ear tag, the name of the tissue, and the date. The tube is then closed and dropped carefully into liquid nitrogen. Tissue samples for histopathology and immunohistochemistry analysis should be immersed into formalin or PFA-fixative in isopentane, saturated in 30 % sucrose, embedded and frozen liquid nitrogen. Alternatively, the latter step can be performed using unfixed specimens.

1. Sacrifice mouse by cervical dislocation.
2. Soak it in 70 % ethanol.
3. Shave a small area of the skin and take $0.5\text{--}1\text{ cm}^2$ of it for analysis. Skin samples may also be taken from other areas, like the tail or the paw.
4. Open the abdominal cavity: make a small transversal cut in the skin at the midpoint of the abdomen, pull the skin at both sides of the incision firmly in opposite directions (towards head and tail, respectively). Using fine scissors, cut the abdominal wall. The peritoneal cavity with its organs is then exposed.
5. Dissect organs carefully: remove the liver and take a piece of it, take the kidneys, the suprarenal glands, the spleen, the pancreas, the stomach (cut longitudinally along the narrow curvature and wash it in a beaker filled with PBS), pieces of small and large intestine (cut longi-

tudinally and wash in a beaker filled with PBS). In females: take both ovaries, the uterus (one uterine horn cut longitudinally) and the vagina (cut longitudinally).

6. Open the thoracic cavity and dissect the heart (cut in two pieces), the lungs, the thymus and the mediastinum (contains trachea, esophagus and vessels).
7. Dissect the brain. If necessary, cut it to separate away the different parts (cerebellum, optic nerves, tracts, etc.).
8. Dissect the tongue, submaxillary glands, the eyes, a piece of muscle, and a bone (e.g., from the leg).

Immerse tissue samples to be fixed into a 50-ml plastic tube containing 50 ml of fixative (4% paraformaldehyde in PBS, prepare fresh as described above, without MgCl_2 and glutaraldehyde). Let fixation proceed at 4°C for 1–2 h. Then drain the specimens on paper towels and transfer them to a 50-ml tube containing 50 ml of 30% sucrose in PBS. Incubate on ice for 3–4 h or until the specimens sink deeply into the sucrose.

Fixation and sucrose embedding

For each sample proceed as follows: place the specimen on a piece of cork sheet (1.5–2 cm²) that has a square glass coverslip inserted perpendicularly with aid of an scalpel to its upper surface (write on its back side the number of the sample), add embedding medium avoiding bubble formation, and place the specimen conveniently oriented using fine forceps. Then, drop the specimen into isopentane/liquid nitrogen. When all specimens have been frozen, take them from the liquid nitrogen with forceps, remove the glass coverslips, and keep them in a 50-ml plastic tube (labeled with the numbers of the samples) precooled by brief immersion into liquid nitrogen. Store at –80°C.

Deep freezing

The day before cutting, the specimens should be transferred to the –20°C freezer. Transfer specimens to the cryostat chamber (usually set at –20°C). Put a drop of water onto the sample holder and place a specimen on it (the embedded tissue facing up) before the water freezes. Wait 1 min until the specimen is stuck firmly. Cut sections of 5 µm and place them onto coated slides. Dry at room temperature for 1 h or longer. The sections can be stored at –80°C in a box with dessicant for several months.

Cryosections

26.4

β -Galactosidase Histochemistry

The bacterial *lacZ* gene encodes a glycoside hydrolase, β -D-galactosidase (β -Gal) that is innocuous, very stable, and readily detectable in eukaryotic cells. This makes *lacZ* an ideal reporter gene which has been widely used for expression studies in transgenic mice as well as in cultured cells. A simple histochemical assay using the chromogenic substrate X-Gal, which is cleaved by β -Gal to yield blue insoluble indigo, enables quick and sensitive detection of β -Gal in tissue sections and whole organs. The following protocols are based on those described in Sanes et al. (1986), MacGregor et al. (1991), and Hogan et al. (1994). The reagents and solutions needed are described above. Note that PBS should have pH 7.3, which is the pH optimum of the bacterial β -Gal. In contrast, the two main groups of mammalian galactosidases, those located in the brush border of the small intestinal mucosa and those localized in lysosomes, have pH optima in the range of pH 6 and pH 3–4, respectively (see Wallenfels and Weil 1972).

X-Gal staining of cryosections

1. Immediately after dissection, fix tissue samples (pieces of approximately 0.5 cm³, see above) by immersion into 50-ml fixative in a 50-ml plastic tube, at room temperature for 1–2 h or at 4 °C overnight. Keep fixative at 4 °C for step 7.
2. Wash with PBS/2 mM MgCl₂, at 4 °C, 2×5 min.
3. Incubate in 30 % sucrose in PBS/2 mM MgCl₂, at 4 °C for 1–3 h (avoid overnight incubations). The tissues, which initially float in this solution, migrate progressively towards the bottom of the tube as they become saturated with sucrose.
4. Embed specimens and freeze in isopentane/liquid nitrogen. Store blocks at –80 °C.
5. Section frozen organs on a cryotome onto coated slides.
6. Rinse slides in 50–100 ml of wash solution in a slide jar, at 4 °C for 5 min.
7. Refix sections in the same fixative solution used for step 1, at 4 °C for 5 min.
8. Rinse in wash solution at 4 °C for 10 min.

9. Incubate in X-Gal stain solution at 37 °C for 2–24 h in the dark. For incubations longer than 4 h add Tris pH 7.3 to a final concentration of 50 mM.
 10. Wash with PBS / 2 mM Mg₂Cl, 2×5 min.
 11. Rinse in deionized water.
 12. Counterstain and mount as described in Section 26.7. Reduce incubation in alcohols and solvents to a minimum as they may wash out the indigo precipitate.
-
1. Dissection. For best results, large organs should be sliced into smaller pieces according to the region and plane of interest for the experiment to facilitate penetration of fixative and staining solutions. Embryos should be released from extraembryonic membranes. In addition, embryos from 13 days postcoitum to birth should be sliced sagittally in two halves using a razor blade.
 2. Fix in 50 ml fixative (in a 50-ml plastic tube) supplemented with 0.01 % sodium deoxycholate and 0.02 % NP-40 to enhance permeability of tissues. Incubate at 4 °C for 1–2 h.
 3. Remove fixative by aspiration and wash 3× [PBS/2 mM MgCl₂/0.01 % sodium deoxycholate/0.02 % NP-40] at room temperature for 5 min each.
 4. Transfer specimens using fine forceps to a small glass container filled with X-Gal supplemented with 50 mM Tris pH 7.3. Incubate at 30 °C for 4–24 h in the dark.
 5. Remove the staining solution. Wash 2×5 min with PBS/2 mM MgCl₂. Rinse in 3 % DMSO in PBS. Store at 4 °C in PBS.
 6. To determine expression at the cellular level, proceed as follows:
 - a) After step 4, rinse briefly in cold PBS and saturate tissues in 30 % sucrose in PBS/2 mM MgCl₂/0.01 % sodium deoxycholate/0.02 % NP-40, at 4 °C for 1–3 h.
 - b) Embed samples and freeze in isopentane/liquid nitrogen. Section onto coated slides and air-dry for 30–60 min.
 - c) Counterstain and mount (see Sect. 26.7). Minimize incubation in solvents to prevent losses of the blue indigo.

Whole-mount
X-Gal staining of
tissues, organs
and embryos

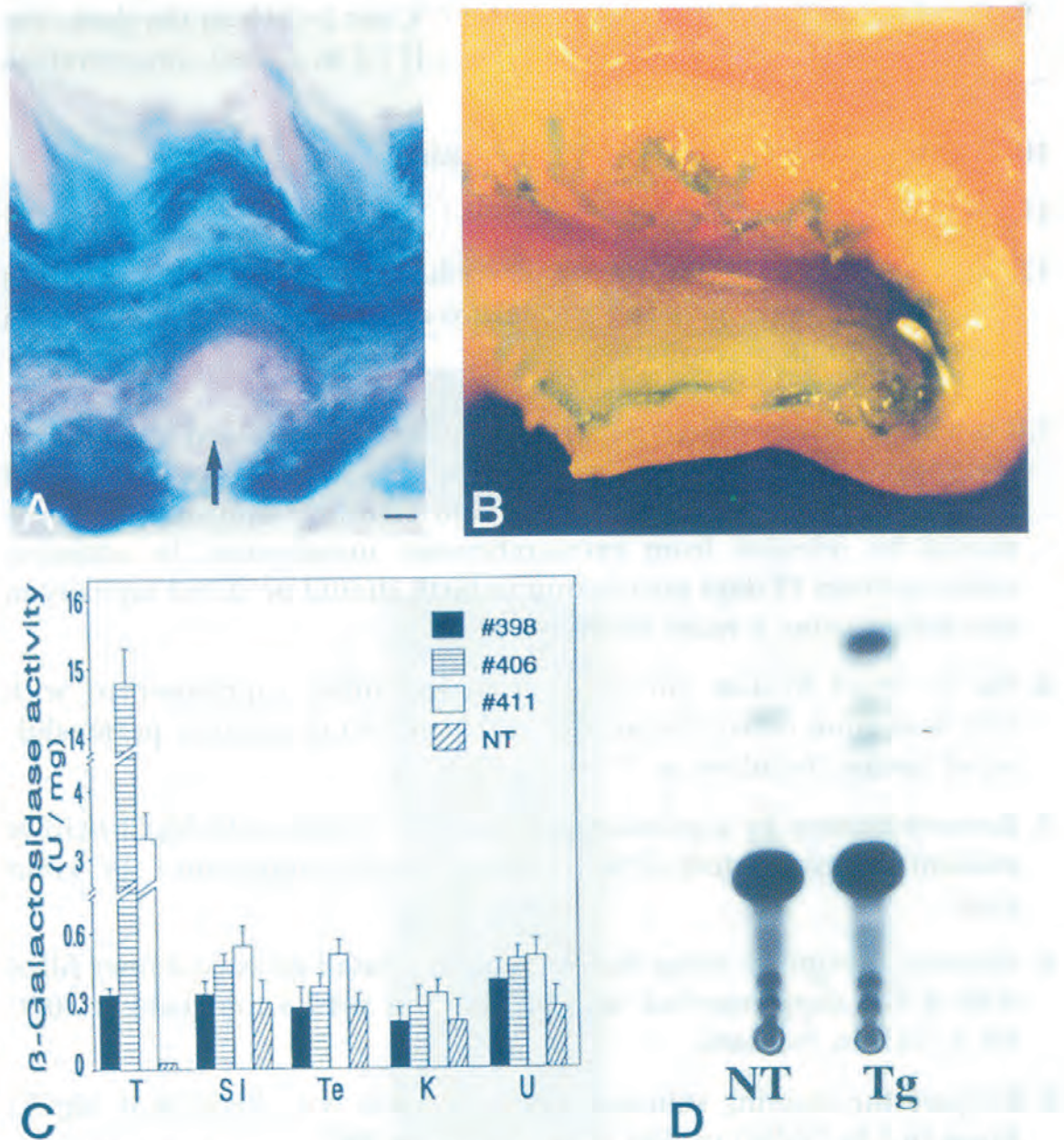


Fig. 26.2A–D. Reporter activities revealed in different tissues of HPV18-URR-[LacZ or CAT] transgenic mice. **A** X-Gal staining of a sagittal section of the tongue of a male transgenic mouse. The activity is observed throughout the epithelium except for the basal layer. The section was counterstained with hematoxylin-eosin. **B** Whole mount X-Gal staining of the vagina and uterus of a transgenic mouse. The β -Gal activity is more intense in the region of the uterine cervix. **C** Quantitation of β -Gal activity in different tissues of transgenic and control mice using the colorimetric method. **D** Detection of CAT activity in crude extracts from the tongues of a transgenic mouse (Tg) and a non-transgenic control (NT). β -Gal and CAT assays were performed as described in Sections 26.5 and 26.8 using equal amounts of protein.

26.5

Quantitation of β -Gal Activity in Tissue Extracts

Reporter β -Gal activity can be quantitated in protein extracts by three different methods (MacGregor et al. 1990; Jain and Magrath 1991):

- Colorimetric assay using o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), a galactoside analog. ONPG is cleaved by β -Gal to yield galactose and the chromophore o-nitrophenol whose concentration can be determined by measuring absorbance at 420 nm with a spectrophotometer. This method has a detection limit of approximately 1 ng of β -Gal (1×10^9 molecules).
- Fluorometric assay using 4-methyl-umbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUG), a non-fluorescent galactoside analog, which is cleaved into galactose and fluorescent methylumbelliferone that can be measured using a fluorometer by excitation at 350 nm and detection of fluorescence emission at 450 nm. This assay is highly sensitive and can detect 1 pg (1×10^6 molecules).
- Chemiluminiscent assay using methoxyspiro-dioxetane-tricyclodecanyl-phenyl- β -D-galactopyranoside (AMPGD). Cleavage of AMPGD by β -Gal yields dioxetane anion that, at pH > 9, undergoes further decomposition to metaoxybenzoate anion which is in an excited state and emits light. The assay can detect up to 2 fg (4×10^3 molecules) of β -Gal.

We mainly have used the ONPG assay because it has proved to be sensitive enough for quantitation of β -Gal activity in tissues of our transgenic mice (Cid et al. 1993).

This procedure can be performed with either fresh or frozen organs. A small piece of each organ or tissue to be analyzed is usually enough to obtain a measurable enzymatic activity.

Preparation of
tissue homoge-
nates

1. Homogenize tissues on ice for 1 or 2 min with Polytron, in 1 ml of PM2 buffer (33 mM NaH_2PO_4 , 66 mM Na_2HPO_4 , 0.1 mM MnCl_2 , 2 mM MgSO_4 , pH 7.3). Just before use, add 2-mercaptoethanol to 40 mM. It is recommendable to use plastic tubes with rounded bottom.
2. Transfer to microfuge tubes and centrifuge at 14 000 g for 10 min. Carefully, remove the upper layer (enriched in lipids) using a Pasteur pipette, or a yellow tip, connected to a vacuum system. Recover the

supernatant and transfer to a new tube avoiding taking the pellet. Repeat the procedure 2× or 3× to completely eliminate every cellular debris.

3. Use 2 to 4 µl of protein extract, to determine protein concentration.

ONPG assay

4. Carry out the reactions in spectrophotometer plastic cuvettes, in a final volume of 1 ml, using 100 to 400 µg of protein and 800 µg of ONPG substrate in PM2 buffer. Immediately after adding ONPG, measure the absorbance (A_{420}) of each sample. Then incubate at 37 °C for 60 min (or longer, depending on the activity), so that values range from 0.2 to 1.5 O.D. Control reactions, including crude extracts from non-transgenic mice and blanks, should be run in parallel.
5. β -Gal activity is calculated for each sample after subtracting the initial value. Use the equation: Units = $(380 \times A_{420})/\text{time (in min)}$; 380 is a constant such that 1 unit is equivalent to the conversion of 1 nanomole of ONPG per min at 37 °C.

26.6

In Vivo Labeling of Proliferating Cells with BrdU

1. Inject a mouse intraperitoneally with 100 µg BrdU/g of body weight (see Materials, above).
2. Sacrifice the mouse 1 h after injection. Dissect and freeze tissue samples quickly in isopentane/liquid nitrogen.
3. Cut 5-µm sections onto slides coated with albumin or gelatine. Let dry at room temperature for 30–60 min. Slides can be stored at –80 °C, preferably in a sealed box with dessicant.
4. Fix sections by immersing the slides in methanol at 4 °C for 5 min. Air-dry.
5. Rehydrate in PBS for 1 min and incubate in 2 M HCl for 1 h at 37 °C to denature DNA. Neutralize in 0.1 M borate buffer pH 8.5 for 10 min, shaking gently.
6. Wash 3× PBS, 5 min each.
7. Incubate with anti-BrdU-fluorescein antibody diluted in 0.1 % (w/v) BSA in PBS to a final concentration of 20 µg/ml, for 1 h at room temperature in the dark.

8. Wash 3× PBS, 5 min each.
9. Mount with Mowiol. Store at 4 °C in the dark.

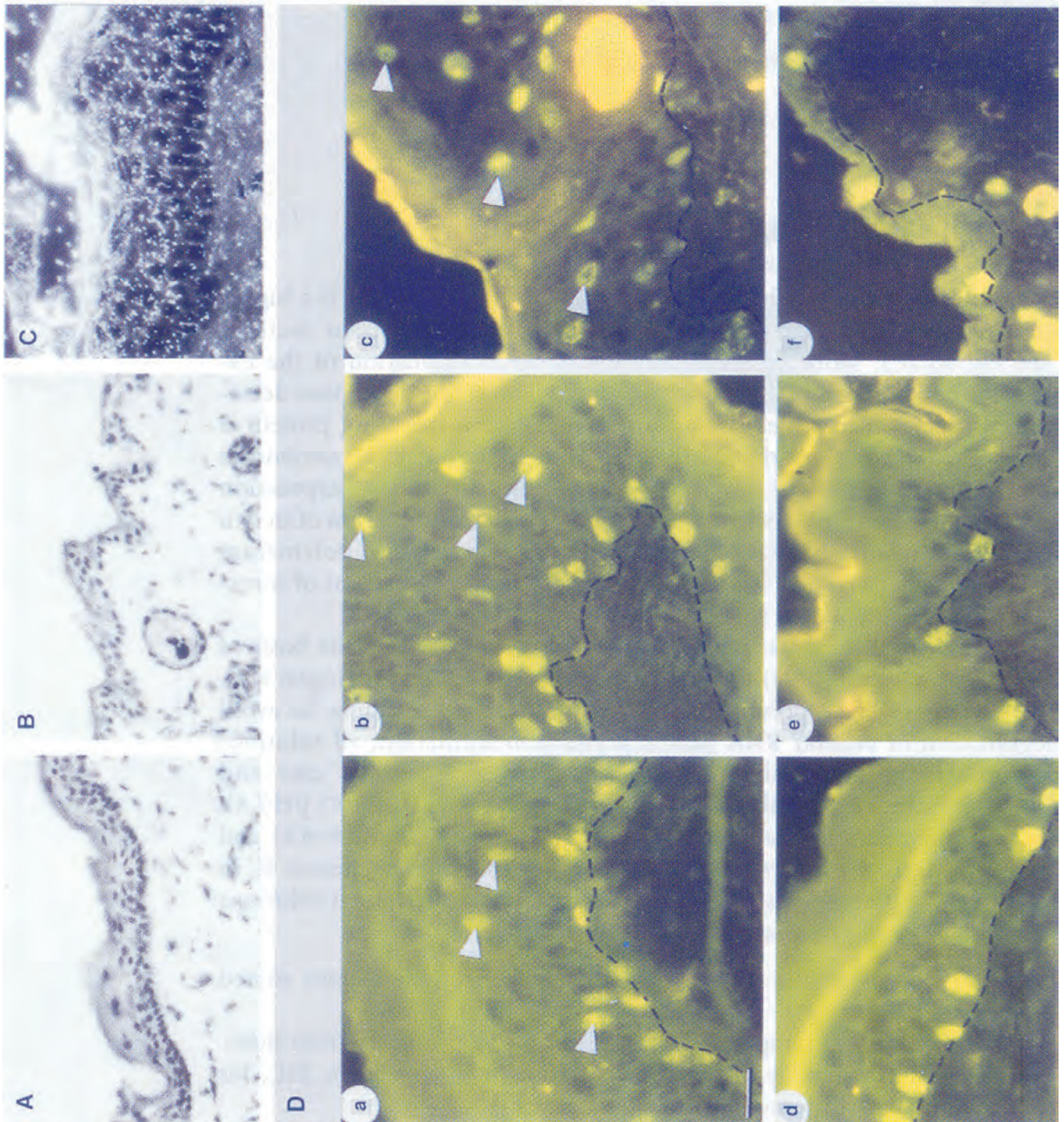
26.7

In Situ RNA-RNA Hybridization

In situ hybridization with radiolabeled antisense RNA probes is a highly sensitive method for detection of specific transcripts in tissue sections (see Fig. 26.3C). Moreover, it allows a precise identification of the expressing cell types within tissues. However, it should be noted that detection of specific RNA does not ensure that the corresponding protein is being expressed properly. Therefore, whenever possible, antibodies specific to such protein should be used preferentially for expression analysis. If antibodies are not available, however, a combination of in situ hybridization and RNase protection or reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays will help determine the pattern of transgene expression and the precise mRNA species transcribed.

We have used the protocol described below, prepared on the basis of Gibson and Pollak (1990), Wilkinson and Nieto (1993) and Hogan et al. (1994), to perform expression analyses in our transgenic mice. To avoid degradation of cellular RNA due to RNase contamination, all solutions equipment and materials should be handled with special care and reserved exclusively for this technique. Autoclave PBS (use PBS pH 7.4), SSC and triethanolamine solutions. Bake glassware (220 °C, 4–6 h) and keep separately those jars used for RNase treatment of specimens. If, in spite of these precautions, RNA degradation is suspected, treat solutions (except Tris) and glassware with DEPC (see Materials).

1. Perform cryosections (5–7 µm thick) and collect them onto coated slides (see Materials).
 - a) Let dry at room temperature for at least 1–2 h protected from dust.
 - b) Fix tissue in freshly prepared 4 % paraformaldehyde, 2× SSC, for 15 min at room temperature.
2. Dehydration.
 - a) Immerse slides into ice-cold 70 % ethanol for 15 min.
 - b) Transfer to 100 % ethanol at room temperature for 2 min, air-dry.
 - c) Fence each section with a ring of Fixogum (or similar) glue. Dry in a fume hood for 30–60 min.



- ◀ **Fig. 26.3A–D.** Phenotype of the K10-E6/E7 transgenic mice. **A** and **B** Histological appearance of the skin of a nontransgenic control (**B**), and a K10-E6/E7 transgenic littermate (**A**) showing hyperthickening of the epidermis and an increased number of basal cells. **C** In situ hybridization of the epidermis of a K10-E6/E7 transgenic mouse with an antisense mRNA probe against the entire E6/E7 region; the E76/E7 mRNA expression is restricted to the suprabasal layers of the epidermis. No signal was seen, using the same probe, in a non-transgenic control (not shown). **D** Representative BrdU staining of proliferating cells in the epidermis of K10-E6/E7 transgenic mice (a,b,c) and nontransgenic controls (d,e,f) from plantar skin (a,d), forestomach (b,e) and ventral skin (c,f)

3. Proteinase K treatment.

- a) Prepare 20 ml of proteinase K solution: 2 ml of 20× SSC, 0.2 ml 10 % SDS, 1 µl of 10 mg/ml proteinase K, 18.8 ml H₂O.
- b) Pipette 1–2 drops of this solution onto each section and incubate for 10 min at 37 °C.
- c) Inactivate proteinase K: wash sections in 0.1 M glycine, 2× SSC (for 200 ml: 20 ml 1 M glycine, 20 ml 20× SSC, 160 ml H₂O).

4. Repeat fixation.

- a) Immerse slides in 4 % paraformaldehyde, 2× SSC, 5 mM MgCl₂, for 5–10 min at room temperature.
- b) Transfer to 50 % formamide, 2× SSC for 5–15 min.

5. Acetylation. This step is intended to block amino groups, thus preventing unspecific binding of probe to tissue.

- a) Prepare 0.1 M triethanolamine (TEA), 2× SSC (e.g., 2.25 g TEA in 150 ml of 2× SSC).
- b) Immerse slides into a glass beaker containing 150 ml of 0.1 M TEA/ 2× SSC supplemented with 375 µl of acetic anhydride, incubate at room temperature for 5 min. (**Note:** Add anhydride just before immersing the slides).
- c) Add fresh acetic anhydride (375 µl), mix by shaking gently, and repeat incubation.

6. Wash in 50 % formamide, 2× SSC at room temperature for 5–15 min. Drain slides by vigorous shaking.

7. Prehybridization.

Add 20 µl of prewarmed (42 °C) hybridization solution (see Materials) to each section, incubate for 1–3 h at 42 °C in a humid chamber.

8. Hybridization.

- a) Add $1-2 \times 10^6$ cpm of radiolabeled antisense riboprobe in a volume of 5 μ l (final volume of radioactive hybridization solution per section = 25 μ l). Mix by pipetting up and down a few times.
- b) Add a comparable amount of radioactive sense probe to another specimen which serves as control for nonspecific hybridization.
- c) Incubate overnight at 42 °C in the humid chamber.

Notes: Prepare a specific antisense riboprobe, ideally of about 0.1–0.5 kb, from a cDNA cloned into a suitable plasmid such as Bluescript or Gemini using an in vitro transcription kit commercially available. These vectors contain two promoters flanking the cDNA sequence, which allow synthesis of the antisense and sense probes from the same clone. Prior to using a riboprobe for in situ hybridization, it is advisable to test its specificity in Northern blots because, in some cases, the antisense probe hybridizes unspecifically to unknown RNA species, very often to the abundant ribosomal RNAs.

9. Washes.

- a) Place slides into a container filled with 100 ml of 5 $\times$ SSC, 20 mM β -ME prewarmed at 60–65 °C. Incubate at 60–65 °C for 15 min.
- b) Transfer slides to a new (smaller) container with 50 ml of FSM solution (see Materials) prewarmed at 60–65 °C. Incubate in a water bath at 60–65 °C for 30 min, shaking slowly.
- c) Transfer container to a 37 °C water bath and shake for 2–4 h.
- d) Wash slides 3 $\times$ 100 ml NTE buffer, at 37 °C, 5 min each.

10. RNase treatment.

- a) Incubate slides in NTE with 20 μ g/ml RNase A at 37 °C for 15 min.
- b) Wash with 100 ml NTE, at 37 °C for 15 min.
- c) Wash with FSM, at 65 °C for 15 min.
- d) Wash with 2 $\times$ SSC, at room temperature for 15 min.
- e) Wash with 0.1 $\times$ SSC, at room temperature for 15 min.

11. Dehydration.

- a) Immerse slides for 2 min into each solution of the following ethanol series: 30, 50, 70 % ethanol/0.25 M ammonium acetate/PBS, 80, 90, 95, 100 % ethanol.
- b) Air-dry.

12. Autoradiography. Perform the following steps in a dark room, avoiding any leaks and control lights (water bath, etc.). Set water bath at 42–45 °C.

- a) Melt Kodak NTB-2 emulsion in water bath (30–45 min). Dilute emulsion 1:1 in prewarmed 2 % glycerol in deionized water. Aliquot 10 ml in slide dippers, let solidify, and keep in a black box or plastic bag at 4 °C.
 - b) Melt an aliquot in the water bath and dip a test (clean) slide. Check in the light that covering is smooth and that there are no bubbles.
 - c) Dip slides containing the specimens, one by one, into the emulsion, hold vertically to allow excess film to drop back, place them vertically on bench paper and let dry for 2 h.
 - d) Transfer to a plastic slide box, introduce a small bag with desiccant, tape the seal, and keep box in a black plastic bag at 4 °C for 1–3 weeks.
 - e) Just before developing, set water bath in the dark room to 15 °C and prepare the solutions required (see below). All solutions should be at this temperature. Leave slides warm at room temperature for 5–10 min. Develop slides in racks by incubation in staining jars as follows:
 - Kodak D19 developer (20 g/500 ml), 2–4 min
 - 1 % acetic acid, 1 min
 - 30 % sodium thiosulfate or Kodak Agefix fixative, 5 min
 - Tap water, at room temperature, 3 × 5 min
13. Counterstaining. Any of the following dyes can be used to stain cells in the hybridized tissues:
- Hematoxylin/eosin. Although rather more complicated to perform, this is the stain that gives best results. Consult manufacturer's instructions or a histology department.
 - Toluidin blue. Stain in 0.02 % toluidin blue at room temperature for 1 min. Dehydrate by passing slides quickly through 30, 70, 90, and 100 % ethanol. Immerse in xylene or Histoclear 2 × 5 min. Mount.
 - Giemsa. Transfer slides to Giemsa staining solution in a glass container for 20 min at room temperature. Wash out the staining solution with tap water. (**Note:** Do not remove slides from the staining solution during staining and do not use deionized water for washing). Drain slides and let dry vertically. Mount.
 - Orange G. Incubate slides for 30 s in Orange G staining solution. Wash 3 × 5 min in deionized water. Dehydrate through 50, 70, and 100 % methanol (1–2 min each). Immerse in xylene or Histoclear 2 × 5 min. Mount.

14. Mounting. Use DPX or Permount mounting medium.
15. View slides in dark field (silver grains appear intense white) and bright field (silver grains appear black on the stained tissue).

26.8

Detection of CAT Activity in Tissue Extracts

Transgenic mice carrying the CAT reporter gene can be used to determine the transcriptional activity of a promoter in different organs.

1. Prepare crude homogenates from fresh or frozen tissues as described in Section 26.5.
2. Incubate the homogenates at 65 °C for 10 min. This step is introduced to inactivate endogenous deacetylases, abundant in some tissue extracts, which may interfere with the CAT assay (see Sleight 1986; Crabb and Dixon 1987).
3. Centrifuge at 14,000 g in a microfuge, at 4 °C for 5 min, to eliminate debris and aggregated proteins.
4. Measure protein concentration in the extracts.
5. Use 400 µg of protein to perform a typical CAT assay as described in Chapter 1, this Volume (Sect. 1.2, steps 6 to 15).

Results

Following the strategy described in Introduction we have established two types of HPV transgenic mouse models:

- Transgenic Mice Expressing Reporter Genes from the HPV-16 and HPV-18 URRs

As revealed by X-Gal staining, in these mice the HPV URR is transcriptionally active in epithelial cells of different tissues, most importantly the stratified epithelia of tongue and vagina (Fig. 26.2A,B). In contrast, no expression was observed in the epidermis. In addition, some reporter activity could be detected also in certain epithelial cells of the small intestine, uterus, ovary and testis. Such pattern of expression was observed with either HPV-16 or HPV-18 URRs. However, quantitation

of β -Gal activity in protein extracts from these tissues, using ONPG as substrate, shows that the HPV-18 promoter drives about five-fold more expression than that of HPV-16, a difference that is also observed at the RNA level (P. Auewarakul, L. Gissmann, A. Cid-Arregui, unpubl. results). In addition, β -Gal quantitation shows that the stratified epithelium of the tongue supports the highest level of expression of the URR promoter (Fig. 26.2C). Similar results are obtained if the CAT gene is used as reporter (Fig. 26.2D).

Interestingly, the promoter activity of the HPV URR in the genital tract of transgenic females exhibits a clear dependence on the hormonal variations accompanying the estrus cycle, with a strong activity in estrus (Fig. 26.2B), when circulating levels of progesterone reach a maximum, and nondetectable reporter expression at diestrus. Indeed, experiments treating transgenic animals with antiprogesterone drugs suggest that this hormone governs the activity of the viral promoter (N. Morales-Peza, A. Garcia-Carranca, A. Cid-Arregui, unpubl. results). These observations suggest that antiprogesterone drugs may be helpful in the treatment of cervical cancers.

- Transgenic Mice Expressing the E6 and E7 Oncoproteins in the Epidermis

Expression from a keratin 10 (K10) promoter of the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 in the suprabasal cells of the mouse epidermis induces hyperplasia, hyperkeratosis and parakeratosis in this tissue, affecting the different types of skin (from body, tail, ears, plantar) and also the fore-stomach, which are all known to be sites of K10 expression (Fig. 26.3A,B). Hyperthickening of the epidermis is seen in newborn as well as in adult animals. The expression of E6 and E7 in these tissues was verified by Northern blots and in situ hybridizations (Fig. 26.3C). In addition, the presence of proper transcripts was confirmed by PCR analysis.

In vivo labeling of proliferating cells with BrdU shows that the epidermal hyperplasia in the K10-E6/E7 transgenic mice is due to two distinct effects (Fig. 26.3D):

- The presence of an increased number of proliferating cells in the basal layer (two to three fold increase relative to nontransgenic controls), and
- The presence of BrdU-labeled cells in the suprabasal layers (about 10–15 % of total proliferating cells) which express the K10 keratin, indicating that these are indeed differentiated cells with proliferating capacity.

In contrast, none of the proliferating cells in the basal layer contains K10. Suprabasal proliferation is an abnormal phenomenon which is never observed in naturally occurring epidermal hyperplasia, nor it is induced by topical TPA treatment during experimental tumor promotion. Therefore, the presence of suprabasal differentiating cells retaining the proliferating capacity normally restricted to the basal cells seems to be a specific effect of the E6/E7 transgene.

An interesting finding was that TGF- α is overexpressed in the suprabasal cells of the epidermis of E6/E7 transgenic mice, thus suggesting that autocrine mechanisms may be involved in the maintenance of the epidermal hyperplasia. In addition, c-myc expression in the transgenic skin is strongly increased in the hyperproliferative tissues. It is not yet clear, however, if c-myc mediates the effects of the viral proteins in inducing proliferation in the suprabasal cells.

Finally, old animals develop a limited number of benign skin papillomas in areas of mechanical abrasion, like the ear tag attachment site, suggesting that the E6/E7 transgene provides a genetic predisposition to neoplasia. However, as in human lesions caused by these viruses, additional secondary events are necessary for progression from hyperplasia to papilloma formation. Therefore, these mice constitute a useful system for the study of the mechanisms and factors involved in the neoplastic transformation induced by the E6 and E7 oncoproteins.

Acknowledgments. We are grateful to Prof. H. zur Hausen for constant support and advice and Prof. L. Gissmann for helpful discussions and support. This work was supported by grants of the Mexican/German Joint Research Program, CONACYT, and Miguel Aleman Foundation.

References

- Adams JM, Cory, S (1991) Transgenic models of tumor development. *Science* 254:1161–1167
- Aichele P, Kyburz D, Ohashi PS, Odermatt B, Zinkernagel RM, Hengartner H, Pircher H (1994) Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:444–448
- Andino R, Silvera-D Suggett SD, Achacoso PL, Miller CJ, Baltimore D, Feinberg MB (1994) Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science* 265:1448–1451
- Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, Van-Kaer L, Pircher HP, Zinkernagel RM, Tonegawa S (1994) Evidence for a differential avidity model of T-cell selection in the thymus. *Cell* 76:651–663

- Auewarakul P, Gissmann L, Cid-Arregui A (1994) Targeted expression of the E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 16 in the epidermis of transgenic mice elicits generalized epidermal hyperplasia involving autocrine factors. *Mol Cell Biol* 14:8250–8258
- Berns A (1991) Tumorigenesis in transgenic mice: identification and characterization of synergizing oncogenes. *J Cell Biochem* 47:130–135
- Blessing M, Jorcano JL, Franke WW (1989) Enhancer elements directing cell-type-specific expression of cytokeratin genes and changes of the epithelial cytoskeleton by transfection of hybrid cytokeratin genes. *Embo J* 8:117–126
- Borrelli E, Heyman R, Hsi M, Evans RM (1988) Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7572–7576
- Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Münger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR (1992) Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci* 89:4549–4553
- Chisari FV (1995) Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* 22:1316–1325
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- Cid A, Auewarakul P, García-Carrancá A, Ovseiovich R, Gaissert H, Gissmann L (1993) Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol* 67:6742–6752
- Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383:685–690
- Crabb DW, Dixon JE (1987) A method for increasing the sensitivity of chloramphenicol acetyltransferase assays in extracts of transfected cultured cells. *Anal Biochem* 163:88–92
- Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E (1989) The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. *Science* 243:811–814
- Gibson SJ, Pollak JM (1990) Principle and applications of complementary RNA probes, p84–91. In: Pollak JM, McGee JOD (ed) *In situ hybridization, principles and practice*. Oxford University Press, Oxford
- Griep AE, Herber R, Jeon S, Lohse JK, Dubielzig RR, Lambert PF (1993) Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J Virol* 67:1373–1384
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E (1994) *Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Jain VK, Magrath IT (1991) A chemiluminiscent assay for quantitation of β -galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of β -galactosidase in lacZ transfected cells. *Anal Biochem* 199:119–124
- Kitajima I, Shinohara T, Bilakovics J, Brown DA, Xu X, Nerenberg M (1992) Ablation of transplanted HTLV-I Tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF-kappa B. *Science* 258:1792–1795
- Klotman PE, Rappaport J, Ray P, Kopp JB, Franks R, Bruggeman LA, Notkins AL (1995) Transgenic models of HIV-1. *AIDS* 9:313–324
- Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, Nomoto A (1991) Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:951–955

- MacGregor GR, Nolan GP, Fiering S, Roederer M, Herzenberg LA (1991) Use of *E coli lacZ* (β -galactosidase) as a reporter gene. In: Murray EJ (ed) *Methods in molecular biology*, vol. 7, p 217–135. Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey
- Merlino G (1994) Transgenic mice as models for tumorigenesis. *Cancer Invest* 12:203–213
- Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H (1991) Ablation of “tolerance” and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65:305–317
- Oldstone MB, Southern PJ (1993) Trafficking of activated cytotoxic T lymphocytes into the central nervous system: use of a transgenic model. *J Neuroimmunol* 46:25–31.
- Prusiner SB (1993) Transgenic investigations of prion diseases of humans and animals. In: Flavell RB, Heap RB (eds) *Transgenic modification of germline and somatic cells*. Chapman and Hall, London, pp 101–116
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanes JR, Rubenstein JLR, Nicolas JF (1986) Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J* 5:3133–3142
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley P (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129–1136
- Sleigh MJ (1986) A nonchromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene in eucaryotic cells. *Anal Biochem* 156:251–256
- van Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, Wientjens E, van der Gulden H, Berns A (1991) Identification of cooperating oncogenes in E μ -myc transgenic mice by provirus tagging *Cell* 65:737–752
- Wallenfels K, Weil R (1972) β -Galactosidase. In Boyer P D (ed), *The enzymes*, vol 7, p 617–663. Academic Press, New York
- Wassarman PM, DePamphilis ML (1993) *Guide to techniques in mouse development. Methods in Enzymology*, vol. 225. Academic Press, New York
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76–79
- Wilkinson DG, Nieto MA (1993) Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* 225: 361–373
- zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science* 254:1167–1173
- zur Hausen H, de Villiers EM (1994) Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 48:427–447

第二十六章 转基因小鼠策略在病毒研究中的应用

ANGEL CID-ARREGUI^{1*}, NESTOR MORALES-PEZA²,
PRASERT AUEWARAKUL³, MARIA JOSE GARCÍA-IGLESIAS⁴,
MARIA VICTORIA JUAREZ⁵, GINA DÍAZ²,
AND ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA²

引言

在小鼠胚胎上利用病毒和病毒基因进行感染和微注射实验,对转基因技术的发展做出了很大的贡献。同样,这些技术对于深入了解病毒研究的基本方面也十分有用,特别是与病毒的致病作用和病毒-宿主间的相互作用有关的方面。的确,在过去的十年间,已报道了大量的有关携带病毒序列的转基因小鼠的研究(在 Medline 数据库,通过“转基因鼠”和“病毒”条目可以检索出近 900 篇记录)。下面是关于利用转基因小鼠进行病毒研究的主要内容,并包括一些参考文献。

- 有关病毒蛋白致癌活性的研究(Adams & Cory 1991; Merlino 1994)。所谓的肿瘤病毒(zur Hausen 1991)的癌基因已经在来自于同源或异源病毒调控区的小鼠组织中得到表达,或借助于真核启动子而得到表达。在后一种情况下,最好选用能在特定组织中选择性表达的基因启动子,例如, α -A 晶体蛋白启动子和角蛋白 10 的启动子,已分别被用来对眼的晶体和皮肤的转基因表达进行定位(Griep et al. 1993; Auewarakul et al. 1994)。有些情况下,将两种或更多的病毒癌基因导入转基因鼠中,以研究癌基因的协同作用(van Lohuizen et al. 1991; Berns 1991),其方法与以前进行体外研究的方法相同。此外,将含有组织特异性启动子的转基因与病毒癌基因融合(绝大多数都是 SV40 大 T 抗原),用于评价有关肿瘤生成、凋亡和细胞周期控制的许多方面。最近报道,通过 SV40 大 T 抗原的表达,雄性生殖细胞能够在体外进行反式减数分裂(transmeiotic)分化(参见 Rassoulzadegan 所著的本书的第十二章等)。
- 利用病毒基因进行免疫学研究。大量研究采用了病毒蛋白质在转基因小鼠体内表达的方法来评价免疫学不同方面的问题,例如抗原呈递、自身抗体的产生、肽诱导的耐受性、耐受性的去除、T 细胞选择、T 细胞运输到中枢神经系统等(Ohashi et al. 1991; Oldstone

* corresponding author: phone: +49-6221-548321; fax: +49-6221-548301; e-mail: cid@urz.uni-heidelberg.de

¹ Dept. of Neurobiology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer feld 364, D-69120 Heidelberg, Germany

² Dept. of Molecular Biology, Institute for Biomedical Research, 04510 Mexico City, Mexico

³ Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Mahidol University, 10700 Bangkok, Thailand

⁴ Dept. of Animal Pathology: Animal Medicine. Faculty of Veterinary Science, University of Leon, 24071-Leon, Spain

⁵ European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, Germany

APÉNDICE 2

–El hombre que no busca su destino, no está preparado para enfrentarlo cuando lo encuentra”.
Bruce Wayne

PROTOCOLS FOR THE MANUAL AND AUTOMATIC MICROINJECTION OF SOMATIC CELLS IN CULTURE AND FOR THE ANALYSIS OF MICROINJECTED CELLS

Cid-Arregui, A., Santana, C., Guido, M., Morales-Peza, N.,
Juarez, M. V., Wepf, R., and Garcia-Carranca, A.

En Microinjection and transgenesis: strategies and protocols, Springer Lab Manual

Protocols for the Manual and Automatic Microinjection of Somatic Cells in Culture and for the Analysis of Microinjected Cells

ANGEL CID-ARREGUI^{1*}, CARLA SANTANA², MIRIAM GUIDO²,
NESTOR MORALES-PEZA², MARIA VICTORIA JUAREZ³, ROGER WEPF³,
AND ALEJANDRO GARCIA-CARRANCA²

Introduction

Micromanipulation of living cells was first used in electrophysiology studies during the first half of this century. Reliable techniques for intracellular recording were developed in the late 1940s. Less than one decade later, similar techniques were applied to perform direct transfer of biological material into cells (see Chambers and Chambers 1961). Initially, microinjection was designed for transplantation of mammalian nuclei (Graessmann 1970) and chromosomes (Diacumakos 1973) into recipient cells in culture. Further refinement of materials and instruments, however, permitted intracellular transfer of solutions containing macromolecules of various origins, such as viral RNA (Graessmann and Graessmann 1976; Stacey et al. 1977), purified proteins (Mabuchi and Okuno 1977; Tjian et al. 1978), and viral DNA (Anderson et al. 1980; Capecchi 1980). Likewise, microinjection was used for DNA transfer into fertilized eggs and a cloned gene was soon reported to be expressed in mouse somatic tissues (Gordon et al. 1980). Later, recombinant genes were stably introduced into the mouse germ line (Brinster et al. 1981; Wagner et al. 1981). Since then, microinjection has been used routinely to generate transgenic animals, and applied to a wide variety of studies using living cells, such as gene expression, signal transduction, or cytoskeleton studies.

* corresponding author: phone: +49-6221-548 321, fax: +49-6221-548 301, e-mail: angel.cid-arregui@urz.uni-heidelberg.de

¹ Dept. of Neurobiology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, D-69120-Heidelberg, Germany

² Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510, Mexico City, Mexico

³ European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69012 Heidelberg, Germany

Microinjection allows direct access to the two main intracellular compartments, the nucleus and the cytoplasm. Thus, this technique makes possible single cell experiments in which one or both intracellular milieu can be precisely modified. Moreover, the injected cells can be treated conveniently with appropriate changes in the composition of the culture medium. Table 1.1 summarizes all variables of a microinjection experiment with some illustrative examples. As indicated, a great variety of strategies can be devised by unique combinations of the different variables injection product, target compartment (cytoplasmic, nuclear or both), single or multiple injections, specific cell treatments (before or after microinjection), and the different analytical techniques.

Proper design of microinjection experiments requires careful consideration of the advantages and limitations of this technique. The following are some major advantages of microinjection:

- It can be applied to a wide variety of cell types from either established cell lines or primary cultures. Studies using the latter may benefit especially from microinjection because such cells are usually difficult to grow and very sensitive to changes in the culture medium. They survive in culture for a few days or weeks (e.g., neurons) or a few passages (e.g., fibroblasts, keratinocytes). Therefore, microinjection may be a unique method for DNA transfer experiments with these cells.
- A small amount of injection sample is required, eliminating the need for large-scale preparation and purification of injection products, such as DNA, antibodies, or recombinant proteins, which are often expensive and time-consuming to obtain.
- A great variety of synthetic and biological products can be injected into cells, from small oligonucleotides to yeast artificial chromosomes (YACs), and from peptides to purified organelles.
- The volume of sample injected into each cell, and hence the number of molecules of the injection product, can be estimated.
- Two or more different products can be injected, simultaneously or consecutively, into the same cell. In fact, injected cells can be retrieved and injected a second time with the same or a different sample.
- Microinjection can be combined with previous, simultaneous, and/or subsequent treatments of cells to help provide optimal conditions for the experiment.

- In combination with sensitive analytical techniques, such as immunofluorescence, in situ hybridization, or PCR, the effect of the injected product can be evaluated at the single-cell level.
- Speed of results. For most purposes, injected cells can be analyzed shortly after injection.

Microinjection has also some limitations:

- It requires special equipment and some expertise.
- It demands manipulation of cells one by one. Therefore, only a limited number of cells (up to a few hundred) can be studied at a time.
- Microinjection causes some degree of damage to the cell when the tip of the microneedle penetrates through the plasma membrane and the nuclear envelope. This is due to the mechanical force it exerts, but also to the fluid released from its opening, which increases the intracellular pressure and, depending on the nature of the sample being injected, may cause focal changes in ionic strength, osmolarity and pH. These effects may be more obvious on the cytoskeleton but can also reach some intracellular compartments, thus complicating the interpretation of the result.

All these aspects have to be considered carefully when planning microinjection experiments to ensure that the appropriate strategy is chosen. Thus, for instance, microinjection is not normally used for DNA transfer because it is laborious and time-consuming, as compared to the calcium precipitate, electroporation or lipofection methods. However, for some experiments (e.g., using cells from primary explants, or YAC vectors) the advantages of microinjection make it the method of choice for DNA transfer.

This chapter describes the equipment and methods to perform manual and automatic microinjection into cultured cells. In addition, working protocols for the analysis of cells microinjected with common reporter plasmids are given.

Materials

The simplest microinjection setup consists of an inverted microscope, a micromanipulator, and a puller with which to prepare suitable micropipettes (see Fig. 1.1). For best results, the use of an accurate pressuring

**Microinjection
equipment**

Table 1.1. Parts of a microinjection experiment with examples of different experimental approaches

Intranuclear/ Intracytoplasmic Microinjection	Intracellular processing	Effects of the injected compound(s)	Analysis of the microinjected cells
• DNA: cellular, viral, plasmids, YACs • RNA: cellular, viral <i>in vitro</i> transcribed • Antisense: RNA, oligonucleotides • Ribozyme: synthetic, <i>in vitro</i> transcribed • Antibodies: unlabeled, conjugated • Proteins: cellular, recombinant • Purified organelles: Nuclei, vesicles • Other natural or synthetic products • Mixtures of compounds	• Transcription • Translation • Annealing • Binding • Modification (Phosphorylation, etc.) • Transport • Degradation, etc.	• Interference with cellular functions: Cell cycle arrest • Block of intracellular signaling pathways • Block of intracellular membrane traffic etc. • Involvement in cellular functions: Regulation of gene expression • Signal transduction • Cytoskeleton assembly etc.	• Observation of phenotype: changes in cell morphology, growth arrest, apoptosis, multinucleation, cell fusion, etc. • Biochemical analyses: CAT assay, spectrophotometric measurements of enzyme activities • Immunofluorescence, immunohistochemistry • <i>In situ</i> hybridization • Immunoelectron microscopy • Molecular biology analyses: Southern and Northern blots, RNase protection, PCR etc.
• Additional cell treatment: ³⁵S-Methionine (for metabolic labeling), BrdU (labeling of newly synthesized DNA), FITC-transferrin (marker for receptor-mediated endocytosis), horse radish peroxidase (marker for fluid phase endocytosis), actinomycin D (blocks RNA synthesis), cycloheximide (blocks protein synthesis), brefeldin A (blocks ER to Golgi vesicle traffic), nocodazole (depolymerizes microtubules), G-418 (for selection of neomycin resistance), etc.			

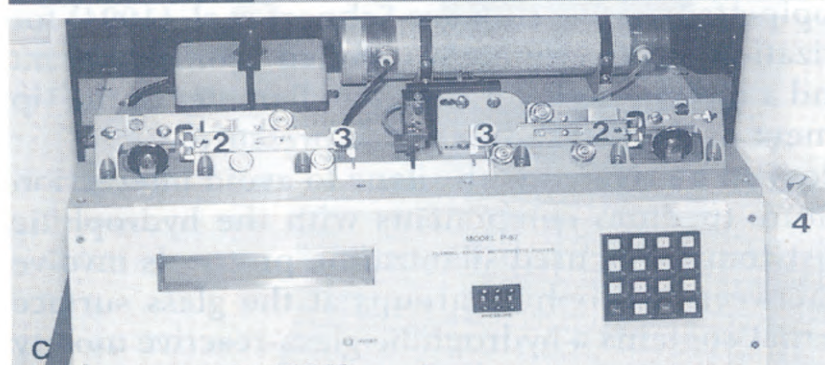
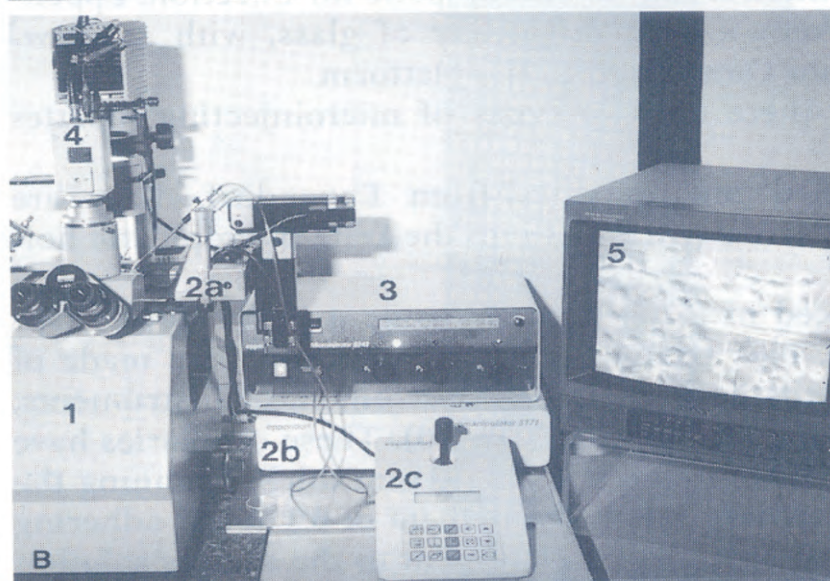
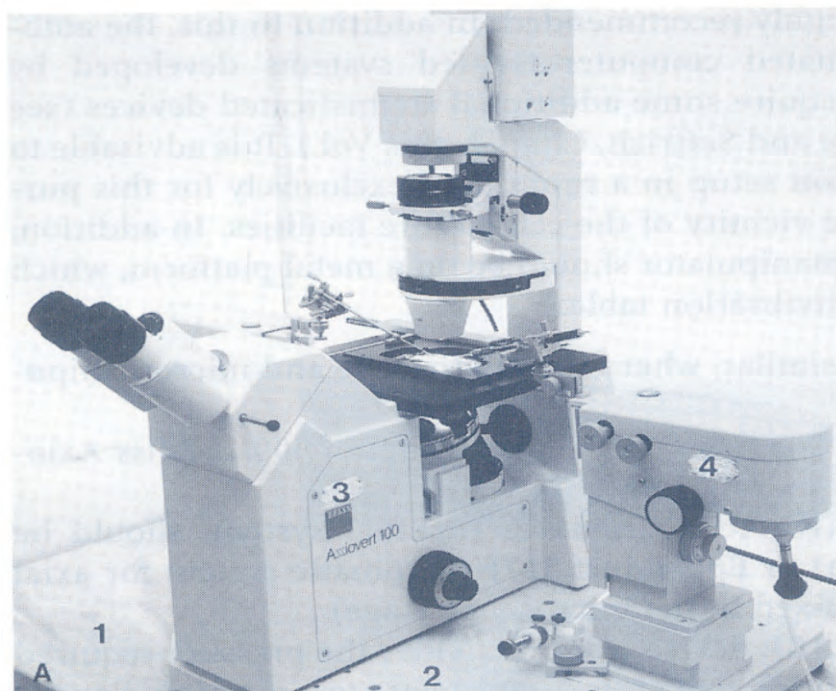
device (see below) is highly recommended. In addition to this, the automated and the automated computer-assisted systems developed by Eppendorf and Zeiss require some additional sophisticated devices (see below; see also Ansorge and Saffrich, Chap. 2, this Vol.). It is advisable to install the microinjection setup in a room used exclusively for this purpose and located in the vicinity of the cell culture facilities. In addition, microscope and micromanipulator should be on a metal platform, which is placed onto an antivibration table.

- Leitz heavy base, or similar, where the microscope and micromanipulators are mounted
- Inverted microscope: e.g., Nikon TMS and Diaphot 300/2; Zeiss Axiovert 100 or 135, or Axioskop FS (Fig. 1.1-A)
- Micromanipulators (Fig. 1.1A, B): Leitz (manual system, should be fixed to the platform) or Eppendorf 5171 (automatic system for axial microinjection, it is fixed to the microscope stage)
- Microinjector (Fig. 1.1B): device which provides the pressure required to release sample solution from the micropipette for injection. Eppendorf 5242. Alternatively, a syringe (ideally of glass, with a screw-plunger, available from Leitz) fixed to the platform
- Glass micropipettes: there are two types of microinjecting pipettes that can be used:

Ready-to-use prepulled micropipettes from Eppendorf. They are mounted on a plastic screw which fits into the Leitz micropipette holder

Micropipettes produced in the laboratory using a puller device (see below and Fig. 1.1C). It is recommended to use capillaries made of borosilicate glass (available from Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, Berks, UK, cat. no. GC120TF-10). These capillaries have an outer diameter of 1.2 mm and a wall 0.13 mm thick. Spanning the entire length of the capillary there is a filament of 0.1 mm $\varnothing$ adhering to its inner wall, which supports displacement of the sample solution to the tip of the micropipette (see Fig. 1.2). See Schnorf et al. (1994) for a detailed characterization of micropipettes pulled from different types of capillaries and a method to determine the diameter of the tip opening by measurement of the threshold bubble pressure.

Microinjection pipettes can be treated with silane to avoid interaction of sample and/or culture medium components with the hydrophilic glass surface. The most commonly used silanization protocols involve a chemical reaction between hydrophilic groups at the glass surface and an organic silane that contains a hydrophilic glass-reactive moiety



- ◀ **Fig. 1.1A–C.** Assembled instruments for manual and automatic microinjections (see Materials). **A** Manual microinjection setup: 1 antivibration table; 2 Leitz heavy base; 3 Zeiss Axiovert inverted microscope; 4 right-side Leitz micromanipulator. **B** Automatic microinjection setup: 1 Zeiss inverted microscope; 2 Eppendorf automatic micromanipulator (Model 5171): *a* micromanipulating unit with three motorized subunits assembled to provide movement in the x, y, and z axis; *b* power unit; *c* small computer unit with keyboard and joystick; 3 Eppendorf microinjector (Model 5242); 4 TV camera; 5 TV monitor showing on the screen cells on a glass coverslip being microinjected by the micropipette which is on the right side pointing to the center of the screen. **C** Horizontal puller from Sutter Instrument (Model P-87): 1 filament holder; 2 right and left slides; 3 clamps; 4 glass capillaries

and a hydrocarbon chain which confers hydrophobicity (see Leyden 1985; Proctor 1992 and refs. therein). Both the inside and outside surfaces of the micropipette can be treated. However, in general, there is no need to treat the inner surface of the micropipette, because binding of nucleic acids and proteins to untreated glass does not occur at the physiological ionic strength of commonly used injection solutions (Thomas et al. 1979). Furthermore, single-stranded DNA and proteins bind to silanized glass even more strongly than to untreated glass (see Proctor 1992). Silanization of the outside surface of the micropipette may be more advisable, because it prevents adhesion of cellular hydrophilic material to the glass which often blocks the micropipette opening and impairs ejection. However, silane treatment is not easy to perform, and, in general, adhesiveness does not impair injection of a reasonable number of cells with the same micropipette before requiring its change. Therefore, we do not recommend routine silanization of the micropipettes.

– Pipette puller

Horizontal puller: Sutter Instrument Co. (Novato, USA), Model P-87 (Fig. 1.1C). Load a capillary, fix both sides by tightening the clamps on the right and left slides, so that it is centered with respect to the heating filament. Set current, force and time: e.g., Heat = 640, Pull = 150, Vel = 100, Time = 135. Press “start” button and wait until the capillary has been pulled into two micropipettes suitable for microinjection (see Fig. 1.2)

Vertical puller: David Kopf Instruments (Tujunga, California, USA), Model 720. Load a glass capillary in the upper clamp, center it with respect to the filament and tighten clamp. Rise lower slide and tighten clamp. Adjust heat and solenoid range (e.g., heat = 11 and solenoid = 3.6). Press “start” button

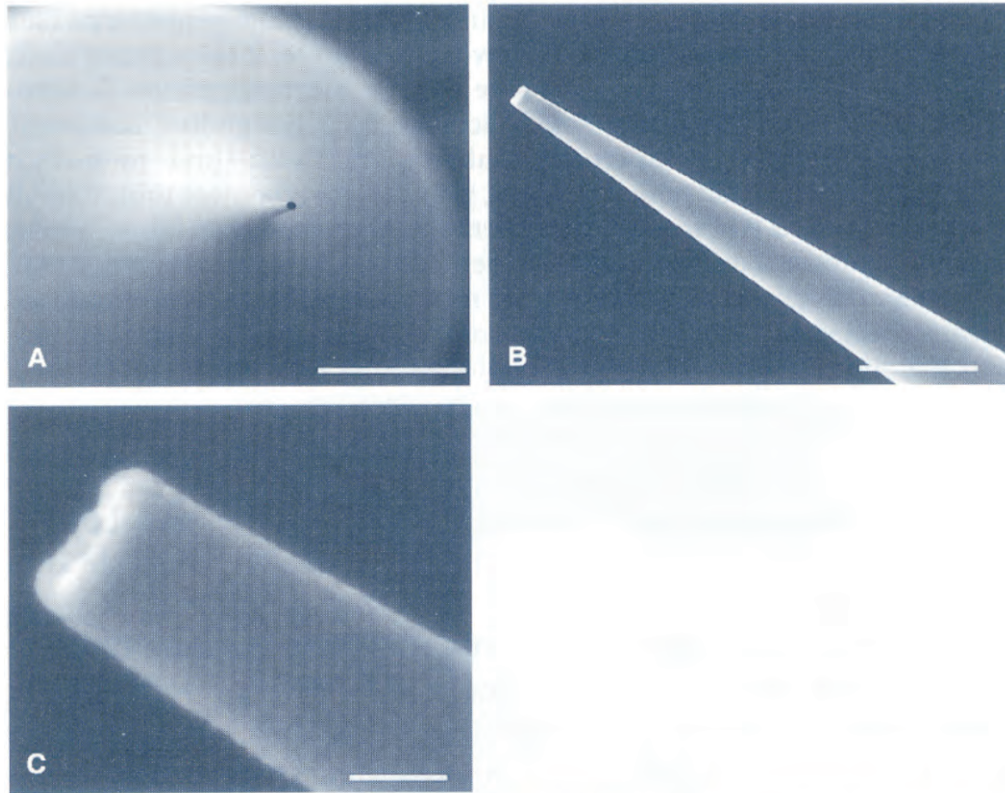


Fig. 1.2A–C. Scanning electron micrographs of a representative micropipette tip. The micropipette was produced by pulling a borosilicate glass capillary (see Materials) in a horizontal puller device like that shown in panel C of Fig. 1.1. The inner diameter of the tip is about 150 nm and the outer roughly 350 nm. Sharpness and shape of the tip edges may vary slightly from one micropipette to another. Micropipettes were sputter-coated with 10 nm Au/Pd, which may enlarge the overall appearance and smoothen the tip edges. The micropipettes were imaged in a FESEM (Philips XL-30FEG) at 30 keV. Bar A 200 μ m, B 2 μ m, C 200 nm

- Cell culture equipment**
- Cell culture incubator and laminar flow hood
 - Plastic dishes and glass coverslips. Plate the cells to be microinjected on 60-mm $\varnothing$ tissue culture dishes, each containing several glass coverslips (up to six, 10–15 mm $\varnothing$). When the cells are ready for injection (for most purposes at 20–40 % confluency), transfer one coverslip to a new 60 mm $\varnothing$ dish containing 4–5 ml of buffered medium

Two days before plating cells for microinjection, treat an appropriate number of glass coverslips as follows:

1. Place coverslips, separated and in vertical array, on ceramic or metal racks.

2. Rinse briefly by immersion of racks into a glass jar filled with tap water.
 3. Drain racks on paper towels and transfer them to another jar containing 0.1 N HCl. Incubate overnight.
 4. Rinse coverslips in tap water 5×10 min each.
 5. Immerse racks in 70 % alcohol and incubate for 60 min.
 6. Rinse briefly in deionized water.
 7. Drain on paper towels.
 8. Let dry for 30 min at room temperature.
 9. Bake at 220–250 °C for 6 h.
- Diamond-point pencil. It is used to mark small circles or crosses on the coverslips. Cells inside or around this mark will be injected. This facilitates retrieval of injected cells. Alternatively, coverslips with an etched grid are commercially available (CellLocate coverslips, Eppendorf).

In addition to the medium required for culturing the cell line or primary culture under study, which is maintained at physiological pH values with the aid of the 5 % CO₂ atmosphere provided by the incubator, it is necessary to use a buffered medium to keep the cells during microinjection. The most convenient medium should be found attending the characteristics of the cells and the nature of the experiment. Suitable buffered media can be prepared as follows:

Buffered culture medium

- Culture medium with 25 mM HEPES pH 7.2 (stock 1 M, sterile filtered and kept at room temperature) substituted for an equivalent amount of the bicarbonate to maintain the pH in the physiological range
- Culture medium without serum and buffered with 25 mM HEPES, pH 7.2
- Hank's balanced saline solution (HBSS), buffered with 25 mM HEPES pH 7.2

These media should contain penicillin and streptomycin. Antifungal antibiotics, however, are not recommended as they may damage the cells and are not necessary if microinjection is performed in a clean room used only for this purpose.

- Injection buffer** There are many possible buffer solutions that can be used to prepare samples for injection. The following are the buffers in most widely used:
1. Tris-EDTA buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.25 mM EDTA. This is the commonest buffer used in nucleic acid solutions to be injected into the nucleus of cultured cells and eggs (see Wassarman and DePanphillis, 1993; Hogan et al. 1994).
 2. Phosphate buffers. Phosphate is the main intracellular anion and this makes logical its use in injection buffers. However, when used at physiological concentrations (e.g., 48 mM K_2HPO_4 , 14 mM NaH_2PO_4 , 4.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.2, Graessmann et al. 1980), it may precipitate as calcium phosphate at the opening of the microneedle, where the injection buffer mixes with the culture medium, thus blocking ejection of the sample through the tip. Therefore, some authors prefer to use buffers with a lower concentration of phosphate compensated with a concentration of chloride above physiological levels, which allows maintaining Na^+ and K^+ concentrations close to the intracellular values (e.g., 10 mM each H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} , pH 7.2, 84 mM Cl^- , 100 mM K^+ , 17 mM Na^+ , 1 mM EDTA, see Proctor 1992).
- Fluorescent markers**
- FITC-Dextran (Sigma FD-70S or FD-150S)
 - Rhodamine-dextran (70S, Sigma R-9379)
 - Rhodamine-dextran, 40,000 MW, lysine fixable (Molecular Probes D-1843)
- Prepare 10 % (w/v) stock solutions of these markers in injection buffer, store at -20°C protected from the light. Working solutions are prepared by diluting stocks in injection buffer to a final concentration of 0.25–1 % (see Sect. 1.2). These solutions should be filtered through $0.22\ \mu\text{m}$ filters and stored at 4°C protected from the light.
- Enzyme markers**
- Luciferase (Sigma L-5256)
 - HRP (Sigma P-8250). Peroxidase substrate TMB and peroxidase solution (Pierce 1854050 and 1854060, respectively)
- Immunofluorescence and histochemistry reagents**
- Fixatives. In general, injected cells can be readily fixed with one of the fixatives described below. However, for each particular antibody the most appropriate fixative should be found
- Methanol. For fixation, immerse the coverslips in 100 % methanol at -20°C for 2–5 min

Buffered 4 % paraformaldehyde/0.2 % glutaraldehyde (PFA/GA). Prepare as follows:

1. Dissolve 0.5 g of paraformaldehyde in 25 ml of PBS by heating to 60 °C while adding 10 M NaOH (1 small drop per min) until PFA is dissolved and the solution clears (it takes 5–10 min).
2. Let cool to room temperature.
3. Add 20 µl of 25 % glutaraldehyde.
4. If necessary, adjust pH to 7–7.2 with 1 M NaOH.

Fix the cells as follows:

1. Incubate the coverslips in PFA/GA for 10–15 min.
2. Rinse briefly in PBS.
3. Quench autofluorescence by incubating in 100 mM NH₄Cl in PBS 2×10 min each.
4. For immunofluorescence, permeabilize the cells by incubating in 0.2 % Triton X-100 in PBS at room temperature for 5 min. Alternatively, permeabilize by passing the coverslips through an ethanol series: 25, 50, 70, 90, 100, 90, 70, 50, and 25 % ethanol, 1 min each. Finally transfer to PBS and proceed for immunofluorescence.
 - Blocking solution: 2 % fetal calf serum, 2 % BSA (Sigma A-6793) and 0.2 % fish gelatin (Sigma G-7765) in PBS. For blocking use undiluted. For diluting first and secondary antibodies use 1:10 blocking solution in PBS
 - Mounting medium. We use routinely Mowiol mounting medium prepared as follows:
 1. Add 10 g of Mowiol 4–88 (Calbiochem no. 475904) to 40 ml PBS.
 2. Stir for 2 h.
 3. Add 20 ml glycerin and stir for an additional 10 min.
 4. Centrifuge at 3000 rpm for 15 min.
 5. Make aliquots of 1 ml and store at –20 °C. This solution is very dense and should not be vortexed but mixed gently by inversion after thawing to avoid bubble formation. Do not re-freeze aliquots, keep them at 4 °C until new use.

- N-acetyl cysteine (NAC, Sigma A-8199). Prepare a stock solution 500 μ M in MEM, neutralize as needed with NaOH, store at -20°C . For use: dilute 1:5000 in the culture medium

1.1

Microinjection

Procedures

This section describes the preparation of cells, samples and microneedles for injection, and the procedures for the manual and automatic micromanipulation of cultured cells.

Cells Virtually, any cell in culture can be microinjected. Cell lines and primary cultures from most tissues attach firmly to tissue culture dishes and also to glass coverslips. Moreover, most cell types are large and robust enough to allow easy and efficient microinjection. Some cells, however, are very small or attach weakly to the glass which makes microinjection very difficult and time-consuming. In addition, there are cells that grow in suspension and need to be held using a holding pipette placed opposite the injecting needle. The protocols given here refer to the first type of cells, as it is the most common, and would need to be adapted to the peculiarities of the other two types.

Prepare cells for microinjection as follows:

1. One day before injection, plate the cells on glass coverslips (10–15 mm $\varnothing$) to a density of 250–1000 cells per coverslip, depending on the experiment.
2. Just before starting injection, transfer a coverslip with the cells to be injected to a new tissue culture dish (35 mm $\varnothing$), quickly mark a cross (or one or more circles) on the coverslip using a diamond-point pencil washed with 70 % ethanol and flamed briefly under the hood, and add 3 ml of buffered culture medium (see Materials, above).
3. Inject cells for 30 min. In general, injection sessions should last no longer than 30 min to minimize cell damage due to deleterious effects of the microscope light and the culture conditions during injection.
4. After injection, remove the buffered medium, wash gently with PBS, transfer coverslip to a dish containing preincubated (30 min) fresh culture medium, and return it to the incubator.

DNA. For most purposes, circular (intact) plasmids are chosen for microinjection because they provide good levels of expression. However, for some experiments, like those involving homologous recombination, DNA fragments devoid of vector sequences will need to be microinjected.

Injection samples

Oligonucleotides. For microinjection, oligonucleotides should be dissolved in water or in the same buffer as used for DNA (see Materials, above). It is advisable to use HPLC-purified oligonucleotides. It may be also very convenient to use phosphorothioate derivatives, which are more resistant to degradation and hence have a more intense and prolonged effect on the cells (see Güimil García and Eritja, Chap. 5, this Vol.).

RNA. RNA for microinjection is commonly obtained by *in vitro* transcription of plasmids designed to express the gene of interest. The enzyme used in this step should be inactivated and, preferably, removed (e.g., by purifying the RNA using glass milk) because it might damage the cells. For some experiments, total or poly A(+) RNA from cells or tissues has to be microinjected into host cells. In these cases, we recommend purifying the RNA through CsCl gradients.

Antibodies and purified proteins. Dialyze protein solutions to be injected against microinjection buffer. In general, use solutions whose protein concentration is in the range of 1 mg/ml.

Note: Consult Sambrook et al. (1989), Proctor (1992), Wassarman and DePanphilis (1993), and Hogan et al. (1994) for methods on the preparation of DNA, RNA, oligonucleotide, and protein solutions for microinjection.

Micropipettes are prepared from glass capillaries as described in Materials, above. Once pulled, they should be handled carefully to avoid breakage. Contact with the part of the capillary close to the tip should be avoided to prevent further contamination of the culture medium, where it will be immersed during injection. For better reproducibility of experiments it is preferable, whenever possible, to use the same micropipette in the entire injection session.

Micropipettes

1. Load the micropipette with 0.5–1 μ l of injection sample by pipetting it from the rear using a sterile microloader (commercially available from Eppendorf or self-made from a normal glass capillary flamed and pulled).

2. The inner filament in the micropipettes pulled from capillaries GC120TF-10, which runs along the capillary wall, supports displacement of sample solution from the rear to the tip of the micropipette. Therefore, a brief immersion of just 1 mm of the back side of the capillar, which must not have been in contact with the fingers nor anything else, into the sample solution is enough to ensure that a small volume of sample reaches the tip.

Centering and
positioning micropipettes

1. Attach a loaded micropipette to the micromanipulator by introducing its free side into the holder adapter, which is then screwed in hardly to fix the pipette. The adapter with the pipette is then fixed to the holder tube attached to the micromanipulator.
2. Transfer a coverslip containing the cells to be injected to a new dish containing buffered medium (see Materials, above) so that it is centered in the dish.
3. Place the dish on the microscope stage. Try to center roughly one of the circles on the coverslip (see Materials, above) in the center of the illuminated field, in front of the lens, preferably where the light is more intense.
4. Focus on the cells using a low magnification objective (e.g., 5 or 10 $\times$ for 50 or 100 $\times$ magnification, respectively).
5. Center roughly the tip of the micropipette, which appears as a shadow, in the optic field.
6. Lower the pipette slowly until it enters the medium, then stop.
7. Looking through the microscope, move the pipette, adjusting the micromanipulator as necessary until you see its shadow over the field of view. Then try to distinguish where the tip is and center it roughly.
8. Lower the pipette slowly until you see it more sharply, but still not in focus.
9. Change to the working magnification (e.g., 320 $\times$). Focus the cells and look for the tip of the pipette. If you do not find it, return to the lower magnification and try to center it. Repeat this step.
10. Lower the tip carefully until it is in focus.

Pressure Systems. Setting Injection Pressures

Stand by and ejection pressures applied to the injecting pipette may be provided by any of the following systems:

- The simplest device consists of a 50-ml glass syringe connected to the micropipette through the back opening of the holder by plastic tubing. The entire system is filled with air. In some cases this syringe is fixed to a metal support to which its plunger is screwed so that it can be moved up and down. Turning right, the plunger goes down and raises the pressure applied to the pipette, while turning left, the plunger goes up and decreases pressure. Care must be taken, however, not to exert negative pressure because this may cause cultured medium to be sucked back into the pipette. When using a normal syringe, only when pressure is exerted on it is the injecting sample forced out of the pipette, while the flow of sample ceases when pressure is released.
 - More sophisticated automatic microinjectors are available from Eppendorf. This device permits accurate control of the pressure applied to the pipette throughout the experiment. It provides a constant positive pressure that generates a continuous flow of injecting sample, thereby resulting in less clogging of the pipette and eliminating backflow problems. The device is connected to a bottle of compressed gas which provides the input pressure. In addition, it is connected to the pipette holder by plastic tubing. The output pressure can be modulated at three different levels by regulating the corresponding valves:
- **P3** is the lowest level of pressure. It is applied continuously to the pipette (holding pressure) to avoid aspiration of culture medium. Its value can be adjusted ranging from 0 to 700 hPa, depending on the size of the opening of the micropipette tip. We advise setting P3 at ≤ 100 hPa for injection pressures (P2, see below) ≤ 300 hPa, and at 100–200 for higher P2 values. If manual microinjection is performed, P3 may be adjusted so that it can be used as injection pressure.
 - **P2** is the intermediate level of pressure, which provides the force needed for microinjection (injection pressure). It can be set between 45 and 2000 hPa. Common values required for injection using GC120TF-10 capillaries with a tip opening of about 150 nm (Fig. 1.2) are between 200 and 400 hPa. The time of injection during which this pressure will be applied is selected on the control panel ranging from 0.1 to 9.9 s. If manual microinjection is performed, P2 is applied by the

Pressure systems

operator pressing the footpad briefly. In this case, care should be taken that the switch from P3 to P2 occurs when the tip of the pipette is inside the cell. When using the automated microinjection device, it will recall automatically the P2 pressure during each injection. Each change from P3 to P2 is recorded on the control panel, which shows the total number of cells injected.

- **P1** is the highest output range (3000–10,000 hPa). The commonest setting is 5000–6000 hPa. P1 is applied manually and its use is restricted to cleaning the capillary when it is obstructed by impurities that may be present in the injection solution itself or inside the capillary.

Setting optimal injection pressures

Once the tip of the pipette is positioned and focused in the plane of the cells, and just before starting a round of injections, it should be verified that the tip of the pipette is open. Then, the next step is to adjust the optimal injection pressure, i.e., that providing ejection of a reasonable volume of sample in a short time (0.5–1 s), which ensures minimal damage to the cells.

1. Confirm that the tip of the microneedle is open by applying full pressure for 1 or 2 s. If it is open, the flow of injection solution will be seen clearly coming out of the pipette as a brighter front penetrating the surrounding medium. If ejection is not observed when applying full pressure, but the pipette slides on the coverslip instead, the tip is closed. Try to open it by applying full pressure for 3–5 s several times and, if necessary, beating gently with a finger on the micromanipulator at the same time, so that the tip breaks against the glass surface. If this does not suffice to open the tip, the micropipette should be replaced by a new one. If it has the same problem, revise the settings of the puller and, if necessary, change the conditions by increasing the current in steps of 0.01 A until open needles are obtained.
2. Select a cell in the center of the optical field and place the tip of the micropipette just above the nucleus.
3. Set microinjection time to 0.5–1 s in the front panel of the microinjector.
4. Lower the micropipette until it is inside the nucleus and apply the P2 pressure by pressing briefly on the footpad. Take the tip back to the initial position. In this step can be assessed if the injection pressure is either:
 - a) appropriate, if a small volume of sample was left inside the nucleus which did not cause apparent enlargement

- b) high, if the nucleus was slightly enlarged
 - c) excessive, if the nucleus was clearly enlarged
 - d) too low, if no ejection was observed. Note that compression on the cell surface by the micropipette causes local changes in optical refringency which may give the impression that the cell was injected while it was not. Only experience helps distinguish real from apparent injection.
5. Modify the P2 value according to the result of the previous step and test it in a new cell. Repeat until the appropriate value is found.
 6. The pressure test described above should be performed in the perinuclear cytoplasm if intracytoplasmic injection is intended. The same considerations as in step 4 to set the appropriate injection pressure are valid here. Although the cytoplasm admits injection of higher volumes of sample, yet these should never be so high as to enlarge the cell.
 7. If a syringe is used to provide pressure, appropriate injection pressures are achieved by pressing with more or less intensity on the pestle of the syringe according to the changes in appearance of the cells as described above. Obviously, such device will never permit an accurate control of the injection pressure as the microinjector does, but in experienced hands it provides reliable injections.

Microinjection Performance

According to the micromanipulation technique used, three types of microinjection can be distinguished: manual, in which micropipette movements are operated manually; automatic, and automatic computer-assisted microinjection. The last two use a device to hold the micropipette that performs automatic movements in the x, y, and z axis, and which is operated from a control board or a computer, respectively.

Microinjection experiments can be performed by any of these methods with no significant difference in the results (see Table 1.2 for a comparison). Indeed, a manual system may well fulfill the needs of virtually every experiment. However, automatic micromanipulation can make injection easier and faster, and result in less damage to the cells. For experiments requiring injection of many cells (i.e., several hundreds), the automatic systems may be ideal. Nevertheless, certain types of cells are easier to inject with a manual device because it allows the finest micromanipulation.

Manual system. In order to perform successful and reliable injections within a reasonable time by manual micromanipulation, it is essential to use high-quality equipment, like that described under Materials, above. The Leitz micromanipulator is the best manual device available (Fig. 1.1A) as it is simple to handle and highly precise. The microneedle, which is fixed to the holder of the micromanipulator, can be moved in the x, y, and z axis by operating three knobs and, for the finest movements, a joystick (Fig. 1.1A). Once the tip of the needle is centered with respect to the cellular compartment to be injected, it is moved downwards in the y axis until it enters the cell, at which moment injection starts (Fig. 1.3). This is in contrast with the automatic system, where the needle moves axially (i.e. along its own axis) towards the cell surface during injection (see below). In experienced hands, manual performance is as reliable and fast as automated microinjection.

Table 1.2 Comparison of the different microinjection systems

Microinjection system	Optimal rate of micro-injection ^a	Reproducibility ^{b,f}	Double injection of the same cell ^{c,f}	Applicability to biochemical studies ^{d,f}	Applicability to single cell studies ^{e,f}
Manual	100–200	++	+	++	+++
Automated	200–300	++	++	++	+++
Automated-computerized	500–700	++	+++	+++	+

^a) These values correspond to numbers of cells microinjected in 30 min (an interval of time considered reasonably safe, in terms of cell viability, for cells being microinjected at room temperature in an appropriate medium buffered with HEPES). The optimal number of cells microinjected per time unit depends largely on the quality of the equipment and the experience and ability of the experimenter. It depends also on the cell type (e.g., smaller cells are more difficult to inject), the characteristics of the injection solution (some products favor stickiness at the needle tip), and the culture conditions. For further information on the efficiency of the three systems see Ansorge 1982; Pepperkok et al. 1988).

^b) Reproducibility of microinjection experiments is taken here as a function of the viability of the injected cells and the accuracy of injection. Technically, these two parameters are specified by the damage caused by injection and the volume of sample injected, which are in turn determined by the following factors: (1) diameter of the opening of capillary tip, (2) flow of injection solution, and (3) time of microinjection. The use of a precise puller to produce needles of constant tip diameter and a microinjector to provide accurate pressure and injection time values will help maintain those factors in the optimal range, which varies from cell type to cell type. The system of microinjection will also influence reproducibility. In general, automatic systems cause less damage to the cells than the manual method because the needle is pushed by the micromanipulator in a plane which forms a 45° angle with the plane of the dish surface (axial microinjection), whereas in the manual system the needle moves only in the vertical plane and, therefore the mechanical pressure it needs to cross the cell surface is higher (see Fig. 2); in addition, the possibility that cellular components attach to the capillary tip on its way back out of the cell is also higher by this method due to its vertical displacement. Finally, the time that the needle tip remains into the cell can be precisely controlled only when using the automatic systems.

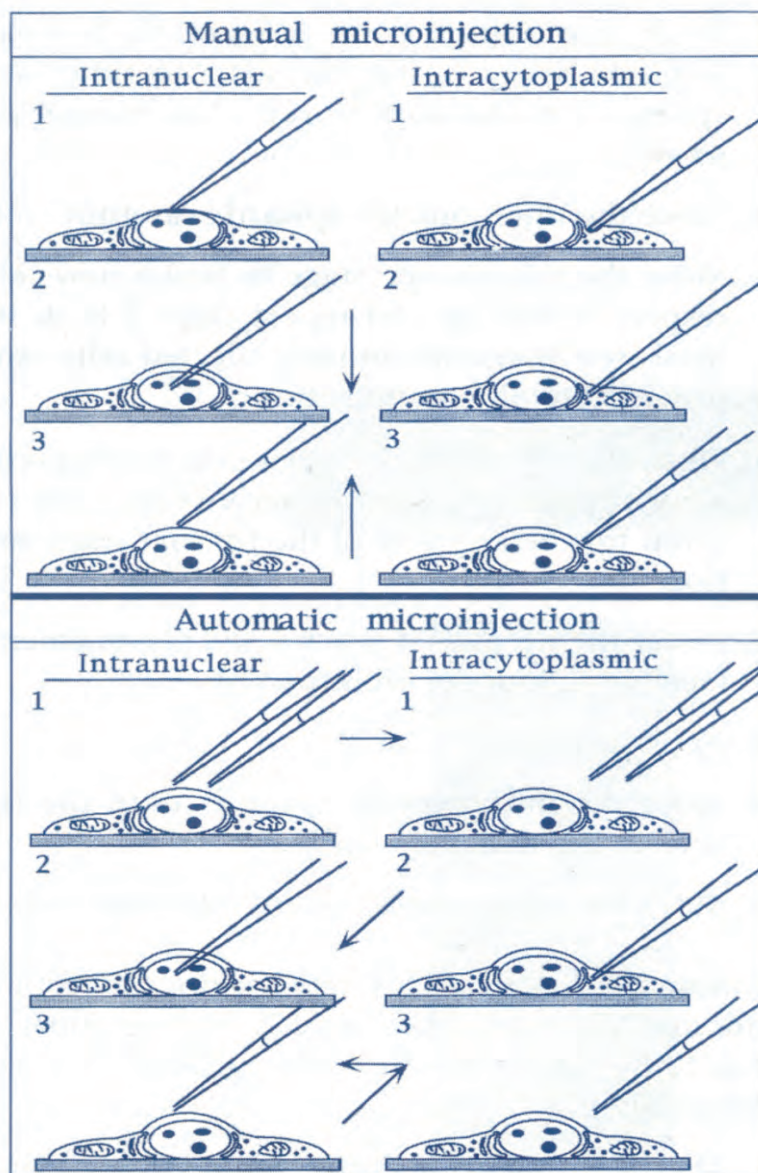
^c) Double injections of cells are easier using the automated-computerized system because the machine keeps in the memory the positions of previously injected cells. By the other two methods the experimenter seeks himself the cells injected in the first round of microinjection. However, viability of double injected cells is considered lower by the manual method due to the reasons stated in ^b.

^d) For optimal results these studies require the injection of hundreds of cells, what is easier and faster to perform by the fully automatic method.

^e) For studies which require injection of a reduced number of cells the three systems are suitable, although the manual and semiautomatic methods are advisable because of their lower cost.

^f) Classification: (++++) very good, (++) good, (+) not recommended.

Fig. 1.3. Schematic representation of cell injections using manual or automatic micromanipulation. Note the different approach of the micropipette tip to the cell in each system: vertical in the manual, axial in the automatic



1. Using the lowest magnification ($50\times$), focus on the plane of the cells situated in the area of the coverslip labeled for injection. Center the micropipette by eye in the illuminated area and lower it until it enters the culture medium. Center the tip of the micropipette in the optical field and lower it until it is in focus. Then, change to the working magnification ($320\times$) and focus on the cell surface. Center and lower the tip until it is in focus. Move the microscope stage until the tip points to the nucleus of a cell. Manual intranuclear injection
2. Lower the tip carefully until it enters the nucleus (see Fig. 1.3, upper left panel).

3. Apply injection pressure: press on the footpath switch of the microinjector to apply P2 for the selected time (see previous section). If a syringe is being used, ensure that enough pressure is applied at this moment.
4. Move the micropipette upwards carefully until it leaves the cell.
5. Move the microscope stage to find a new cell, center its nucleus with respect to the tip and repeat steps 2 to 4. If Cellocate coverslips are used (see Materials, above), injected cells can be recorded in the book provided by the manufacturer.

Manual intracytoplasmic injection

1. Place the tip above the perinuclear cytoplasm. This is the most convenient part for injection because in it the cell is thicker and there is room for the segment of the tip that stays inside the cell during injection.
2. Lower the tip until it touches the plasma membrane and enters the cell (see Fig. 1.3, upper right panel).
3. Apply pressure P2 for 1–2 s.
4. Move the micropipette upwards until the tip is outside the cell and several μm above its surface.
5. Move the microscope stage, find a new cell, and proceed as above.

Automatic System. This type of microinjection requires an automated micromanipulator like the 5171 of Eppendorf (see Materials, above and Fig. 1.1B), which has three components (see Eppendorf 5171 Operating Manual):

- Micromanipulating unit, with three modules for the x, y, and z coordinates, each equipped with a drive unit and a stepper motor
- Control unit. It consists of a small computer with a keyboard and a joystick
- Power unit

Automatic intranuclear and intracytoplasmic injections

The Eppendorf 5171 micromanipulator performs automatically all micropipette movements required for axial injection (see Fig. 1.3 lower panel). In a first step, the coordinates of the micropipette positioned inside the nucleus or the cytoplasm of a test cell are registered and stored in the control unit computer. Then, injection proceeds by centering each new cell with respect to the micropipette tip and recalling the coordinates using the joystick.

1. Center the micropipette tip in the optic field as described above for the manual system, but operating the micromanipulating unit automatically from the control board.
2. At the working magnification (320 $\times$), lower the tip to touch a point of the cell surface region above the nucleus or above the perinuclear space, until a slight depression is seen.
3. Fix position parameters for intranuclear or intracytoplasmic injection in the control unit.
4. Lift the tip a few μm above the cell surface. It should be slightly out of focus but still visible. Select a new cell and microinject it by pressing on the button placed above the joystick. The micropipette describes first a retrograde trajectory on the horizontal plane (toward the micromanipulator unit) followed by a rapid axial movement toward the cell, which ends exactly when the tip reaches the coordinates fixed in the previous step (see Fig. 1.3). At this moment, the control unit of the micromanipulator, which is connected to the microinjector, activates the injection pressure (P2) for the preselected time. Immediately after this, the micropipette returns to the initial position.
5. Correct the parameters in the control board as necessary. Because the coverslip and dish surfaces are not perfectly flat, it is necessary to adjust the intranuclear or intracytoplasmic coordinates when injection progresses from one region to the other of the coverslip.

1.2

Protocols for the Analysis of Microinjected Cells

Estimation of Ejection Flow and Average Injection Volume

The ejection flow (EF, volume of sample solution released from the micropipette per time unit) can be easily estimated using a radioactive marker. The micropipette is loaded with a stock solution containing a radioactive isotope (^{14}C or ^{35}S) and ejected at selected conditions of pressure and time into a drop of water. The sample is measured in a scintillation counter. Comparison to a standard curve obtained with a series of dilutions of the stock solution allows calculate the volume of sample ejected, which divided by the time of ejection gives the EF. The EF is determined by the same factors listed below for the injection volume. Typical ejection flow values fall in the range of 0.5–1 $\mu\text{l/s}$ (Ansorge and Pepperkok 1988).

The volume of sample that is injected into each cell (AIV, average injection volume) can be estimated using reporter enzymes like luciferase or horseradish peroxidase (HRP).

Procedure

AIV estimation using luciferase

1. Inject a precise number of cells (50–100) with a 2 mg/ml stock solution of luciferase in PBS or injection buffer.
2. Rinse the coverslip gently in PBS and lyse the cells with 50 μ l of 2 % NP-40/0.2 % SDS in PBS. Use the entire cell extract to measure luciferase activity in a luminometer. Make a standard curve using 50- μ l samples from a series of dilutions of the luciferase stock solution.
3. Calculate the amount of luciferase in the cell lysate and estimate the volume of solution injected. To calculate the AIV, divide this value by the number of cells injected.

AIV estimation using HRP

1. Inject a precise number of cells (50–100) with a 20 mg/ml stock solution of HRP in PBS or injection buffer.
2. Rinse the coverslip gently in PBS and lyse the cells with 50 μ l of 2 % NP-40/0.2 % SDS in PBS.
3. Pipette lysate into a spectrophotometer disposable cuvette containing 50 μ l PBS.
4. Prepare a series of dilutions of the HRP standard solution and pipette 50 μ l of each dilution into cuvettes containing 50 μ l of 2 % NP-40/0.2 % SDS in PBS.
5. Add 200 μ l of a mixture (1:1, v/v) of peroxidase substrate TMB and peroxidase solution to the cuvettes of steps 3 and 4. Incubate at room temperature for 5–30 min (depending on the intensity of the blue color developed by the samples during the reaction).
6. Stop reaction by adding 700 μ l of 1M PO_4H_3 (the samples become yellow) and read absorbance at 450 nm. Estimate the total volume of HRP injected and from this the AIV.

Analysis of Cells Injected with Fluorescent Markers

Fluorescent markers, like FITC-dextran, are frequently used as coinjection markers to visualize injected cells. At concentrations between 0.25

and 1 % they exhibit very low toxicity and remain visible for 2–4 days in proliferating cells, or longer in quiescent and postmitotic cells. Living cells microinjected with these markers can also be visualized; however, exposure to UV light for just a few seconds may cause irreversible damage to the cells. The same applies to injection products labeled with a fluorochrome, like, for instance, antisense oligonucleotides coupled to FITC or rhodamine (see Fig. 1.4A,B).

1. Rinse injected cells gently twice in PBS.
2. Fix briefly with methanol (2 min) or PFA/GA (5 min) (see Materials, above).
3. Rinse the coverslip briefly in deionized water.
4. Mount on a slide with a drop of Mowiol.

If immunofluoresce or any other treatment of the injected cells is to be performed, it is advisable to use a fixable dextran (see Materials, above) to avoid losses of marker by diffusion during the washing steps.

Cells Injected with Reporter Plasmids

1. Inject a convenient number of cells with a LacZ expressing plasmid. Allow cells express the plasmid for a convenient time.
2. Wash coverslip briefly and gently twice in PBS pH 7.3/2 mM MgCl₂.
3. Fix in PFA/GA/2 mM MgCl₂ at room temperature for 10 min.
4. Wash twice with PBS pH 7.3 / 2 mM MgCl₂.
5. Transfer coverslip to one of a 12-multiwell dish and add 0.5 ml of staining solution containing: 1 mg/ml X-Gal (Biomol, Hamburg, cat. no. 02249, stock 40 mg/ml in dimethyl-formamide), 0.02 % NP-40, 2 mM MgCl₂, 5 mM K₃Fe(CN)₆ (stock 50 mM in PBS pH 7.3), and 5 mM K₄Fe(CN)₆ (stock 50 mM in PBS pH 7.3).
6. Incubate at 37 °C. The staining is usually visible after 1–2 h of incubation, depending on the promoter driving β-Gal expression. Nevertheless, intensity continues to increase over 12–24 h.
7. Rinse twice in PBS. Cover with PBS for examination or, preferably, rinse in deionized water and mount with Mowiol on a glass slide (Fig. 1.4C).

X-Gal staining of cells expressing the *E. coli* β-galactosidase

Note: For details of X-Gal staining and quantitation of galactosidase activity see Cid et al. (1993), see also Cid-Arregui et al., Chapter 26, this volume.

Visualization of cells injected with plasmids expressing the green fluorescent protein (GFP)

The GFP (238 amino acids) was isolated from the bioluminescent jellyfish *Aequorea victoria* (Prasher et al. 1992) as a monomer which emits green fluorescent light upon excitation with ultraviolet or blue light. The GFP retains its fluorescence capacity when expressed recombinantly in eukaryotic cells (Chalfie et al. 1994). Its visualization, however, is limited by the low amount of light that it emits (less than 1 photon per molecule), as compared with most fluorescent compounds (several thousands of photons per molecule). Nevertheless, GFP is a very useful tool that can be utilized as a reporter in gene expression studies, for the subcellular localization of fusion proteins, and in organelle traffic studies.

1. Inject cells with a GFP-expressing plasmid (100 µg/ml in injection buffer). The incubation time for the cells permitting an appropriate level of GFP expression, depends largely on the transcriptional activity of the promoter from which it is expressed. Using the cytomegalovirus (CMV) promoter we have observed visible amounts of GFP as early as 6 h after injection (see Fig. 1.4D). Prior to fixation, some authors recommend incubating the cells at 30 °C for 2 h to enhance the fluorescence capability of the protein.
2. Fix the cells as described in Materials, above. GFP fluorescence persists after methanol and PFA/GA fixation.
3. For some experiments it may be interesting to visualize the GFP in living cells. In this case, it is convenient to supplement the culture medium with N-acetyl cysteine (NAC) to protect cells from damage caused by UV light (Mayer and Noble 1994). Prepare a stock of 500 mM NAC (Sigma A-8199) in MEM, neutralize as needed with NaOH. For use: dilute 1:5000 in culture medium. After having photographed or recorded with a videocamera the expressing cells for a few seconds, rinse the coverslip briefly in PBS, transfer into a dish containing appropriate culture medium (without NAC), return it to the incubator and incubate as required for the experiment.

Cells injected with plasmids expressing chloramphenicol acetyl transferase (CAT)

The CAT assay is very useful for monitoring transcriptional activity of eukaryotic promoters and enhancers (see Gorman et al. 1982). A major advantage of the method is that the activity values obtained are usually proportional to the activity of the promoter. In addition, no endogenous CAT activity is detected in mammalian cells (see Fig 1.5).

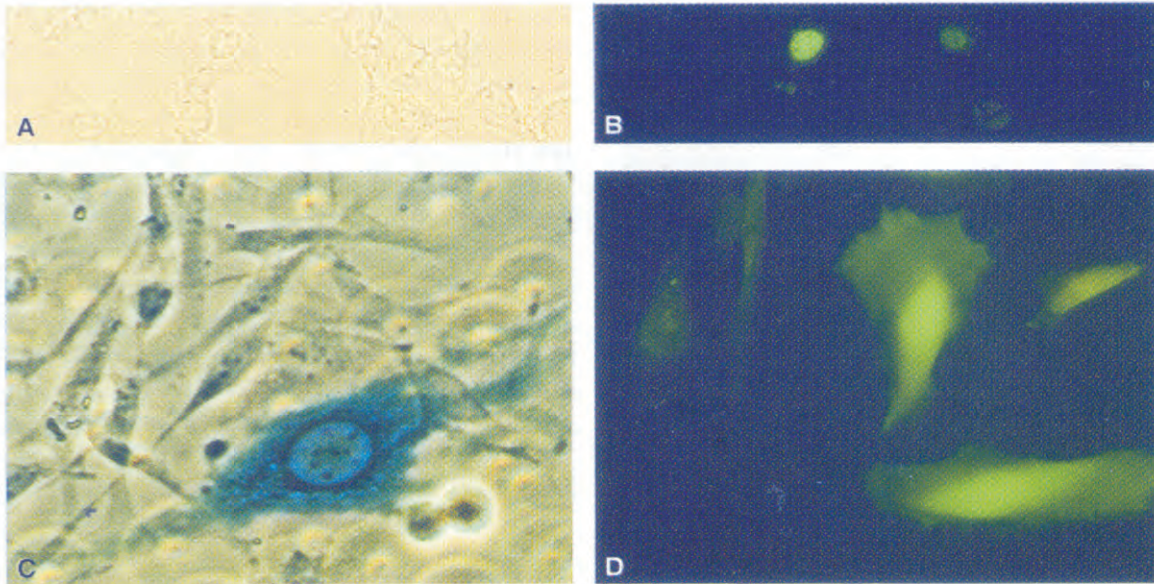


Fig. 1.4A–D. Visualization of fluorescent samples and reporter gene products in injected cells. **A** and **B** Phase contrast (**A**) and fluorescence microscopy (**B**) of FITC-conjugated antisense oligonucleotides in living cells photographed immediately after intranuclear injection. **C** X-gal staining of a cell microinjected with the bacterial LacZ gene expressed from the HCMV promoter. **D** fluorescence microscopy of cells expressing GFP. After injection, the cells were incubated at 37 °C/5 % CO₂ for 6 h, then fixed in methanol for 5 min at –20 °C, air-dried and mounted with Mowiol

CAT Assay

1. Inject at least 100 cells (ideally 300–500) with a solution of 100 mg/ml of a plasmid expressing the CAT gene. Incubate the injected cells for the appropriate time.
2. Rinse in PBS, drain.
3. Scrape the cells with the tip of a pipette loaded with 100 µl of TGD buffer (250 mM Tris pH 8, 15 % glycerol, 5 mM dithiotreitol) while pipetting up and down. Transfer cell suspension to a 1.5-ml microfuge tube.
4. Prepare crude extracts either by sonicating in a water bath or by performing five to six freeze-thaw cycles in a dry-ice/ethanol bath and a 37 °C water bath.
5. Centrifuge at 4 °C for 10 min to eliminate debris.
6. Use the entire cellular extract to determine CAT activity after completing volume to 300 µl with 250 mM Tris pH 8, 15 % glycerol.

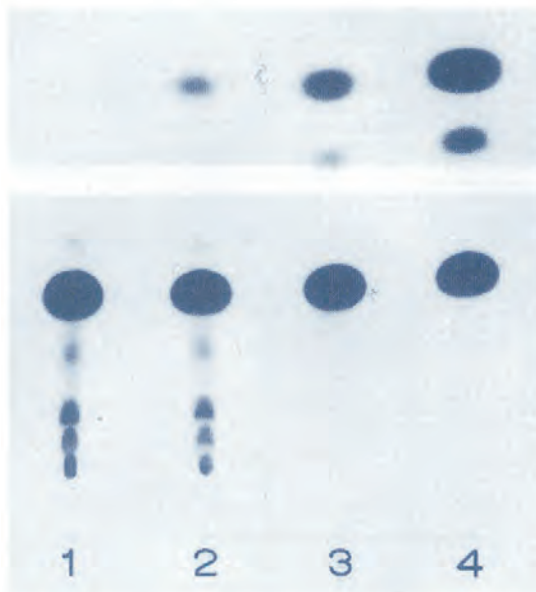


Fig. 1.5. Biochemical analysis (CAT assay) of injected cells. About 100 cells were injected with a reporter plasmid carrying the CAT gene expressed from RSV promoter (Cid et al. 1993). After injection, cells were incubated overnight to allow reporter gene expression, lysed, and used for CAT assay as described in Section 1.2. 1 Control non-injected cells; 2 cells microinjected with 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of RSV-CAT plasmid, the whole extract was used for the assay; 3, 4 control assay performed with 20 and 100 μg of protein extract, respectively, from cells stably transfected with the same RSV-CAT plasmid used for microinjection

7. Add 8 μl of acetyl CoA (20 mM), 2.5 μl of ^{14}C -chloramphenicol (25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$; 0.0625 μCi). Vortex vigorously. Incubate at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 45 min.
8. Stop reaction by adding 250 μl of ethylacetate (99.5 %).
9. Centrifuge 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ in a microfuge.
10. Take upper organic phase containing labeled chloramphenicol and its acetylated forms.
11. Dry in Speed-Vac for 1 h or let stand overnight in a fume hood.
12. Resuspend in 10 μl of ethylacetate.
13. Spot samples in small drops on a silica plate. Samples should be separated at least 1.5 cm from each other, and 2 cm from the edge of the plate.
14. Chromatography. Place the plate vertically into a glass recipient containing an adequate volume of chloroform/methanol (19:1, v/v). Let chromatography run for 45–60 min.
15. Let the plate stand at room temperature for a few min and expose on an X-ray film.

Analysis of Cells Injected with Antibodies

1. After microinjection, incubate cells for at least 30 min.
2. Rinse coverslip gently in PBS.
3. Fix in cold methanol or PFA/GA as described in Materials, above. The optimal conditions for each antibody should be tested previously (see Harlow et al. 1988; Hockfield et al. 1993).
4. Block for 30 min in blocking solution (see Materials, above).
5. Add a FITC- or rhodamine-conjugated secondary antibody diluted in blocking solution 1:10 in PBS. Incubate at room temperature for 1 h, or at 4 °C overnight, in a humid chamber.
6. Wash 5× with PBS, rinse in deionized water and mount with Mowiol.

References

- Anderson WF, Killos L, Sanders-Haigh L, Kretchmer PJ, Diakumakos EG (1980) Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 77:5399–5403
- Ansorge W, Pepperkok R (1988) Performance of an automated system for capillary microinjection into living cells. *J Biochem Biophys Meth* 16:283–292
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 27:223–231
- Capecchi M (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22:479–488
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802–805
- Chambers R and Chambers E L (1961) *Exploration into the nature of living cell*. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts
- Cid A, Auewarakul P, García-Carrancá A, Ovseiovich R, Gaissert H, Gissmann L (1993) Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol* 67: 6742–6752
- Diakumakos E G (1973) Methods for micromanipulation of human somatic cells in culture. *Methods Cell Biol* 7:287–311
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci* 77:7380–7384
- Gorman CM, Moffat LF, Howard BH (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2: 1044–1051

- Graessmann A (1970) Mikrochirurgische Zellkerntransplantation bei Säugetierzellen. *Exp Cell Res* 60:373–382
- Graessmann A, Graessmann M (1976) 'Early' simian-virus-40-specific RNA contains information for tumor antigen formation and chromatin replication. *Proc Natl Acad Sci* 73:366–370
- Graessmann A, Graessmann M, Müller C (1980) Microinjection of early SV40 DNA fragments and T antigen. *Meth Enzymol* 65:816–825
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E (1994) *Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Hockfield S, Carlson S, Evans C, Levitt P, Pintar J, Silberstein L (1993) *Selected methods for antibody and nucleic acid probes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Leyden DE (ed) (1985) *Silanes, surfaces and interfaces*. Gordon and Breach Science Publishers, New York
- Mabuchi I, Okuno M (1977) The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J Cell Biol* 74:251–263
- Mayer M, Noble M (1994) N-acetyl-cystein is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 91:7496–7500
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendgast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229–233
- Proctor GN (1992) Microinjection of DNA into mammalian cells in culture: theory and practice. *Methods Mol Cell Biol* 3:209–231
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring-Harbor, New York
- Schnorf M, Potrycus I, Neuhaus G (1994) Microinjection technique: routine system for characterization of microcapillaries by bubble pressure measurements. *Exp Cell Res* 210:260–267
- Stacey, DW Allfrey VG, Hanafusa H (1977) Microinjection analysis of envelope-glycoprotein messenger activities of avian leucosis viral RNAs. *Proc Natl Acad Sci* 74:1614–1618
- Thomas CA, Saigo K, Mcleod E, Ito J (1979) The separation of DNA segments attached to proteins. *Anal Biochem* 93:158–166
- Tjian R, Fey G, Graessmann A (1978) Biological activity of purified Simian virus 40 T antigen proteins. *Proc Natl Acad Sci* 75:1279–1283
- Wagner EF, Stewart TA, Mintz B (1981) The human beta-globin and a functional thymidine kinase gene in developing mice. *Proc Natl Acad Sci* 78:5016–5020
- Wassarman, PM, DePamphilis ML (1993) *Guide to techniques in mouse development*. Methods in Enzymology, vol. 225. Academic Press, New York

[Chapter 1: "Protocols for the Manual and Automatic Microinjection of Somatic Cells in Culture and for the Analysis of Microinjected Cells",
traducción al chino, 18 pp. (2002)]

第一章 对培养的体细胞进行手工与自动微注射的方法和 对微注射后细胞的分析方法

ANGEL CID-ARREGUI,¹ CARLA SANTANA,² MIRIAM GUIDO,²
NESTOR MORALES-PEZA,² MARIA VICTORIA JUAREZ,³ ROGER WEPF,³
AND ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA²

引言

对活细胞的显微操作起始于 20 世纪的前半叶,首先应用于电生理的研究。在 40 年代后期,建立了细胞内记录的可靠方法。在以后不到十年间,使用类似的技术直接将生物物质转送到细胞内(Chambers & Chambers 1961)。起初微注射的目的是向培养的受体细胞中转移哺乳动物的细胞核(Raessmann 1970)和染色体(Diacumakos 1973)。随着物质的提纯和设备的改进,已经能够向细胞内转移不同来源的大分子溶液,比如病毒 RNA(Graessmann & Raessmann 1976; Stacey et al. 1977),纯化的蛋白质(Mabuchi & Okuno 1977; Tjian et al. 1978)和病毒 DNA(Anderson et al. 1980; Capecchi 1980)。人们采用同样的方法,利用微注射把 DNA 转移到受精卵中,很快就有人报道克隆基因在鼠体细胞中得到了表达(Gordon et al. 1980)。不久,人们把重组基因稳定地引入到鼠生殖细胞系(Brinster et al. 1981; Wagner et al. 1981)。从此以后,微注射成为转基因动物研究的常规方法,广泛地应用于使用活细胞的研究中,如基因表达、信号转导或细胞骨架研究等。

微注射可以实现两个细胞内的主要组分——细胞核和细胞质直接接触。所以微注射技术可以用于只涉及到单个细胞的实验,可以精确地改变单个细胞或两个细胞的内环境。更重要的是可以通过改变培养环境,对受体细胞进行各种处理。表 1.1 中列出了微注射中所有的变量,并附有相应的例子。像表中所叙述的那样,可以采用不同的变量组成许多种策略,如注射样品、细胞内的目标组分(包括细胞质、细胞核或两者都有)、单一或多个注射、特殊的细胞处理(微注射前或注射后),以及不同的分析技术。

要设计出合适的微注射实验需要认真考虑到该技术的优点与不足,下面列出微注射的一些主要优点。

- 可用于不同类型的细胞,包括已经建起的细胞系或原代培养物,微注射对使用后者的实验特别有利,因为这样的细胞一般比较难培养,对培养基的变化特别敏感。原代培养物在培养基中只能成活几天或几周(例如神经元),或者只能传几代(例如成纤维细

* corresponding author: phone: +49-6221-548 321, fax: +49-6221-548 301, e-mail: angel.cid-arregui@urz.uni-heidelberg.de

¹ Dept. of Neurobiology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, D-69120-Heidelberg, Germany

² Department of Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510, Mexico City, Mexico

³ European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69012 Heidelberg, Germany

APÉNDICE 3

—Sólo venimos a dormir,
sólo venimos a soñar.
No es verdad, no es verdad,
que venimos a vivir en la tierra”.
Poesía Náhuatl

—¿Sólo así he de irme?
¿Como las flores que perecieron?
¿Nada quedará en mi nombre?
¿Nada de mi fama aquí en la tierra?
¡Al menos flores, al menos cantos!”
Cantos de Huexotzingo

MEDIOS Y SOLUCIONES

MEDIOS Y SOLUCIONES

Agua con DEPC (diethyl pyrocarbonate)

1 μ l de DEPC / ml de H₂O

Dejar toda la noche a temperatura ambiente e inactivar por autoclave.

Amortiguador de carga para RNA (Loading buffer-RNA [LBR]) 1.25X

	Para 4 ml
Formamida (desionizada)	2.2 ml
Formaldehído	0.8 ml
MAE 10X	0.5 ml
Glicerol 80%	0.4 ml
Bromofenol azul 2%	0.1 ml

Amortiguador de electroforesis

MAE 10X	100 ml
Formaldehído	30 ml
Agua	a 1 litro

Amortiguador de fosfatos

60 mM	Na ₂ HPO ₄
40 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂

Ajustar pH = 7. Se guarda a 4 °C, sin filtrar.

ELT (EDTA-lysozyme-triton)

100 mM	EDTA pH = 8.0
2 mg/ml	Lisozima
0.1%	Tritón 100X

HeBS (HEPES-buffered saline)

137 mM	NaCl
5 mM	KCl
0.7 mM	Na ₂ HPO ₄
6 mM	D-glucosa
20 mM	HEPES

Preparar 100 ml. Ajustar pH a 7.05 con NaOH 2 M. Filtrar con membrana de 0.22 μ m. Se mantiene la solución en uso a 4 °C.

Líquido de centelleo

Crystal Fluor (98% PPO [2,5-Diphenyloxazole] y 2% Bis-MSB [p-bis-(o-methylstyryl)-benzene])
5 g en un litro de tolueno

MAE 10X (MOPS-acetate-EDTA)

0.2 M MOPS
50 mM Acetato de sodio
10 mM EDTA pH = 8
pH = 7 con NaOH y se esteriliza por filtración
(protegido de la luz se mantiene a 4 °C; se usa agua tratada con DEPC)

Medio LB (Luria-Bertani)

Para 1 litro:
Bacto-triptona o
Peptona de caseína 10 g
Bacto-levadura 5 g
NaCl 10 g
NaOH 10 M 300 µl
Esterilizar con autoclave

Medio SOB

Para 1 litro:
Bactotriptona 20 g
Extracto de levadura 5 g
NaCl 0.5 g
Ajustar pH a 7.5 con KOH
Esterilizar por autoclave

Medio SOC

SOB + 1/50 v de glucosa al 20% + 1/100 v de MgSO₄ 1 M (los dos últimos estériles por filtración)

PBS (Phosphate-buffered saline)

137 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
2 mM KH₂PO₄
Esterilizar con membrana de 0.22 µm. Guardar a 4 °C.

Solución de PEG (polyethylene glycol)

Polietilenglicol 6000-8000 20%
NaCl 1 M
Tris 1 M pH = 8.0 5 ml para 500 ml
EDTA 0.5 M pH = 8.0 1 ml para 500 ml

Solución de prehibridación

	Para 1 ml
Formamida desionizada	0.5 ml
SSC 20X	0.25 ml
Solución de Denhardt 100X	15 µl
HEPES 0.5 M pH = 7.4 (filtrado)	100 µl
DNA de esperma de salmón	
[5 mg/ml], desnaturalizado	25 µl
SDS 10% (al final)	10 µl
Agua desionizada	100 µl

Solución RF1

30 mM	Acetato de potasio
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15%	Glicerol
pH = 5.8 con 0.2 M CH ₃ COOH	

Solución RF2

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15%	Glicerol
pH = 6.5 con KOH	

SSC (Saline-sodium citrate buffer) 20X

NaCl	175.3 g
Ácido cítrico (sal de trisodio, dihidrato)	88.2 g
Agua	a 1 litro
pH = 7.0 con NaOH 10 N y se esteriliza en autoclave.	

TAE (Tris-acetate-EDTA) 50X

	(Por litro)
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH = 8.0)	100 ml

TBE (Tris-borate-EDTA) 10X

Tris Sigma 7-9	108 g
H ₃ BO ₃	55 g
EDTA (tetrasodio)	9.3 g
pH = 8.45 sin ajustar, se lleva a 1 litro y se filtra con membrana de 0.45 µm.	
Nota: se deben disolver 1 por 1. Se empieza a precipitar en pocos días.	

TD (Tris-Dulbecco)

Para 2 litros:

NaCl 16 g

KCl 0.75 g

Na₂HPO₄ (anhidro) 0.2 g

Tris-Base 6 g

Ajustar pH a 7.45 con HCl. Esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 min.

TE (Tris-EDTA)

10 mM Tris-HCl ultrapuro

1 mM EDTA

Ajustar con HCl a pH = 8.0

Filtrar con membrana de 0.45 µm.

TESS (Tris-EDTA-sodium chloride-SDS)

50 mM Tris pH = 8

100 mM EDTA

100 mM NaCl

1% SDS (al final)

Tripsina

Por litro:

Tripsina 0.5 g

NaCl 8 g

KCl 0.4 g

D-glucosa 1 g

NaHCO₃ 0.58 g

EDTA 0.2 g

Esterilizar con membrana de 0.22 µm estéril y guardar a -20 °C en alícuotas y a 4 °C para su uso.

Tris-glicerol-DTT

250 mM Tris

15% Glicerol

5 mM DTT (en fresco)

TS (Tris-sucrose)

50 mM Tris pH = 7.5

25% Sacarosa

Nota: Las soluciones que se utilizan para el pasaje y transfección de células se esterilizan en campana de flujo laminar.

GLOSARIO

Ácido retinoico (RA). Producto del metabolismo oxidativo irreversible del retinal y éste de la vitamina A (retinol), la cual es derivada de carotenoides de plantas.

Retinol $\leftrightarrow$ Retinal $\rightarrow$ Ácido retinoico.

RA todo *trans* (tretinoína), RA 13-*cis* (isotretinoína) y RA 9-*cis* son estereoisómeros naturales del RA y tienen altas afinidades por los RARs α , β y γ ; 9-*cis*-RA y 13-*cis*-RA además interactúan eficientemente con RXRs. El RA es reconocido como el retinoide activo en la diferenciación y el mantenimiento del tejido epitelial. (Ver también Retinoides).

Activador. Proteína que se une a secuencias *enhancer* activando genes específicos.

Adenocarcinoma. (Del gr. *ἀδὴν, ἀδένο*, glándula). Carcinoma de origen glandular.

Agonista y antagonista. Un agonista es un compuesto que se fija a un receptor y transmite dicho enlace en una respuesta a la hormona. Todas las principales hormonas conocidas son agonistas completos. El enlace de un antagonista impide el enlace del agonista y, en consecuencia, evita las acciones de éste. Los antagonistas parciales son compuestos que llevan a una respuesta menor de la correspondiente a un antagonista total.

Cáncer. (Del lat. *cancer*, cangrejo). Conjunto de enfermedades en que la célula ha escapado de las señales de control que regulan su crecimiento y división, produciendo clonas que invaden otros tejidos e interfieren con sus actividades.

Cáncer cérvico-uterino. Carcinoma que surge en el interior del istmo formado entre la vagina y el útero.

Carcinoma. (Del gr. *καρκίνωμα*, carcinoma, de *καρκίος*, cangrejo y *ωμα*, tumor). Tumor maligno derivado del tejido epitelial.

Carcinoma adenoesquamoso. Combinación de escamoso y adenocarcinoma.

Carcinoma *in situ*. Estadio premaligno anterior inmediato al carcinoma invasivo. Es un epitelio en el cual no hay diferenciación. Incluido en la NIC III.

Ciclo del estro, llamado también **ciclo estral o estrual**. Ciclo rítmico en la mayoría de las especies mamíferas no homínidas, y que dura de 5 a 60 días (4 días en murino) en las hembras sexualmente maduras cuando no hay embarazo. Puede ocurrir durante todo el año (especies poliéstricas) o sólo en la época de apareamiento (especies monoéstricas). El fenómeno central es el estro. El ciclo está regido por interacciones endocrinas que involucran el hipotálamo, la pituitaria y los ovarios.

Descrito primero por Heape en 1900 el ciclo del estro se divide en fases: (1) Proestro. Comienzo de la fase folicular (proliferativa) del ciclo. Los folículos de De Graaf se desarrollan en el ovario y secretan estradiol, que hace proliferar y engrosar el revestimiento uterino. (2) Estro. El período durante el cual el deseo sexual y la atracción de la hembra están avivados, dirigiendo a la cópula. Se conoce también como celo o "calentura". Hay ovulación, estimulada por una mayor secreción de hormona luteinizante (LH) desde la hipófisis. Fin de fase folicular. (3) Metaestro (o diestro-1). Comienzo de la fase luteínica (secretora). El folículo da origen a un cuerpo lúteo que secreta progesterona. La secreción del estradiol disminuye. Si el estro va seguido de fecundación, el ciclo se suspende en esta fase hasta el final del embarazo. (4) Diestro (o diestro-2). Fase de regresión. En ausencia de fecundación el cuerpo lúteo (dependiente de LH) y el endometrio disminuyen, los niveles de hormonas ováricas bajan y empieza a crecer un nuevo folículo. Fin de fase luteínica. Al acabarse el ciclo del estro o el embarazo, ocurre el proestro con un lento aumento del estradiol y la FSH, lo cual conduce al siguiente ciclo completo.

Diferentes tipos de células se observan en frotis vaginales de ratona. En proestro, donde el epitelio vaginal aumenta de espesor por proliferación de sus capas más profundas, se ven principalmente células epiteliales redondeadas con núcleos teñidos intensamente. En estro, con un epitelio engrosado e intensamente queratinizado, se encuentran casi exclusivamente escamas, planas y "cornificadas". En metaestro, cuando el epitelio se adelgaza considerablemente, hay gran número de leucocitos polimorfonucleares. En diestro el epitelio todavía es delgado y se ven unas cuantas células de diferentes tipos mezcladas con moco pegajoso.

El ciclo menstrual humano es un ciclo del estro modificado.

Coactivador. Estas proteínas integran señales de los activadores y transmiten los mensajes a los factores basales sin unión al DNA directamente, sino que son requeridos para la activación a través de interacciones proteína-proteína.

Coilocitosis. La coilocitosis es una característica diagnóstica confiable de la infección por papilomavirus en células de mucosa y es el efecto citopático de la expresión tardía. La célula escamosa muestra un colapso del núcleo y un espacio perinuclear prominente en el citoplasma.

Condiloma. Un papiloma. Condiloma acuminado es un término tradicionalmente aplicado a papilomas clínicamente obvios de piel o mucosa genitales. Condiloma plano fue un término acuñado para describir

infecciones cervicales que son invisibles a simple vista pero que aparecen como parches blancos después de ser lavadas con una solución de ácido acético al 5%. A pesar de estas diferencias macroscópicas las variantes acuminada y subclínica comparten la misma histología y son infecciosas.

Corticoide o corticosteroide. (Del lat. *cortex*, -*icis*, corteza). Hormona esteroide producida por la corteza suprarrenal. Los corticosteroides se clasifican en dos grupos principales: mineralocorticoides (v. gr. aldosterona) y glucocorticoides. Los corticosteroides naturales y sintéticos se utilizan ampliamente en el tratamiento de la insuficiencia renal, alergias y enfermedades inflamatorias.

Cross-coupling. Es la interacción de vías de regulación distintas. Por ejemplo: factores de crecimiento (AP1) pueden modular la acción de hormonas que inducen la diferenciación (RA). La interacción entre dos familias de factores de transcripción puede involucrar: (1) el control transcripcional de genes que codifican miembros de una familia por los productos de la segunda familia; (2) la interacción de productos de ambas familias para activar o reprimir sinérgicamente la expresión de un tercer gen; (3) competición o cooperación entre productos de las dos familias por un elemento de respuesta común o sobrelapado.

Displasia. (Del gr. *δσζ*-, anomalía, y un derivado de *πλάζις*, formación). Epitelio premaligno anterior al carcinoma *in situ* caracterizado por diferenciación desordenada de las células inferiores pero todavía con maduración en la superficie. En base a la proporción del epitelio afectado se le divide en leve, moderada o severa. (Actualmente las displasias cervicales están comprendidas en el Sistema Bethesda o en el de la neoplasia intraepitelial cervical –ver más abajo—).

Elemento de respuesta a hormona (HRE). Subfragmento de DNA que causa la respuesta en la expresión transcripcional a una hormona.

Enhancer. Elemento regulador, reconocido por un activador, que estimula la transcripción. Estas secuencias pueden encontrarse a miles de nucleótidos antes o después del promotor.

Epitelio escamoso estratificado. Epitelio estratificado –de dos o más células de espesor– compuesto por células superficiales planas y delgadas (escamosas) y por células poliédricas (de varias caras) inmediatamente encima de cúbicas o columnares. Esta membrana puede resistir mucho mejor al frotamiento que las membranas simples.

Epiteliotrópico. Con afinidad por epitelios.

Esteroides. (De esterol y del gr. -*εἶδος*, forma; parecido al esterol). Miembro de un grupo de compuestos biológicamente diversos pero químicamente similares, de estructura cíclica básica compleja (ciclopentanoperhidrofenantreno) (Figura 3A). El hidrocarburo tiene 17 átomos de carbono que se encuentran en un sistema de anillos, 3 con 6 miembros (A, B, C) y uno con 5 miembros (D). Algunos ejemplos son las hormonas corticoides, las hormonas sexuales (progesterona, andrógenos y estrógenos), los ácidos biliares y los esteroides (como el colesterol). Son sintetizados a partir del acetil coenzima A y luego colesterol. Los procesos biosintéticos que van del colesterol a la pregnenolona son comunes a todas las hormonas esteroideas.

Esterol. (Del gr. *ζηρεός*, sólido, y -*ol*, sufijo que denota un alcohol). Esteroide con largas cadenas alifáticas laterales (8-10 carbonos en C₁₇) y por lo menos un grupo oxidrilo en C₃ (ubicar en Figura 3A). Son solubles en los lípidos y se presentan frecuentemente en las membranas (v. gr. colesterol y ergosterol).

Estradiol. (Estr(us) + di-, dos, + -*ol*, alcohol). El más activo de los estrógenos producidos por el cuerpo.

Estro. (Del lat. *oestrus* y éste del gr. *οἰζηρος*, tábano, aguijón, frenesí. Se utilizaba para describir el comportamiento errático y nervioso de la vaca cuando era atacada por dichos animales.) Celo o “ealadura”. Período durante el cual la hembra es receptiva y atractiva para el macho y en el cual ocurre la ovulación y la copulación. En las hembras hay una conducta nerviosa y quisquillosa característica. (Ver Ciclo del estro).

Estrógeno. (De *estro* y del gr. -*γεν*, generar, producir). Hormona sexual femenina (un esteroide) que interviene en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias (v. gr. crecimiento de los senos). Es la hormona productora del estro (de ahí su nombre). Durante el ciclo menstrual el estrógeno, actuando sobre los órganos sexuales femeninos, produce un medio propicio para la fecundación del óvulo y la implantación y el crecimiento del embrión. En los anticonceptivos orales, el progestágeno y estrógeno sintético actúan para impedir la ovulación y liberación de gonadotropinas (v. gr. hormona estimulante del folículo). El estrógeno sanguíneo en niveles excesivos causa náuseas como las matinales, propias del embarazo. El ovario produce 3 estrógenos: estradiol, estriol y estrona. (Estas hormonas se producen en cuantías menores en la corteza suprarrenal, los testículos y la placenta).

La potencia estrógena del β-estradiol (E₂) es 12 veces > la estrona (E₁); y 80 veces > el estriol (E₃).

Factor de transcripción. Clase de proteínas que se unen a secuencias de DNA y regulan la transcripción. Los factores basales son esenciales para la transcripción pero no pueden incrementar o disminuir el ritmo. Otros pueden unirse a *enhancers* o silenciadores y se denominan activadores o represores, respectivamente; sirven

para controlar el ritmo de transcripción de la polimerasa de RNA, estimulando o reprimiendo. Los activadores se comunican con los factores basales a través de los coactivadores.

Glándula endócrina. (Del lat. *glandula*, diminutivo de *glans*, bellota; y del gr. ἐνδο, dentro y κρίνειν, separar). Una de las varias glándulas (hipófisis, adrenal, ovario, testículo, etc.) que vierten sus secreciones hormonales directamente en sangre.

Glucocorticoide. (Del gr. γλυκύς, dulce y del lat. *cortex*, corteza, y *-oide*, parecido). Tipo de hormona esteroide producida por la corteza suprarrenal. Involucrada en la resistencia a condiciones de estrés fisiológico interno (v. gr. ayuno). Los glucocorticoides inducen la síntesis de enzimas involucradas en gluconeogénesis (la formación de glucosa a partir de moléculas de grasa, proteínas y lactato). Además de regular el metabolismo de carbohidratos inhiben la formación de anticuerpos, la respuesta del organismo a la inflamación y causan la involución de componentes del sistema inmune, como bazo y timo. También activan parte del programa de diferenciación en la glándula mamaria. Su hiposecreción resulta en la enfermedad de Addison y la sobresecreción en el síndrome de Cushing.

Potencia de cortisol o hidrocortisona > corticosterona > cortisona. Se considera que la dexametasona tiene una potencia relativa 25-30 veces mayor respecto a la hidrocortisona.

Gonadotropina (hormona gonadotrópica o gonadotrófica). (Del gr. γονή, generación y προθός, que alimenta). Cualquiera de las hormonas (glicoproteínas) del lóbulo anterior de la hipófisis (pituitaria) que provoca la producción de hormonas sexuales y gametos (óvulos o espermatozoides) por las gónadas. Incluyen a la hormona estimulante del folículo y a la hormona luteinizante (u hormona estimulante de células intersticiales en machos). Su secreción es controlada por la hormona liberadora de gonadotropina, de origen hipotalámico. Se utilizan en el tratamiento de esterilidad femenina pero pueden producir embarazos múltiples si no tienen un control cuidadoso. La placenta produce la gonadotropina coriónica humana, que es la base de la mayoría de las pruebas de embarazo.

Hibridación tipo slot-blot. Método en el cual el DNA de cadena sencilla es fijado a la membrana sin una separación electroforética previa. Otra cadena, la sonda, es marcada radiactivamente para posteriormente aparearse con su complementaria y formar un dúplex.

Hormona. (Del inglés *hormone*, del gr. ὁρμῶν, excitante, y éste de ὁρμάω, excitar, mover. Definición por Ernest Starling a principios del siglo XX). Mensajero químico liberado por alguna glándula endócrina y transportado por la sangre hasta un órgano específico (blanco) donde actúa para controlar el crecimiento, el metabolismo, la reproducción sexual y otros procesos orgánicos, por lo que son reguladores celulares importantes. Las hormonas pueden ser esteroides, polipéptidos o aminos. Son reconocidas por receptores en las células de los órganos blanco. Estos receptores suelen ser proteínas localizadas en la membrana (v. gr. para la insulina, el glucagón o la adrenalina, actuando a través de un segundo mensajero) o en el citoplasma (v. gr. para los estrógenos y la progesterona). Las hormonas ejercen su efecto sobre las enzimas o el ADN.

Ciertas células son especialmente responsivas, generalmente las que contienen un nivel elevado del receptor. Por ejemplo, las hormonas esteroides gonadales controlan el crecimiento, diferenciación y función de tejidos reproductivos: estrógenos y progestinas en la hembra (útero, vagina [en lat. = vaina], oviducto, glándula mamaria); y andrógenos en el macho (próstata, vesículas seminales, pene, cresta en el gallo). También influyen sobre muchos otros tejidos, como piel, pelo, hueso, pituitaria, hipotálamo y centros de comportamiento en el cerebro.

Hormonas esteroides. Este grupo está conformado por los mineralocorticoides, glucocorticoides y esteroides sexuales. Las acciones biológicas de las hormonas esteroides en tejidos blanco son mediadas por receptores intracelulares.

Incidencia. El número de casos nuevos de la enfermedad que surgen en un período dado en una población específica.

Inmortalización. El crecimiento continuo de células mantenidas en cultivo de tejidos (+ de 50 pasajes). Las células con esta capacidad proliferativa indefinida se llaman establecidas y la progenie derivada forma una línea celular.

Los queratinocitos humanos inmortalizados por DNA de VPH-18 transfectado exhiben características alteradas de proliferación celular. Un fenotipo acompañante es la resistencia a la diferenciación inducida por factores en el suero, calcio o TPA, lo que indica su naturaleza parcialmente transformada.

Lesión intraepitelial cervical. Ver Neoplasia intraepitelial cervical.

Maligno. Del tipo cancerosos y que evoluciona desfavorablemente.

Mortalidad. El número de muertes que ocurren en un período dado en una población específica.

Neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Lesión precursora del cáncer cérvico-uterino. Se divide en NIC I, NIC II y NIC III, que representan un continuo biológico y son estadios de la misma enfermedad. Desde 1988

la nomenclatura del Sistema Bethesda involucró a la lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) que cubre NIC I (corresponde a displasia leve), coilocitosis y condiloma plano, mientras que la lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL) cubre NIC II (que equivale a displasia moderada) y NIC III (incluye displasia severa y carcinoma *in situ*).

Oncogenes. (Del gr. *όγκος*, tumor y *γένεσις*, generación). Genes cuyos productos (oncoproteínas) tienen la habilidad de transformar células eucariontes haciéndolas crecer en una manera análoga a células cancerosas.

Papiloma. (De *papila* y *-oma*, tumor). Tumor epitelial benigno (no canceroso) generalmente pequeño, de estructura lobulada y con endurecimiento de la dermis subyacente.

Prevalencia. La prevalencia es la proporción de casos en una población dada en un punto específico en el tiempo. Depende de la incidencia y de la duración de la enfermedad, esto es, de la supervivencia. Se calcula dividiendo el número de casos entre la población total (incluyendo a quienes padecen la enfermedad). Su valor oscila entre 0 y 1, o se puede expresar como porcentaje.

Progesterona. (*πρό*, a favor de, + lat. *gestare*, llevar, + (es)ter(ol) + *-ona*, terminación para cetonas). Hormona esteroide secretada por el cuerpo lúteo del ovario después de la ovulación y en pequeñas cantidades por las glándulas suprarrenales. Durante el embarazo es también producida por la placenta. Es la hormona responsable del sostenimiento del embarazo. Además, evita que más óvulos sean liberados por los ovarios y estimula los tejidos mamarios.

La progesterona es el progestágeno más activo que se encuentra en forma natural y es producida en muchas especies en cantidades mayores que cualquier otro esteroide ovárico.

Progestágeno. Cualquier sustancia con efectos semejantes a los de la progesterona. Los hay que son sintetizados y usados en anticoncepción, tratamiento de síndrome premenstrual o amenaza de aborto.

Proliferación. Crecimiento por división celular activa.

Promotor. Región de un gen que tiene las señales para la unión de la polimerasa de RNA. En el caso de promotores reconocidos por la polimerasa de RNA II aproximadamente a -25 o -30 pb se encuentra la caja TATA, sitio de la TBP.

Protooncogene. Gen normal, habitualmente relacionado con la regulación de la proliferación celular, que mediante mutación puede ser transformado en un oncogén, inductor de cáncer.

Quenching. Represión de un activador por un represor al interferir con su habilidad para interactuar productivamente con la maquinaria transcripcional; diferente de represión competitiva, represión directa o *squelching*. Ocurre cuando un represor se une a un sitio distinto del de un activador y evita que el activador, el cual permanece unido a su sitio, haga contacto adecuado con el complejo de transcripción. El proceso podría ocurrir por (i) interacción inhibitoria directa o indirecta del receptor de progesterona con el de estrógenos, (ii) reclutamiento de un factor inhibitorio o (iii) inactivación de un componente de la vía de señalización del receptor de estrógenos, como sería un factor intermediario transcripcional. Por ejemplo, estudios sugieren que el receptor de progesterona unido a su ligando reprime la actividad del receptor de estrógenos a través de este mecanismo.

Receptores nucleares. Superfamilia que comprende a factores de transcripción que son inducibles por el ligando. Incluyen receptores de hormonas esteroideas, tiroideas, ácido retinoico y vitamina D₃.

Represión competitiva. Ocurre cuando el acceso de un factor de transcripción a su sitio de unión es bloqueado por un represor, el cual se une a un sitio sobrelapado.

Represión directa. Ocurre cuando un represor se une a un sitio definido en el promotor e interfiere con la formación o actividad del complejo de transcripción general.

Retinoides. El término es usado genéricamente para cualquier compuesto natural o sintético con actividad de vitamina A. (Ver Ácido retinoico).

Químicamente, los retinoides naturales son terpenoides derivados de un compuesto parental monocíclico (grupo trimetilciclohexenil) conjugado a una cadena lateral insaturada con 4 enlaces dobles carbón-carbón y un grupo polar en el término de su porción acíclica, resultando en moléculas hidrofóbicas (ver Figura 3A). El retinol, el retinal (retineno) y el ácido retinoico son retinoides de importancia biológica.

Los retinoides regulan redes genéticas complejas involucradas en diferenciación celular (induciéndola), proliferación (inhibiéndola), expresión de oncogenes (suprimiéndola), angiogénesis (inhibiéndola) y apoptosis. Son esenciales para el desarrollo de estructuras embrionarias como los primordios de miembros.

Senescencia. Deterioro progresivo de funciones de la célula. En cultivos se define como el cese del crecimiento de la población celular y generalmente se manifiesta por la aparición de células grandes y pleomórficas.

Squelching. Interferencia transcripcional. La idea detrás de este mecanismo es que la interacción entre un factor de transcripción y otra proteína reguladora puede ocurrir fuera del DNA. Así, un activador presente a

concentraciones altas puede secuestrar a la proteína y de aquí, inhibir la expresión de genes que requieren el mismo factor. Puede darse por sobreexpresión *in vivo* o enriquecimiento *in vitro* del factor de transcripción. Por ejemplo, el receptor de progesterona y el receptor de glucocorticoides inhiben la activación de la transcripción por el receptor a estrógenos de un gen reportero que carece de sitios de unión a progesterona y glucocorticoides.

Transformación. Describe la falla en el crecimiento celular normal. En células transfectadas con DNA de VPH las pruebas incluyen ser defectivas al estímulo a la diferenciación terminal y estratificación, así como el crecimiento independiente de anclaje (dando lugar a colonias en agar suave) y de suero. Sin embargo, el proceso no siempre involucra alteraciones morfológicas. Otra característica de células transformadas es que pierden la inhibición por contacto (la formación de una monocapa confluyente, que resulta en células arrestadas en un estado G₀) y se apilan una sobre otra, formando focos. Un último paso del estado transformado es la inducción de tumores en ratones desnudos atímicos (tumorigenicidad).

2. Introducción de DNA exógeno en una bacteria.

Transgénico. Organismo cuyo genoma ha sido alterado por la introducción de un gen foráneo, el cual es transmitido a la progenie.

Tumor o neoplasia. (Del latín *tumor*, hinchazón). Crecimiento que resulta de la multiplicación de células en algún tejido del cuerpo; la masa anormal puede ser benigna o maligna (cáncer, si hay metástasis).

Virus del papiloma. Virus de DNA que tienen la capacidad de inducir hiperproliferación epitelial provocando lesiones benignas, premalignas y malignas de los epitelios cutáneos y mucosos. Han sido aislados de una gran variedad de vertebrados incluyendo tortugas, marsupiales, erizos, mapaches, murciélagos, jabalíes, bovinos, ovejas, cabras, conejos, venados, caballos, roedores, felinos, perros, osos, cetáceos, aves y primates como el hombre. Fuerte especificidad para diferentes sitios anatómicos y para diferentes tipos de lesiones características.

Virus del papiloma humano. Virus responsables de una variedad de lesiones proliferativas (tumores) benignas de la piel y el epitelio mucoso, tal como las verrugas y los condilomas anogenitales. Un subgrupo de estos virus está asociado con lesiones que pueden progresar a carcinomas. Las células basales del epitelio representan las células diana primarias para el virus.

EPÍLOGO

Y finalmente, cuando los factores externos e internos al hombre terminen con su existencia y éste haya logrado con su empeño terminar con lo mejor de este planeta, como al parecer se lo ha propuesto, los organismos que llamamos inferiores sobrevivirán para repoblar un mundo mejor.

N.M.P.

“La Tierra es insultada y ofrece sus flores como respuesta.”

Rabindranath Tagore

“Te he de decir esto; escucha y entérate bien. De todo lo que respira y se arrastra sobre la tierra y ella misma nutre, nada hay más miserable que el hombre.”

Homero, *La Odisea*

