

11261 19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EXPRESION DE LOS GENES RB Y c-myc EN TEJIDOS CON NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL GRADO I POSITIVAS PARA VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO ONCOGENICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (BIOQUIMICA).

P R E S E N T A : BIOLOGA LUCIA GUADALUPE TAJA CHAYEB

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El trabajo experimental de ésta Tesis se realizó en los Laboratorios de la División del Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, SSA.

**DEDICO ESTE TRABAJO CON
TODO MI AMOR Y CARÍÑO:**

A MIS PADRES:

Esther y José Luis, a quienes debo todo lo que soy y seré. Sin su amor, confianza, comprensión y apoyo incondicional no hubiera logrado nada de lo que he hecho.

A MIS HERMANOS:

Esther y José Luis, por ayudarme y apoyarme en la medida que pudieron.

A MAURICIO:

Por apoyarme y guiarme en la realización de este trabajo así como en mi desarrollo profesional.

A TODOS MIS AMIGOS:

Por su amistad incondicional.

AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL JURADO
POR LA REVISION DE ESTE TRABAJO Y POR
SUS ACERTADOS COMENTARIOS :

Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Dr. Alejandro García Carrancá

Dr. Jaime Berumen Campos

Dra. Patricia Ostrosky Shejet

Dra. Teresa Tussie

AGRADEZCO MUY ESPECIALMENTE:

A MAURICIO:

Gracias a las enseñanzas y consejos he podido terminar este trabajo y lograr ahora el Título de Maestro en Ciencias. Gracias por estos años de amistad y apoyo académico.

A las autoridades del INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA por permitirme realizar mi trabajo de Tesis en sus instalaciones.

Al Departamento de Patología del INCan y en particular al Dr. Ricardo Delgado Chávez, por facilitarme el material biológico para la realización del presente trabajo, así como por el análisis histopatológico del mismo.

INDICE

	Página
I. Resumen	1
Abstract	2
II. Antecedentes	
a. Neoplasias del Cuello Uterino	3
b. Virus del Papiloma Humano (HPV)	4
c. Alteraciones genéticas en Neoplasias Cervicales	6
d. Proto-oncogen <i>c-myc</i>	7
e. Gen supresor RB	9
f. Interacción <i>c-myc</i> - RB - E7 (HPV)	11
III. Planteamiento del Problema	12
IV. Hipótesis y Objetivos	12
V. Materiales y Métodos	
a. Material Biológico	13
b. Inmunohistoquímica	13

c. Hibridación in Situ	15
d. Reacción en Cadena de la Polimerasa	17
VI. Resultados	18
Cuadros y Figuras	21
VII. Discusión	35
VIII. Conclusiones	41
IX. Referencias Bibliográficas	42
X. Anexo 1	50

1. RESUMEN

Se han asociado diversos factores etiológicos a las neoplasias del cuello uterino; uno de los más importantes es sin duda el virus del papiloma humano (HPV). Al igual, como en otras neoplasias, participan diversos factores entre los que podemos nombrar las alteraciones genéticas. En el caso del Cáncer Invasor del cérvix pueden encontrarse diversas alteraciones genéticas, algunas de las cuales involucran proto-oncogenes (*c-myc*) y genes supresores de tumor (*p53* y *RB*). A la fecha, son pocos los trabajos que reportan las alteraciones que pueden encontrarse en lesiones pre-invasoras del cérvix (Neoplasia Intraepitelial Cervical o NIC).

En el presente trabajo se propuso analizar la expresión de los genes celulares *c-myc* y *RB* en tejidos con lesión tipo NIC de grado I y muestras de tejido cervical normal, considerando el hecho de que se han reportado alteraciones de estos genes en lesiones invasoras del cervix. En cada muestra se analizó la presencia de proteína y transcrito de cada uno de estos genes, mediante las técnicas de Inmunohistoquímica e Hibridación *In Situ* respectivamente y se determinó la presencia y tipo de HPV. Se presentó mayor cantidad de proteína en las lesiones NIC I que en los tejidos de cérvix normal, tanto para *myc* como para *RB*, sin embargo en el análisis de Hibridación *In Situ*, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de transcritos, de modo que las diferencias que se observan en cantidad de proteína se deben probablemente, a una acumulación de proteína y no a un aumento en la tasa transcripcional del gen. De manera interesante se presentó una mayor expresión de proteína *Rb* que de proteína *myc*. Nuestros resultados sugieren que *RB* puede ejercer un control sobre la expresión *in vivo* del gen *c-myc* y que, la presencia aumentada de proteína *Rb* en tejidos con NIC pudiera ser tomada como un marcador de la presencia de células neoplásicas. Debido a que todas las muestras analizadas presentaron HPV oncogénicos (tipos 16 ó 18), es evidente que adicional a la presencia del virus, existen alteraciones, en particular acumulación de proteína de los genes celulares *c-myc* y *RB*, las cuales podrían estar relacionadas con el desarrollo temprano de las lesiones del cérvix.

ABSTRACT

Several etiological factors have been associated to uterine-cervix neoplasia; one of the most important factors are the human papillomaviruses (HPV). It is known that cancer is a multifactorial disease, so different genetic alterations are also important in its development. In cervical cancer, there have been reported alterations of proto-oncogenes (*c-myc*) and tumor suppressor genes (p53 and RB). However, little is known about genetic alterations involved in the preinvasive lesions (like CIN I).

In the present work we analyzed the expression of *c-myc* and RB genes in CIN grade I and normal cervix samples, because of the fact that alterations on these genes have been reported in invasive cancer of the cervix. We analyzed the presence of protein and transcript from these genes, through Immunohistochemistry and In Situ Hybridization techniques respectively, as well as the presence and HPV type. We found an overexpression of both proteins in CIN I tissues comparing with normal cervical samples. However, we found not significative differences by In Situ hybridization, so it suggests that the differences in protein expression are due to a protein accumulation but not to an increased transcriptional rate. Interestingly a greater Rb protein expression than myc protein expression was found; our results suggest that RB can exert a control over the *c-myc* gene expression *in vivo*, and that the accumulation of RB protein could be considered as a marker of the presence of neoplastic cells. As all CIN I samples analyzed were HPV positive, showing oncogenic types (HPV types 16 or 18), it seems that besides the presence of HPV there could exist cellular alterations, in particular the accumulation of myc and RB proteins, which could be related to the early development of a cervical lesion.

III. ANTECEDENTES

3.1. NEOPLASIAS DEL CUELLO UTERINO

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es un importante problema de salud nacional en México ya que constituye la neoplasia ginecológica más frecuente y es una de las principales causas de muerte por cáncer en el país (1). El CaCU es una neoplasia que histogenéticamente se va desarrollando a través de un continuo de alteraciones que van desde Condiloma, Neoplasia Intraepitelial Cervical hasta llegar al Carcinoma Invasor. La Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) es una lesión que involucra el epitelio escamoso del exocérvix y a veces áreas de metaplasia escamosa del endocérvix y la cual es considerada como una lesión precursora del cáncer invasor. Las células displásicas son grandes, irregulares e hiper cromáticas. Estas lesiones se gradúan en ligeras, moderadas y severas (o de grado I, II y III respectivamente) de acuerdo al grado de anomalías que se observan en el epitelio. Anteriormente se les denominaba Displasias Cervicales, después NIC y ahora se les denomina Lesiones Escamosas Intraepiteliales (L.EI) (2). En el presente trabajo se utilizó la nomenclatura de NIC. A diferencia de las lesiones preinvasoras el Carcinoma Invasor es aquella lesión que penetra al estroma subyacente al epitelio, rompiendo la membrana basal; se caracteriza porque sus células presentan diferentes tamaños, al igual que los núcleos, con mitosis anormales e invasión desordenada del estroma por el epitelio; las células muestran diferentes grados de madurez (2).

De entre los múltiples factores epidemiológicos que se han asociado al desarrollo de esta neoplasia se encuentra: el tener múltiples parejas sexuales, inicio de vida sexual activa a edad temprana, multiparidad, abortos numerosos, enfermedades sexuales transmisibles, el uso de anticonceptivos y de cigarro(3-6). En los últimos años se ha dado un gran importancia al papel que puede tener en el desarrollo de esta neoplasia algunos tipos del Virus del Papiloma Humano (HPV) (7) y elementos celulares como los denominados genes supresores del tumor y oncogenes. Así mismo se ha reportado que el sistema inmune tiene un papel muy importante en el desarrollo de las lesiones cervicales. Se ha encontrado que en mujeres con inmunodeficiencias celulares (por ejemplo SIDA), existe un mayor riesgo de desarrollar este tipo de lesiones (asociadas a HPV) y que progresen a lesiones de alto riesgo (NIC III y CaCU) (8).

b. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV)

Los **HPVs** son pequeños virus de DNA epiteliotrópicos de la familia Papovaviridae que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Pueden infectar epitelios secos (piel) o mucosos (genitales, laringe etc.) y producir tumores benignos cutáneos y mucosos en sus hospederos naturales (9). La nomenclatura de estos virus en tipos y subtipos se basa en la homología de sus secuencias polinucleotídicas (10). El genoma viral se divide en tres regiones principales: una región de control de la replicación y transcripción del genoma viral, denominada LCR; una región tardía que codifica para las proteínas de cápside, constituida por los genes L1 y L2; y una región temprana constituida por los genes E1, E2 y E4 a E7 los cuales codifican para las proteínas involucradas en la replicación del DNA, transcripción viral y transformación celular (11,12). Al parecer, estos virus pueden participar en la tumorigénesis a través de diversos mecanismos los cuales siguen siendo caracterizados actualmente y que incluyen la inactivación de genes supresores y aparentemente la activación de oncogenes (13-15).

Actualmente se conocen más de 70 tipos de HPV, de los cuales aproximadamente 35 están relacionados con lesiones anogenitales. Se ha reportado que el porcentaje promedio de HPV en el CaCU en diferentes zonas geográficas (África, Sur y Centro-América, Sureste de Asia, Norte-América y Europa) es del 93% con un rango que va desde el 75 % al 100%, siendo el HPV-16 el de mayor prevalencia encontrándose en el 50% de las muestras, seguido por los tipos 18 en el 14%, el 45 en el 8% y el HPV-31 en el 5% (16).

Existe evidencia que mujeres con lesiones de bajo grado del cervix (NIC I) tienen un riesgo mayor de presentar lesiones de alto grado, que aquellas que no las han tenido (17). Estas lesiones se asocian prácticamente a los mismos factores de riesgo que el CaCU incluyendo de manera importante la infección por HPV (4,18, 19). Se ha reportado que hasta un 76-80% de casos de NIC (de grado I a III) presentan infección por HPV (10-21). Para el caso de los NIC I se ha reportado asociación con una gama mayor de HPVs (incluyendo los de bajo riesgo), mientras que para los NIC II y III se ha encontrado asociación con un grupo más reducido de HPVs (particularmente con los de alto riesgo) (22). Se ha encontrado que el HPV-16 es el tipo de mayor prevalencia en las lesiones anogenitales; para el caso de los NIC se ha reportado su presencia en un 55% de los NIC I, 66% de NIC II y 70-85% de NIC III; en estos casos de NIC con HPV-16 este se encontraba en forma libre o episomal (23,24).

Algunas de las evidencias más fuertes que apoyan al HPV con un papel etiológico en esta neoplasia son (18, 25-27):

a) en ensayos *in vitro* son capaces de transformar morfológicamente células de rata y ratón así como líneas celulares humanas,

b) en un elevado porcentaje de tumores cervicales humanos se encuentra el DNA de los HPVs, así como los transcritos de los genes que codifica,

c) en líneas celulares derivadas de tumores humanos tales como HeLa, SiHa y Caski entre otras, se encuentra el DNA de HPV integrado al genoma celular; además el genoma viral es transcripcionalmente activo.

d) las oncoproteínas virales E6 y E7 son capaces de inactivar los productos de los genes supresores p53 y RB respectivamente (28,29).

Se ha encontrado una asociación específica entre los diferentes tipos de HPV con lesiones benignas o malignas, sugiriendo que el tipo de HPV es importante para la transformación maligna. Se ha reportado que los tipos 6 y 11 de HPV se encuentran conunmente en la lesión denominada Condiloma (lesión benigna), mientras que los tipos 16 y 18 de HPV se encuentran frecuentemente en lesiones malignas (CaCU). De esta manera los HPV-6 y 11 son considerados de bajo riesgo que se encuentran en lesiones que raramente progresan a una lesión maligna, mientras que los HPV-16 y 18 poseen un potencial oncogénico alto y se encuentran en lesiones malignas, por lo que se los considera de alto riesgo (30). Por otro lado se ha encontrado una asociación entre el tipo viral y el tipo histológico del tumor, encontrándose que el HPV-18 es más frecuente en los adenocarcinomas, mientras que el HPV-16 es más frecuente en los carcinomas epidermoides (12,31). Adicionalmente se ha reportado que aquellos tumores con HPV-18 presentan un comportamiento clínico más agresivo que los que tienen HPV-16 (32).

No se conoce del todo el o los mecanismos através de los cuales estos virus participan en el desarrollo del cáncer. Se ha postulado que algunos de éstos mecanismos pudieran ser:

i) Integración del genoma viral al genoma celular. El DNA de los HPVs es capaz de integrarse al genoma hospedero y ser transcripcionalmente activo. Esta integración trae como consecuencia que el genoma hospedero adquiera genes transformantes transcripcionalmente activos y que además la integración *per se*, ocasione alteraciones a genes celulares al romper un gen, o bien pudiendo integrarse cerca de un proto-oncogen causando su activación. Un ejemplo de éste último caso es el proto-oncogen *c-myc* (33-36). La integración del genoma viral involucra también la ruptura del genoma viral; aunque

no se tiene el sitio exacto de ruptura del genoma viral, se ha demostrado que esta ocurre predominantemente en la región de los genes E1/E2. Esta ruptura causa que ya no se exprese la proteína E2, la cual es un regulador negativo de la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7. Así pues al no haber proteína E2 debido a la integración, ocurre una expresión incontrolada (y elevada) de las oncoproteínas virales E6 y E7 (37).

La integración del genoma de HPV ocurre con mayor frecuencia en carcinomas invasores, mientras que en lesiones preinvasoras es frecuente encontrarlos en forma episomal. Esto sugiere que la integración puede ser importante en el desarrollo de una lesión invasora (13, 38).

III) Recientemente se ha demostrado que las oncoproteínas virales son capaces de unirse a proteínas celulares e inactivar su función o bien promover su degradación. Entre las proteínas celulares a las que se ha encontrado que se pueden unir a las oncoproteínas virales E6 y E7, se encuentran los productos de los genes supresores p53 y RB respectivamente, cuya función normal es controlar (negativamente) la replicación del genoma celular. En el caso de la proteína E6 ésta se une y promueve la degradación de la proteína p53, mientras que E7 se une a la proteína Rb inactivando su función la cual es evitar la progresión del ciclo celular (28,29). Esta unión se ha observado con otras oncoproteínas virales (por ejemplo, E1A de Adenovirus y antígeno T grande de SV40), por lo que se sugiere que la unión de oncoproteínas virales a una proteína que controla la proliferación celular sea un mecanismo común de transformación mediada por virus (39,40). Este mecanismo está estrechamente relacionado con el primero, ya que con la elevada producción de las oncoproteínas originada por la integración viral trae también como consecuencia que se inactive una mayor cantidad de proteínas supresoras.

④. ALTERACIONES GENÉTICAS EN NEOPLASIAS CERVICALES

Las neoplasias cervicales al igual que cualquier neoplasia es una patología multifactorial, de forma que adicionalmente a los factores epidemiológicos mencionados y la infección por HPV, se ha encontrado que pueden ocurrir diferentes alteraciones celulares como lo son la activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores, los cuales en su conjunto permiten o llevan a la transformación celular y el posterior desarrollo de la neoplasia (41).

Se ha reportado la presencia de diversas alteraciones genéticas en el CaCU.

Algunas de estas involucran la pérdida de heterocigocidad del cromosoma 3, en el locus del gen *raf-1* (3p25) y del locus D3S3 en 3p14 (41,42). Así mismo se ha reportado que en un porcentaje elevado de tumores invasores del cérvix, se ha perdido la expresión de los genes MHC clase I y en su lugar se expresan los genes MHC clase II (43). Algunos de los oncogenes que se han encontrado alterados (sobre-expresados) en este tipo de tumores son los genes *c-myc* (44,45), *c-Ha-ras* (45-47) y los oncogenes que codifican las oncoproteínas que funcionan como receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR y *c-erbB*) (46,49). Otro tipo de genes, los llamados genes supresores o antioncogenes, parecen tener también un papel importante en el desarrollo de este cáncer, en particular los genes *p53* y *RB* (50,51), de los cuales se discutirá su posible participación posteriormente. En cuanto a *p53* se ha reportado también la pérdida de heterocigocidad del cromosoma 17p en lesiones de CaCU (52).

En cuanto a las lesiones tipo NIC, se ha reportado sobre-expresión de los oncogenes *ras* (53) y *c-myc* (44,54). Así mismo se ha reportado acumulación de la proteína *p53* (lo cual puede reflejar mutaciones en el gen) en NIC de alto grado principalmente (55).

Así pues, son múltiples las alteraciones genéticas que se han reportado en cáncer invasor del cérvix adicionales a la presencia de HPV (41-52). Sin embargo, existen pocos trabajos que reporten la detección de alteraciones genéticas en lesiones más tempranas como las NICs (44,53, 55).

d). **PROTO-ONCOGEN *c-myc*.**

En el caso particular del proto-oncogen ***c-myc***, éste pertenece al grupo de genes de respuesta temprana inmediata, ya que es de los primeros genes en activarse ante un estímulo mitogénico: los niveles de la proteína *myc* son bajos en células quiescentes y aumenta hasta 40 veces en respuesta a un estímulo mitogénico. La inducción de este gen se ha asociado con la entrada al ciclo en particular en la transición G0/G1; se sugiere que los niveles de expresión de *myc* correlacionan con el rango de proliferación celular: al aumentar los niveles de la proteína *myc* aumenta la posibilidad de que la célula entre a la fase S (síntesis de DNA) (56). Se expresa durante la proliferación de una amplia variedad de tejidos adultos, y en todas las etapas tempranas del desarrollo embrionario.

La proteína *myc* es un factor transcripcional que pertenece a la superfamilia HLH/LZ (helix-loop-helix/leucine zipper). Actúa en forma de heterodímero con la proteína *max*. Puede transactivar directa o indirectamente a los genes de las ciclinas A y E, HSP 70 y de

la Ornitin Descarboxilasa; y trans-reprimir a los genes de MHC I, LFA-1, N-CAM, colágena y al propio gen *c-myc*. Está involucrada en diversas funciones celulares que incluyen el control de la proliferación normal, mitogénesis, diferenciación celular, transformación celular y apoptosis. Generalmente se asocia un incremento de la proteína *myc* con un crecimiento celular acelerado, mientras que una disminución en los niveles de esta proteína con la diferenciación celular (57, 58). Se ha propuesto que *myc* es un "switch" molecular que dirige a las células a una vía que puede llevar a la proliferación continua o bien a la diferenciación terminal; evita que las células entren a un estado de prediferenciación y las impulsa a ciclar, por lo que se requiere que disminuyan los niveles de esta proteína para que la célula pueda entrar a la fase de diferenciación (56,59,60).

En cuanto a su participación en la tumorigénesis (61), se ha encontrado que es un gen capaz de inmortalizar células en cultivo primario, pero que por si solo no es suficiente para causar un fenotipo maligno. Puede cooperar con otros oncogenes para originar un fenotipo maligno. Tal es el caso del oncogen *c-Ha-ras*: *myc* y *ras* activados pueden transformar fibroblastos de rata; y con HPV-16 pueden transformar células de riñón de ratón neonato (26,62). En ambos casos *myc* aporta la función inmortalizante.

La activación de este proto-oncogen puede ser vía 3 mecanismos:

a) Inserción proviral: a través de la integración de un virus que causa una elevación en la transcripción el promotor normal del gen. Es decir que el LCR viral actúe como un promotor de la transcripción de *myc* (34).

b) Translocaciones cromosómicas: se ha encontrado involucrado a *myc* en el punto de translocación en Linfomas de Burkitt. El gen *myc* es translocado junto a un gen de Inmunoglobulinas cuyo promotor es de expresión constante, de forma que *myc* es transcrito constantemente (63).

c) Amplificación génica: implica la presencia del gen intacto pero en múltiples copias, lo que generalmente lleva a una expresión más elevada del mismo (64).

Por otro lado se ha encontrado que *myc* puede interaccionar con genes supresores. La proteína Rb (pRb, producto del gen RB) puede unirse directamente a la proteína *myc* al igual que la proteína p107 (análogo de Rb), de modo que *myc* puede ser secuestrado de la reserva disponible en la célula, neutralizando así su función. La pérdida de asociación de *myc* con pRb (por ejemplo por la presencia de la oncoproteína E7 del HPV que secuestra a su vez a Rb) puede llevar a una expresión elevada de *myc* contribuyendo así a la progresión tumoral. Además pRb o el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) pueden disminuir la expresión de *myc* a través de una secuencia llamada elemento de control de RB (RCE) que se encuentra en la región promotora del gen *c-myc* (57, 61, 65).

Algunas de las neoplasias en las que se ha encontrado alterado a *myc* son: Cáncer de Mama, de Colon, de Pulmón, CaCU, Adenocarcinoma gástrico, Linfoma de Burkitt, Leucemia granulocítica y CaCU (43,66-70).

B. GEN SUPRESOR RB

Uno de los genes supresores más estudiados por ser el primero en ser identificado, es el gen de Retinoblastoma o **RB** detectado inicialmente en una neoplasia de la retina (el retinoblastoma). Este gen se encuentra en el cromosoma 13 (13q14) y es considerado como un gen supresor por que su función principal es reprimir la proliferación celular (evitando la progresión del ciclo celular) (71-73). Es el gen representativo de una clase de genes involucrados en cáncer en los que la pérdida funcional de ambos alelos es crítica en la formación de tumores.

La proteína Rb (pRb) es una fosfoproteína nuclear de 928 aminoácidos (110 kDa) que se une no-específicamente al DNA através de su región carboxilo-terminal. Sin embargo parece que la forma de actuar de esta proteína es através de su interacción con otras proteínas celulares. Se han indentificado más de 30 proteínas celulares con las que pRb puede interactuar; entre estas proteínas se incluyen factores de transcripción, cinasas, fosfatasas, reguladores del crecimiento y proteínas de matriz nuclear (72). Dos de los dominios globulares de la proteína que se unen a oncoproteínas virales (E7 de HPV, E1A de adenovirus y AgT grande de SV40) han sido mapeados en la región carboxilo-terminal. Esta región de la proteína es crítica para varias de las actividades de pRb que incluyen, su fosforilación durante la fase G1 del ciclo celular, la unión a factores de transcripción, la supresión de la proliferación celular y la señal que dirige a la proteína al núcleo (74).

Esta proteína es regulada con el ciclo celular. Su regulación es principalmente postraduccional por fosforilaciones mediadas por la cinasa cdc2. pRb es forforilada en residuos de Serina y Treonina en al menos 3 etapas diferentes: G1 media, en S y en la transición G2/M. Se considera que la fosforilación en G1-media inactiva a pRb permitiendo que la célula progrese através de G1 y S. Así, la forma activa de la proteína es la hipofosforilada; de hecho es la forma hipofosforilada de Rb la que es capaz de unirse a otras proteínas celulares. La defosforilación de pRb inicia en la Anafase; esta defosforilación es el mecanismo principal de reactivación de pRb y es mediada aparentemente por la fosfatasa PP1 (73-75).

La proteína Rb se expresa en todos los tejidos hasta ahora analizados. En los

epitelios estratificados se ha encontrado que se expresa fuertemente en la capa suprabasal (en maduración), así mismo en tejido hematopoiético la mayor expresión de esta proteína se encuentra en las células en maduración. Estos datos indican que pRb controla la progresión del ciclo celular principalmente de células en maduración, lo cual sugiere que pRb es un regulador importante en el programa de diferenciación (más que de proliferación) de ciertos tipos celulares(76). La forma en la que aparentemente actúa pRb es uniéndose y manteniendo inactivo al factor transcripcional E2F, el cual activa la transcripción de varios genes importantes para la síntesis de DNA tales como: c-myc, DHFR, Timidina-Cinasa, y DNA pol-alfa (75).

Se ha encontrado alterado este gen en diferentes neoplasias, principalmente en: Retinoblastoma, Cáncer de Pulmón, de Vejiga, de Mama y algunas Leucemias (77-79); de esto se deduce que pRb está involucrada en el control de diferentes estirpes celulares (80). Para el caso de Leucemia mielocítica aguda, se ha reportado que un gran número de muestras presentan una elevada cantidad de pRb (la mayor parte en forma fosforilada), considerando que esto puede representar un marcador de la presencia de una población de células tumorales(79).

En cuanto al CaCU, se han realizado algunos estudios en líneas celulares derivadas de esta neoplasia, encontrándose que en aquellas líneas con HPV se encuentran intactos los genes supresores RB y p53, mientras que en aquellas líneas que no contienen HPV se detectan alteraciones estructurales en el gen p53 y alteraciones en la expresión de la pRb; estos resultados sugieren una relación inversa entre la presencia de HPV y alteraciones en los genes supresores p53 y RB, indicando que la pérdida de la función normal de estos genes es importante en el desarrollo del CaCU, y que en ausencia de las proteínas virales E6 y E7 de HPV las mutaciones en estos genes son necesarias para el desarrollo del tumor (81-83). Sin embargo, recientemente el Dr. Salcedo (comunicación personal) ha encontrado la presencia de alteraciones estructurales (determinadas por Southern Blot) en un 20% de las biopsias estudiadas de CaCU, las cuales eran positivas para HPV; sugiriendo que independientemente de la presencia de HPV pueden ocurrir alteración del gen RB en tejido fresco de tumores cervicales, apoyando aún más la participación de este gen supresor en el desarrollo del CaCU. Es relativamente poco lo que se ha estudiado sobre la participación del gen RB en el desarrollo del CaCU, y los pocos estudios que se han realizado son sobre líneas celulares derivadas de CaCU la mayoría de ellos, y uno solo sobre muestras de tejido de CaCU, en el cual se ha mostrado que existen alteraciones de este gen independientemente de la presencia de HPV, indicando pues que este gen parece tener algún papel en el desarrollo de esta neoplasia, por lo que

debe estudiarse más al respecto. Hasta el momento, no se ha reportado ningún estudio sobre el estado de RB en lesiones pre-invasoras del cervix.

8. INTERACCION *c-myc* - RB - E7 (HPV)

El estudiar la expresión de estos dos genes (*myc* y RB) en lesiones preinvasoras del cervix, en cuyo desarrollo posiblemente participen, toma mayor importancia ya que estos dos genes interactúan de manera importante durante el control normal de la proliferación celular, así como en forma alterada (por la activación de uno e inactivación del otro respectivamente); así mismo la interacción de HPV con éstos genes es importante en el desarrollo de una neoplasia. Esta serie de interacciones entre genes celulares y virales durante el ciclo celular, ya sea para su progresión normal o alterada, puede resumirse en lo siguiente:

Durante las fases G1/G0 del ciclo celular pRb, la cual se encuentra en su forma activa, en los límites de G1/S empieza a fosforilarse en múltiples sitios inactivándose, para permitir la progresión de G1 a S. pRb puede modular la transcripción de genes implicados en la proliferación celular como son *c-fos*, TGF- β , *myc*, *cdc2*, TK, DHFR y DNApol- α , a través de la interacción física de pRb con factores transcripcionales como E2F. pRb mantiene secuestrado a E2F hasta que pRb es fosforilada o bien se asocia con oncoproteínas virales (64, 65). Al inactivarse pRb, queda libre E2F el cual activa transcripción del gen *myc* cuyo producto facilita la progresión del ciclo para entrar a fase S (60).

Cuando ocurre infección por HPV (en particular los tipos de alto riesgo), la oncoproteína E7 puede asociarse con pRb y formar un complejo inactivo dejando a E2F libre para activar la transcripción de *myc* y llevar a la célula a proliferar (66,67). Por otro lado la proteína *myc* puede unirse a pRb, el cual al parecer es otro mecanismo de pRb para controlar la proliferación celular evitando la síntesis de DNA, de esta forma la unión con oncoproteínas virales puede tener un doble efecto para permitir la proliferación celular sacando a pRb del control celular liberando a E2F y a *myc* (67,68). Además se ha reportado que pRb puede regular la expresión del oncogen *c-myc* (68). En condiciones normales, pRb es desfosforilada (por PPA2) terminando la fase de mitosis; si llega el estímulo adecuado para proliferar pRb es nuevamente fosforilada a la mitad de la fase G1, si no hay estímulo entonces pRb no se fosforila y no permite que ocurra la síntesis de DNA. En el caso de una infección por HPV, la proteína E7 se mantiene unida a pRb, por lo que la célula seguirá proliferando.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando estos antecedentes, así como el hecho de que la mayor parte de los estudios sobre la participación de estos factores (HPV, oncogenes y genes supresores del tumor) en el desarrollo de esta neoplasia, se han realizado sobre muestras de tejido de cáncer cervico-uterino invasor y se ha reportado poco sobre las diferentes alteraciones celulares que se pueden encontrar en lesiones preinvasoras, se planteó para este trabajo determinar la expresión de los genes *c-myc* y *RB* así como la presencia de HPV, en tejidos con lesión cervical preinvasora de bajo grado del cérvix (NIC I).

IV. HIPOTESIS

Considerando el hecho de que se han reportado alteraciones (en la estructura del gen o bien en su expresión) de los genes *c-myc* y *RB* en lesiones invasoras del Cuello Uterino, consideramos que en aquellas muestras de Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado I (NIC I) que estén infectadas con HPV de alto riesgo, será posible encontrar alteraciones en la expresión (proteína y/o transcritos) de estos genes celulares.

OBJETIVOS

Analizar mediante las técnicas de Inmunohistoquímica e Hibridación *In Situ*, la expresión (proteína y transcrito respectivamente) de los genes *c-myc* y *RB*, en tejido cervical normal y con NIC I.

Determinar la presencia y tipo de HPV en tejido cervical normal y con lesión preinvasora de bajo grado (NIC I) mediante la técnica de PCR.

V. MATERIALES Y METODOS

a. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron cortes histológicos de biopsias de cérvix uterino con NIC I (12 casos en total), obtenidos del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología y 8 tejidos normales obtenidos de úteros sin patología neoplásica, a partir de piezas quirúrgicas (Histerectomía) de pacientes que acudieron al servicio de Ginecología del Hospital Manuel Gea González. Las biopsias fueron fijadas en formol al 10% amortiguado con fosfatos e incluidos en parafina. Todos los casos fueron seleccionados en base a criterios histopatológicos.

Adicionalmente y de forma paralela, se analizaron 5 muestras de NIC II y 2 muestras de NIC III a las cuales se les realizó el mismo tipo de análisis que para las muestras de NIC I.

b. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se utilizaron cortes seriados del tejido para la Hibridación *In Situ* y para la detección de las proteínas. Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron los siguientes anticuerpos: **a)** Ab. policlonal C-15, (Sta. Cruz Biotechnology, Inc.) que reconoce un péptido de 15 aminoácidos que corresponde a la región carboxi-terminal de la proteína Rb humana (**Figura 1A**); **b)** Ab-1 monoclonal (Oncogene Science) que reconoce un péptido de la región carboxilo-terminal (de los aminoácidos 408 a 439) de la proteína myc humana (**Figura 1B**); y **c)** anticuerpo anti-L1 (proteína tardía de papilomavirus) (DAKO PAP-KIT TMSystem). Todos revelados con el método de Peroxidasa-anti-Peroxidasa (PAP). Los siguientes reactivos se obtuvieron de los "kits" comerciales ; suero de cerdo no inmune al 10%. anticuerpos secundarios (IgG anti-ratón o anti-conejo) y complejo PAP.

La técnica inmunohistoquímica fue esencialmente igual para los tres anticuerpos utilizados, únicamente se varió la concentración de cada anticuerpo.

Los cortes de los tejidos (5µm) montados en laminillas tratadas con Silano, fueron desparalinados en xilol por 3 min y pasados secuencialmente en etanol al 100%, 70%, 30% y agua durante 2 min en cada uno de ellos. En seguida los tejidos se incubaron por 10 min con peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente para inactivar a la peroxidasa endógena. Se lavaron en Buffer Salino de Fosfatos (PBS) y se trataron con la solución bloqueadora (suero de cerdo no inmune al 10%) por 20 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se eliminó el exceso de bloqueador y se incubaron por toda la noche con el primer anticuerpo (anti-L1 diluido en PBS 1:200, anti-myc 1:200 ó anti-Rb 1:250 respectivamente). Se lavaron los tejidos en PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios (IgG anti-ratón para o anti-conejo para en dilución 1:100) por 45 min en cámara húmeda. Después se lavaron en PBS, se añadieron los complejos Peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) y se incubaron 45 min en cámara húmeda. Al término de las incubaciones se lavaron en PBS y se añadió la solución de Diaminobencidina (DAB, 6 mg/10 ml de agua, con 100 µl de peróxido de hidrógeno al 3%) para desarrollar el color, monitoreando la reacción cada 20 seg bajo observación microscópica. Se consideró como una reacción positiva, la aparición de un precipitado granular de color café intranuclear, la cual fué calificada como: +: tenue ó ++: intensa. Finalmente, los tejidos fueron contrateñidos usando Hematoxilina de Harris, en seguida se deshidrataron en etanol (30%, 70% y 100%) durante 2 min, 3 min en xilol y se montaron para su posterior revisión en el microscopio. Se consideró **positivo** un tejido si la señal abarcaba más de un 10% del tejido.

Como control negativo para cada anticuerpo, se utilizaron cortes de NIC o CN a los cuales se les realizó el mismo tratamiento de la IHQ, evitando unicamente el paso con el primer anticuerpo.

En algunos tejidos fué posible realizar una doble-inmunohistoquímica para las proteínas Rb y myc, variandose el sistema de revelado para la proteína myc para lo cual se utilizó fosfatasa alcalina, la cual da una señal de color azul, diferenciando así la señal café de la proteína Rb (revelada con DAB).

G. HIBRIDACION IN SITU (HIS)

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados (ver técnica Inmunohistoquímica) hasta PBS 1X y se incubaron secuencialmente en las siguientes soluciones: Proteinasa K (50 μ g/ml) en PBS a temperatura ambiente 3 minutos lavando con PBS; 10 min, Glicina 0.2% en PBS lavando en PBS, se deshidrataron en etanol a concentraciones crecientes (hasta 100%) y se dejaron secar al aire 1hr a temperatura ambiente. Se preparó el "cocktail" de hibridación con: Formamida 50%, Dextrán Sulfato 10%, Cloruro de sodio 0.6 M, Tris 10 mM, EDTA 5 mM, Ficoll 0.02%, Poli-vinil-Pirrolidona 0.02%, DNA de espermatozoos de salmón 0.2 mg/ml, BSA 1 mg/ml, Dilitreitol 0.5 mM y 0.2 ng/ml de sonda-³⁵S (marcada por nick translation). Para hibridar se desnaturalizó la sonda calentando a 90°C por 5 min y la muestra a 60°C por 3 min. Se añadió la sonda al tejido y se cubrió con parafilm, dejándose incubar a 45°C toda la noche. Después de la hibridación, los tejidos se lavaron en:

- a) Agua bidestilada a temperatura ambiente 5 minutos (para descubrir los tejidos),
- b) Formamida 50%/SSC 2X a 50°C en agitación por 60 min (2 lavados),
- c) SSC 2X a 50°C en agitación por 30 min,
- d) RNasa 25 μ g/ml a 37°C por 60 min,
- e) SSC 2X a temperatura ambiente en agitación por 15 min,
- f) SSC 1X a temperatura ambiente en agitación por 15 min,
- g) SSC 0.1X a 50°C en agitación por 30 min,
- h) PBS

Se deshidrataron los tejidos en etanol a concentraciones crecientes (hasta 100%) y se dejaron secar 1 hr a temperatura ambiente.

Autoradiografía: Se sumergieron los tejidos en emulsión autoradiográfica LM-1 (Autoradiographic emulsion LM-1, Amersham) diluida (1:2) en agua. Se guardaron en una caja negra con desecador y se incubaron a 4°C varios días (3-5 días). Se revelaron y fijaron como placas autoradiográficas (utilizando el revelador D-19 de Kodak). Finalmente se lavaron en PBS y contratiñieron con Hematoxilina-Eosina para su evaluación al microscopio. La señal positiva para la hibridación se muestra como granos negros resultado de la precipitación de la plata de la emulsión fotográfica, debido a la emisión de partículas β provenientes del isótopo ^{35}S .

Para la detección de transcritos de los genes RB y *c-myc* se usaron sondas de cDNA de cada uno de estos genes (**Figura 2**). Como control **negativo** se usó el DNA del plásmido pBR322 y que como control **positivo** se usó el cDNA del RNA ribosomal 18s.

Para el análisis se contaron 100 células epiteliales por laminilla es decir, 10 células en 10 campos al azar observados en microscopio de luz con campo claro; en cada campo se contaron 10 células desde el estrato basal del epitelio hasta el superficial, considerando el epitelio en 3 estratos principales: basal, intermedio y superficial. Se contó el número de granos tanto en núcleo como en citoplasma.

La significancia estadística de las diferencias entre controles y casos, se determinó con la prueba de T de Student. Se consideraron las diferencias significativas con una $p < 0.05$.

d. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se extrajo el DNA de los tejidos incluidos en parafina de la siguiente manera: se colocaron 3 ó 4 cortes de aproximadamente 10 μm de grosor del tejido incluido en parafina, en un tubo "eppendorf", al cual se le añadió Xilol para eliminar la parafina incubando a 37°C por 15 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm eliminando el sobrenadante, repitiendo el lavado con Xilol una vez más. Después de eliminar el Xilol, se lavó el tejido con alcohol absoluto y después se rehidrato con soluciones de etanol graduales (70% y 30%), hasta llegar a agua bidestilada (en cada paso se centrifugó el tejido a 14,000 rpm recuperando el precipitado). El tejido recuperado se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente en 500 μl de de HCl 0.2N; se lavó dos veces el tejido con PBS y se incubó por 3 hr a 55°C con 25 μl de una mezcla que contenía: 0.5% Tween-20, 100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 500 nM EDTA y 200 μg de proteínasa K. Finalmente se incubó por 10 minutos a 95°C y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos, recuperando en este caso el sobrenadante (el cual contiene el DNA), el cual se somete directamente al procedimiento de PCR.

Para esta técnica se usaron de 1 μg de DNA por reacción. La mezcla de reacción para PCR (100 μl) que se utilizó contenía: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.4, 1.5mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 1 μM de cada primer y 4 unidades de Taq-polimerasa. Se utilizaron los primers consenso para la región L1 diseñados por el Dr. Yoshikawa (89).

La mezcla se calentó a 95°C durante 5 minutos. Las condiciones de la amplificación fueron 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1.5 min; alineamiento a 48°C por 1.5 min y polimerización a 72°C por 2.0 min. Finalmente se calentó a 72°C por 10 min. La mitad del DNA amplificado que se obtuvo de la reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa (1.5 %) con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio; otra alícuota similar fue usada para la tipificación por análisis de restricción con la enzima AccI para HPV-16, y con la enzima PstI para HPV-18.

La secuencia de los primers consenso utilizados fue:

5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTITTTT-3'

5'-CAATACAGAGTATTTAGGGTA-3'

VI. RESULTADOS

PRESENCIA DE HPV EN LAS NIC I

Por medio del análisis de PCR se observó que las 12 muestras de NIC I fueron positivas para HPV: 9 de ellas para HPV-16 y 3 para HPV-18. De los 8 tejidos cervicales normales (sin patología neoplásica) 5 fueron positivos para HPV (no se determinó el tipo) (**Cuadro 1**). Igualmente los NIC II y III que se analizaron eran positivos para HPV, los 5 NIC II para HPV-16, uno de los NIC III para HPV-16 y el otro para HPV-18.

PROTEINA DE CAPSIDE (L1) EN APROXIMADAMENTE LA MITAD DE LAS NICs

La señal para la proteína de cápside (L1) de HPV se encontró sólo en 5 de las 12 (42%) muestras de NIC. La señal fue intranuclear y se detectó principalmente en las células de las capas más superiores del epitelio, en particular en las células denominadas colócitos (**Cuadro 2, Figura 3**). En cuanto a los NIC de alto grado, sólo uno de los 7 (un NIC II) presentó señal para la proteína L1 (datos no mostrados).

PRESENCIA AUMENTADA DE LA PROTEINA RB (pRb) EN TEJIDOS CON NIC

Para el análisis de la inmunohistoquímica se consideró el porcentaje del tejido que abarcó la señal (precipitado insoluble de color café), tomando como referencia otros reportes donde analizan por inmunohistoquímica a la proteína Rb (^{90,91}) se consideró **positivo** un tejido si la señal abarca más de un 10% del tejido. Se encontraron 11 de los 12 (92%) casos de NIC I positivos con señal intranuclear, la mayoría con una intensidad de ++ (**Figura 4a**), y en el otro caso la señal fue únicamente citoplásmica por lo que se

consideró negativo; en el caso de los 8 tejidos normales, 4 fueron claramente positivos (**Figura 4b**), de los restantes 3 tuvieron menos del 10% de positividad y uno fué completamente negativo (**Cuadro 3A**). Tanto para las NIC como para el cérvix normal la señal fué heterogénea, es decir se pueden observar células positivas junto con negativas y se observa principalmente en los estratos inferiores del epitelio (basal y parabasal); en el caso particular de los tejidos con NIC, se observa en algunos tejidos que hay una predominancia de la señal en las células más displásicas del epitelio (en particular en el caso de los NIC de alto grado) (**Figura 5**). Siempre se encontró que la intensidad de la señal en los NICs es mayor que en los normales, sugiriendo la presencia de una mayor concentración de proteína en los NICs que en los normales (**Cuadro 3A**). En cuanto a los NICs II y III, se encontró que todos eran positivos para la proteína Rb; la señal fué en todos los casos intensa (++) (datos no mostrados). En la **Figura 6A** se muestra uno de los controles negativos.

En cuanto a la detección de transcritos de este gen, los resultados se muestran en el **Cuadro 4A**, en el cual se incluyen: el promedio del número de granos en el núcleo y citoplasma de cada una de las células contadas y los valores de desviación estándar para cada grupo comparado. Para el análisis se comparó los resultados de núcleo y citoplasma (por separado) de cada estrato de los tejidos con NIC con su correspondiente en los tejidos normales. Se encontró que la mayor concentración de señal se observa siempre en el citoplasma y se observa que la cantidad de granos es ligeramente mayor en los casos de NIC I que en normales; se encontraron diferencias estadísticamente significativas únicamente en el citoplasma de los estratos medio y superficial ($p < 0.05$) entre los tejidos con NIC y normales.

Así mismo en los NICs II y III, se observó una cantidad ligeramente mayor de granos que en los normales, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (datos no mostrados).

MAYOR CONCENTRACION DE LA PROTEINA myc EN NIC QUE EN TEJIDO CERVICAL NORMAL.

Se encontró que 8 de los 12 (67%) tejidos de NIC fueron positivos, la mayoría presentó señal ++ (Intensa) (**Figura 7a**), los 4 tejidos restantes tuvieron menos del 10% de positividad y con una intensidad tenue (+). En los tejidos normales solo un caso fué

positivo (con señal en más del 10% del tejido) con señal tenue (+) (**Figura 7b**); de las muestras restantes 3 tuvieron menos del 10% de positividad y 4 fueron completamente negativas. Para ambos casos la expresión de las proteínas fué heterogénea y se observó principalmente en los estratos inferiores del epitelio. En el caso de los NICs la señal fué siempre mucho más intensa y se observó en un porcentaje mayor de células que en el tejido normal positivo (**Cuadro 3B**). Además que en varias de las muestras de NIC, se observó señal positiva en citoplasma preferentemente del estrato medio del epitelio (**Figura 8**).

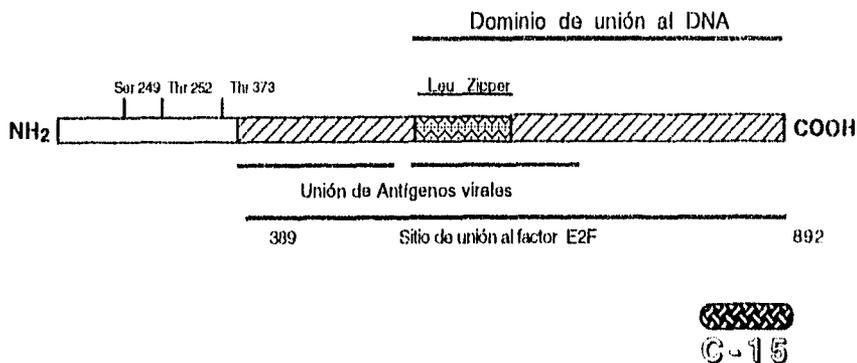
En el análisis de HIS para myc, este fué realizado bajo las mismas condiciones que para RB y se encontró que la mayor concentración de señal se observa siempre en el citoplasma y en particular en los estratos basal y medio del epitelio; se observa una mayor cantidad de granos en los casos de NIC que en los normales, sin embargo se encontraron diferencias significativas solo en el núcleo de los estratos basal y superficial (**Cuadro 4B**).

Igualmente en las muestras de NIC II y III, se observó una mayor cantidad de señal que en los normales, encontrándose que existen diferencias significativas en el núcleo de todos los estratos y para ambos tipos de NIC (recordando que en el caso de las muestras de NIC III es difícil considerar los tres estratos, ya que se ha perdido parte de la integridad del epitelio en esta lesión) (**Cuadro 5**).

EXPRESION DIFERENCIAL DE LAS PROTEINAS RB y MYC EN TEJIDOS CON NICs

Por otro lado y de manera interesante, se encontró que en aproximadamente la mitad de las muestras de NIC y cérvix normal, existen zonas del epitelio que fueron positivos para pRB y negativos para myc y/o viceversa [pRB(+) /myc (-) ó pRB (-) /myc (+)], encontrando también algunos tejidos positivos para ambas proteínas (**Figuras 9 y 10**) pero la señal para cada proteína se encontraba abarcando una proporción diferente del tejido, es decir un porcentaje mayor del tejido presentaba señal para pRb que para myc o viceversa (estos resultados pueden también apreciarse en el Cuadro 3A y 3B). En el análisis de doble inmunohistoquímica (para las proteínas myc y Rb simultáneamente) es posible apreciar también este tipo de diferencias (**Figura 10**).

A) Proteína RB (p105^{Rb})



B) Proteína myc

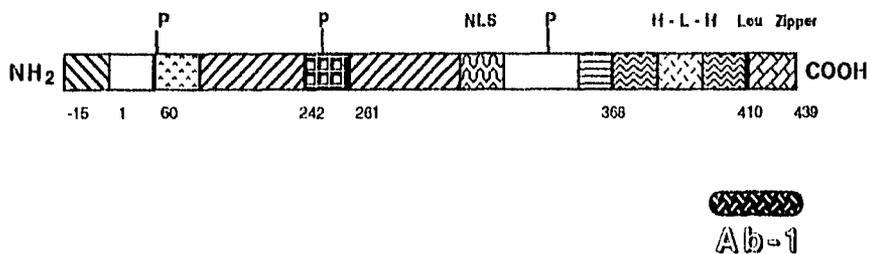
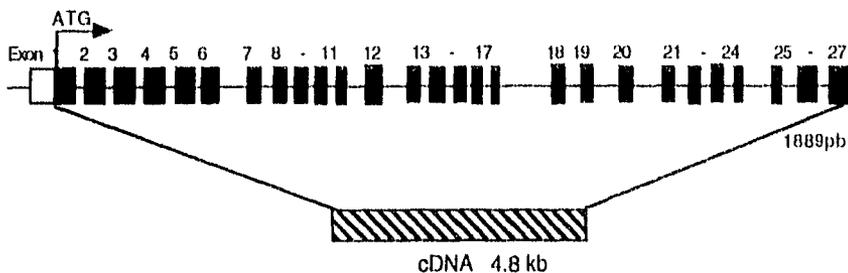


FIGURA 1: Esquema de las proteínas **A) RB** y **B) c-myc**, respectivamente. En la figura se señalan las regiones importantes de cada proteína, así como la secuencia correspondiente al péptido que es reconocido por los anticuerpos C-15 para Rb y Ab-1 para la proteína myc. Leu-zipper = dominio Zipper de Leucina; HLH = dominio helix-loop-helix, NLS = Señal de localización nuclear, P = sitio de fosforilación, NH₂ = extremo amino-terminal, COOH = extremo carboxilo-terminal. La figura fué tomada de: Hosketh R. 1994. *The Oncogene Handbook*. Academic Press, USA. pp 325 y 530.

A) GEN RB



B) GEN c-myc

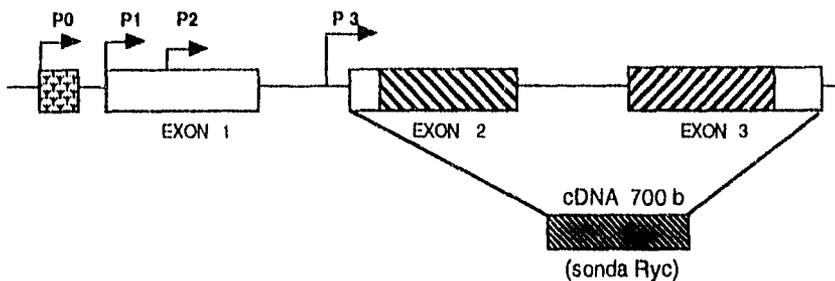


FIGURA 2: La figura muestra los mapas de los genes de los genes: **A)** RB y **B)** c-myc. Se utilizaron los cDNA correspondientes a cada uno de estos genes como sondas en la Hibridación *In Situ* para la detección de los respectivos transcritos. P0-P3= diferentes promotores del gen c-myc; kb = kilo bases, pb = pares de bases. La figura fué tomada de: Hesketh R. 1994. The Oncogene handbook. Academic Press, USA. pp 323 y 530.

CUADRO 1: Detección de HPV de alto poder oncogénico en tejido cervical, mediante la técnica de PCR.

TEJIDO	HPV-positivos	HPV-negativos
Cérvix Normal	5 / 8 (62%)	3 / 8
NIC I	12 / 12 a) HPV-16: 9/12 b) HPV-18: 3/12	0 / 12
NIC II	5/5 con HPV-16	0/5
NIC III	2/2 a) HPV-16 1/2 b) HPV-18 1/2	0/2

CUADRO 2. Presencia de la proteína de cápside de HPV (L1) determinada mediante análisis Inmunohistoquímico, en las muestras de tejido cervical con NIC I.

TEJIDO	Proteína L1	HPV
1412	+	16
1258	+	16
1355	-	16
1410	-	16
3933	-	18
2088	-	16
2248	+	16
2484	-	16
2570	-	16
4185	-	18
4545	+	16
4661	+	18

+ = señal positiva, - = tejido negativo, L1 = Antígeno común de cápside de HPV.



FIGURA 3: Señal para la proteína L1 de HPV en tejido cervical con NIC (200 X). La señal se observa en el núcleo de células diferenciadas del epitelio cervical (estratos superiores del epitelio), pero no en las células displásicas. En el epitelio superior se pueden observar coilocitos positivos (flecha) y negativos.

CUADRO 3: Presencia de las proteínas A) Rb y B) myc determinada mediante análisis Inmunohistoquímico, en tejido cervical normal y con NIC I.

A.

Tejido	% positividad	Int	Tejido	% positividad	Int
NIC I:			CN		
1412	20%	++	05-93	15%	+
1258	>50%	++	10-93	25%	++
1355	40%	++	16-93	5%	++
1410	25%	+	19-93	NEG	-
3933	75%	++	12-94	20%	+
2088	25%	++	15-94	5%	+
2248	25%	+	16-94	5%	++
2484	70%	++	26-94	30%	++
2570	0%	-			
4185	80%	++			
4545	15%	++			
4661	30%	++			

B.

Tejido	% positividad	Int	Tejido	% positividad	Int
NIC I			CN		
1412	<10%	+	05-93	15%	+
1258	<10%	+	10-93	<10%	+
1355	15%	++	16-93	<10%	+
1410	15%	++	19-93	<10%	-
3933	80%	++	12-94	NEG	-
2088	15%	++	15-94	NEG	-
2248	<10%	+	16-94	NEG	-
2484	15%	++	26-94	NEG	-
2570	<10%	+			
4185	70%	++			
4545	15%	++			
4661	20%	++			

- negativo; + señal tenue, ++ señal intensa, % positividad = porcentaje del epitelio con señal positiva. CN = Cérvix Normal; NIC I a III = Neoplasia Intraepitelial Cervical grado I a III, Int = Intensidad.

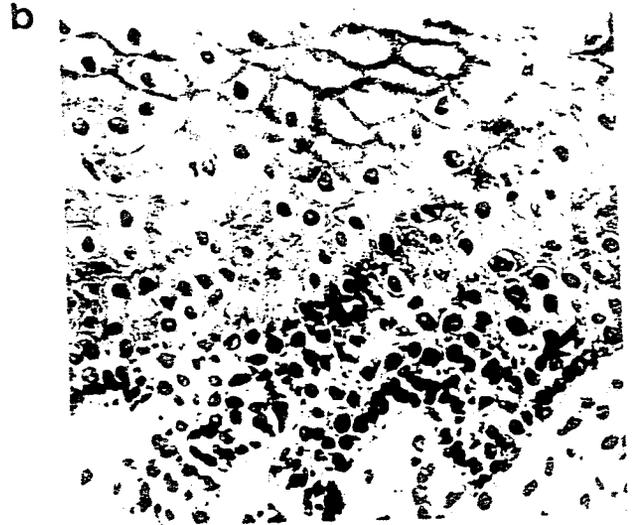


FIGURA 4: Detección de la proteína Rb en tejido cervical: a) con Neoplasia intraepitelial Cervical (400X) y b) normal (400 X). La señal se localiza principalmente en los estratos inferiores del epitelio (incluyendo el estrato basal). En tejido normal la señal se localiza en la capa parabasal (Flecha). La intensidad de la señal es mayor en el tejido con NIC que en el normal.



FIGURA 5: Presencia de la proteína Rb en un tejido con NIC II (400X). La inmunoreacción se observa en una zona con displasia severa donde la señal es más intensa (flecha).

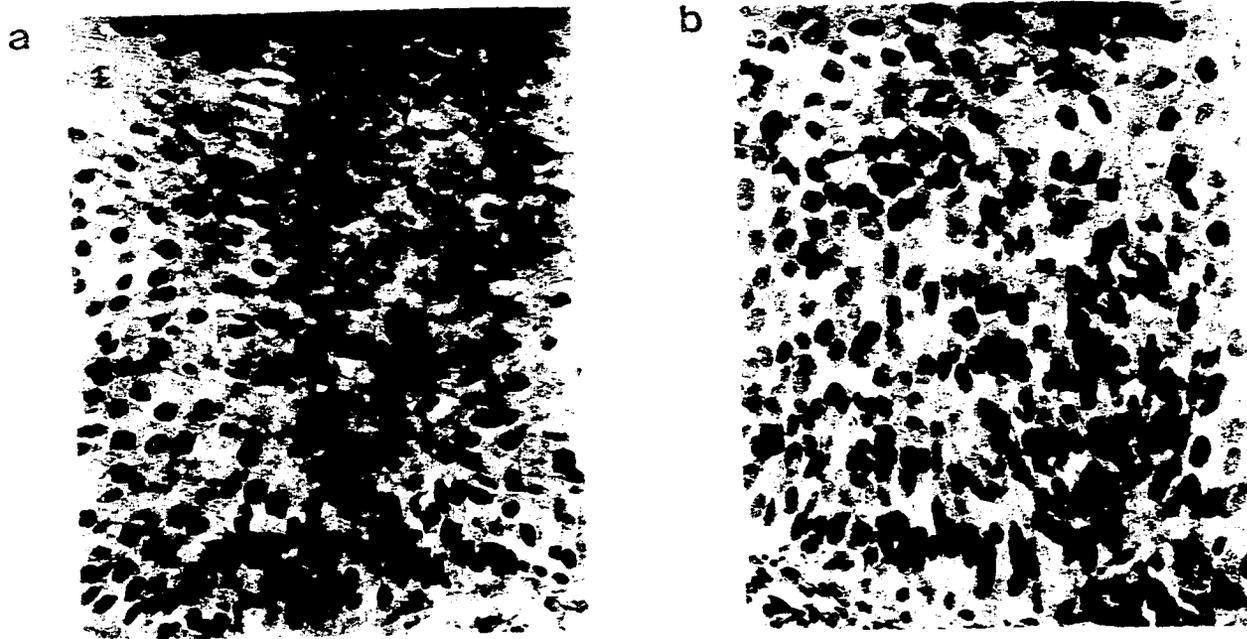


FIGURA 6: Controles negativos de la inmunohistoquímica para las proteínas a) Rb (NIC I, 400X) y b) myo (NIC I, 400 X). Estos controles se obtuvieron omitiendo la incubación con el primer anticuerpo respectivo.

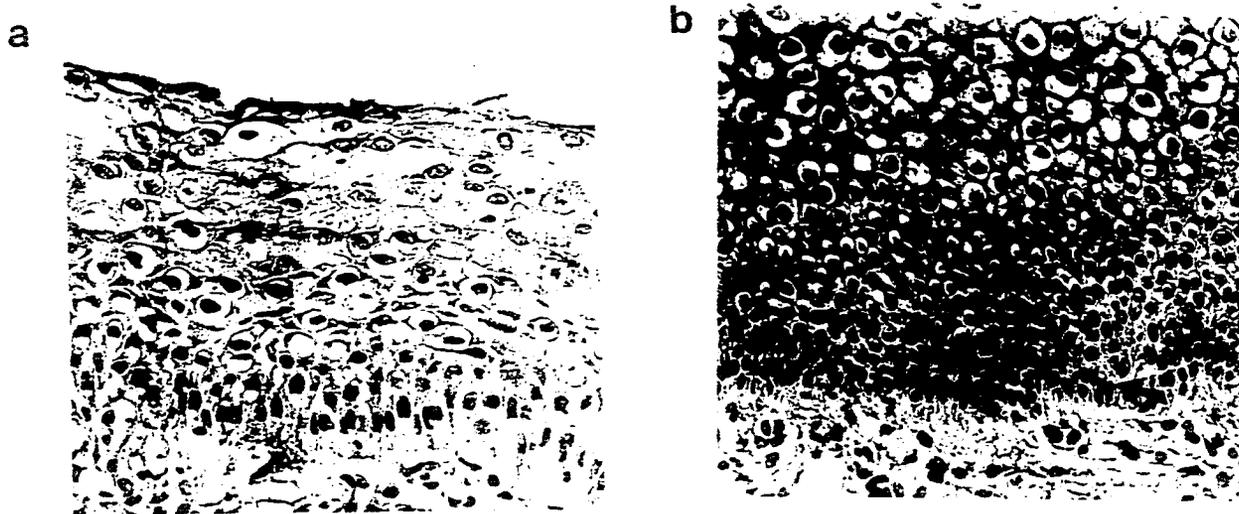


FIGURA 7: Detección de la proteína myc en tejido cervical a) con Neoplasia intraepiteiial Cervical (400X) y b) normal (400X). La señal se localiza principalmente en los estratos inferiores del epitelio. En tejido normal la señal se observa en la capa basal preferentemente (Flecha). La intensidad de la señal es mayor en el tejido con NIC que en el normal.

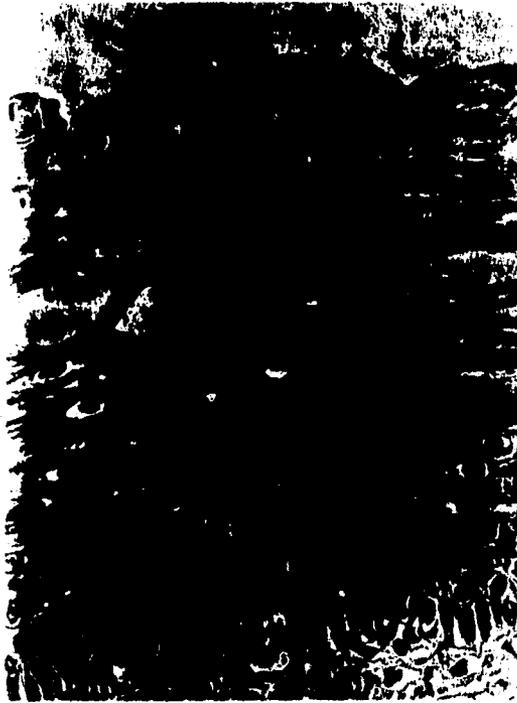


FIGURA 8: Señal citoplásmica de la proteína myc predominantemente en los estratos medios del epitelio (punta de flecha). La señal nuclear para esta proteína se observa en los estratos basal y parabasal (flecha).

CUADRO 4: Conteo de los granos obtenidos de la Hibridación *In Situ*, utilizando como sonda los cDNA de los genes **A) RB** y **B) c-myc** en NIC I y tejido cervical normal. Se muestran los resultados del análisis de la prueba estadística de T de Student.

A.

		Número de granos					
ESTRATO	TEJIDO	NUCLEO			CITOPLASMA		
		\bar{X}	de	p	\bar{X}	de	p
Superficial	NIC	2.122	± 0.860	0.457	3.947	± 1.206	0.043
	CN	1.862	± 0.521		2.700	± 1.329	
Medio	NIC	2.358	± 0.709	0.623	11.158	± 3.393	0.015
	CN	2.538	± 0.891		7.000	± 3.407	
Basal	NIC	2.092	± 0.803	0.273	8.742	± 3.642	0.892
	CN	1.687	± 0.749		8.525	± 3.095	

B.

		Número de granos					
ESTRATO	TEJIDO	NUCLEO			CITOPLASMA		
		\bar{X}	de	p	\bar{X}	de	p
Superficial	NIC	2.525	± 1.325	0.012	4.058	± 1.636	0.059
	CN	1.025	± 0.773		2.725	± 1.104	
Medio	NIC	2.908	± 1.982	0.099	8.917	± 5.900	0.452
	CN	1.586	± 0.978		7.038	± 3.888	
Basal	NIC	1.767	± 1.088	0.036	9.525	± 5.321	0.412
	CN	0.812	± 0.567		7.500	± 4.234	

NIC= neoplasia Intraepitelial Cervical; CN = Cervix Normal; \bar{X} = promedio de 100 células, de = desviación estándar; p = significancia; negritas : valores de p < 0.05 (estadísticamente significativos).

CUADRO 5: Conteo de los granos obtenidos de la Hibridación *In Situ*, utilizando como sonda los cDNA del gen *c-myc* en tejido cervical normal y con **A) NIC II** y **B) NIC III**. Se muestran los resultados del análisis de la prueba estadística de T de Student.

A.

NIC II		Número de granos					
ESTRATO	TEJIDO	NUCLEO			CITOPLASMA		
		\bar{X}	de	p	\bar{X}	de	p
Superficial	NIC	3.3 ±	1.6	0.002	9.88 ±	2.3	0.177
	CN	0.81 ±	0.6		7.09 ±	3.9	
Medio	NIC	4.8 ±	2.3	0.005	12.5 ±	1.96	0.07
	CN	1.6 ±	0.98		7.5 ±	5.2	
Basal	NIC	3.9 ±	2.5	0.026	5.74 ±	2.00	0.005
	CN	1.4 ±	0.8		2.73 ±	1.1	

B.

NIC III		Número de granos					
ESTRATO	TEJIDO	NUCLEO			CITOPLASMA		
		\bar{X}	de	p	\bar{X}	de	p
Superficial	NIC	3.45 ±	2.47	0.012	4.9 ±	0.07	0.478
	CN	0.81 ±	0.56		7.08 ±	3.6	
Medio	NIC	4.3 ±	1.27	0.010	6.45 ±	2.2	0.796
	CN	1.59 ±	0.98		7.50 ±	5.2	
Basal	NIC	3.85 ±	1.9	0.020	3.55 ±	1.9	0.420
	CN	1.42 ±	0.87		2.72 ±	1.1	

NIC= neoplasia Intraepitelial Cervical; CN = Cervix Normal; \bar{X} = promedio del número de granos contados en 100 células, de = desviación estándar; p = significancia; negritas : valores de p < 0.05 (estadísticamente significativos).



FIGURA 9: Expresión diferencial de las proteínas Rb y myc en una lesión del cérvix. Presencia de las proteínas a) Rb (200X) y b) myc (200X), en cortes seriados y adyacentes del mismo tejido (NIC I). La señal para pRb se observa en un número mayor de núcleos y con mayor intensidad que para la proteína myc.

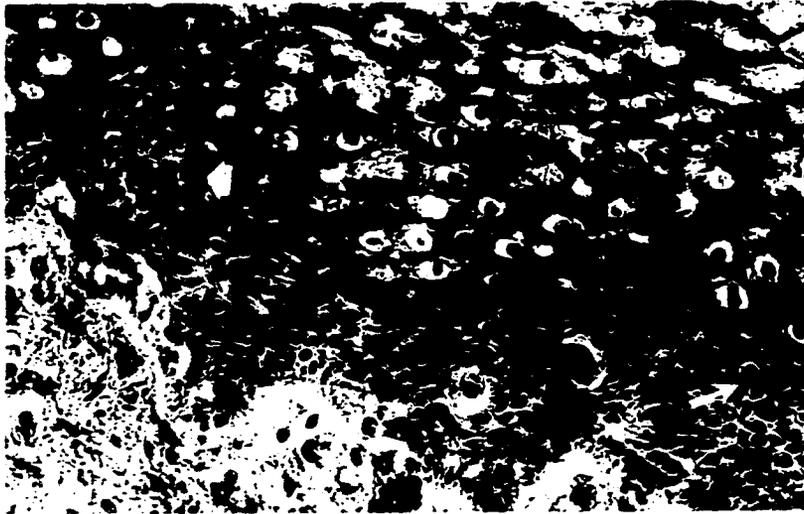


FIGURA 10: Análisis de doble-inmunoquímica (simultánea) para las proteínas Rb y myc, sobre el mismo corte de tejido cervical normal. Se pueden observar zonas con la presencia de ambas proteínas (punta de flecha); la señal color café es para pRb, mientras que la azul es para myc; así como zonas en las que se encuentra una o la otra (flecha) (400X, contrateñida con hematoxilina).

VIII. DISCUSION

En el presente estudio todas las muestras de NIC analizadas fueron positivas para HPV la mayoría de las cuales presentaron HPV-16; estos datos apoyan el que el HPV-16 es el tipo más frecuente en este tipo de lesiones (19, 92). Este resultado fué sorprendente ya que se ha reportado la presencia de HPV en un porcentaje menor de muestras. Se tiene que el tamaño de la muestra que se estudió en el presente trabajo fué muy pequeña y fué seleccionada del archivo del Departamento de Patología del INCan de acuerdo a su diagnóstico histopatológico, lo cual pudo haber contribuido a la alto porcentaje de positividad que se encontró para HPV. También existe la posibilidad de que sea un problema del PCR, pudo haber ocurrido una contaminación de las muestras. Sin embargo no nos fué posible corroborar esta posibilidad debido a que ya no se tenía DNA disponible de las muestras para repetir el análisis de PCR.

En el caso de las muestras sin patología neoplásica previamente se ha reportado que la prevalencia de HPV en mujeres con citología normal (93,94) es de 20-40%, en nuestro caso el porcentaje de muestras de cérvix "normal" que presentó HPV (el 60%) fué un poco mayor. Una vez más el número de muestras normales que se trabajó fué muy pequeño y los tejidos provenían de mujeres con padecimientos ginecológicos principalmente de cervicitis crónica (la cual puede ser originada entre otros agentes por HPV). La importancia de encontrar mujeres sin alteraciones neoplásicas hasta el momento de la toma de la muestra, que están infectadas con HPV, radica en que estas mujeres pudieran estar expuestas a desarrollar potencialmente alguna lesión asociada a estos virus.

Adicionalmente se detectó la presencia de la proteína tardía L1 (de cápside) de HPV en las muestras de NIC. La presencia de esta proteína refleja la existencia de partículas infectivas (es decir infección lítica y formas episomales del virus) de HPV en el tejido. En aquellas muestras de NIC en las que se encontró presencia de la proteína L1 seguramente HPV se encontraba episomal; sin embargo en el caso de las negativas es muy probable que el número de copias virales fuera muy pequeño de modo que, si ocurrió síntesis de la proteína L1, la cantidad de proteína que se formó no fué suficiente para ser detectada inmunohistoquímicamente. Otra explicación, aunque poco probable, es que haya ocurrido integración de los virus al genoma celular dado que se encontró que las muestras estaban infectadas con HPVs de alto riesgo, sin embargo se trata de lesiones muy tempranas. Se ha encontrado que la integración del genoma viral ocurre

predominantemente en cánceres avanzados siendo este uno de los mecanismos propuestos de carcinogénesis viral (33,34).

La expresión de la proteína *myc*, tanto en cantidad como en el número de células que la presentaron, se encontró mucho más elevada en los NIC que en los tejidos normales. En los tejidos normales la señal sólo se encontró en las células del estrato basal (que tienen la tasa de proliferación más alta dentro del epitelio), en contraste en las NICs la señal se observó en los estratos basal y medio del epitelio lo cual puede estar reflejando la presencia de un mayor número de células en proliferación en el tejido, incluyendo estratos superiores.

En el caso de los resultados de la HIS, se encontró siempre una mayor cantidad de señal en el citoplasma lo cual sugiere que la mayoría de los transcritos una vez sintetizados en el núcleo son transportados al citoplasma para ser traducidos. En particular, la mayor concentración de señal citoplásmica se observó en los estratos basal y medio, lo cual correlaciona con la proliferación celular. Sin embargo, al hacer el análisis estadístico de estos resultados, se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos de NIC I y tejido cervical normal. Debido a que no hay un aumento en la cantidad de transcritos del gen *c-myc* con relación al grupo control, los resultados por inmunohistoquímica sugieren que la mayor presencia de proteína *myc* en los tejidos con NIC puede deberse a una acumulación de la proteína en estas células.

Por otro lado, al hacer el análisis de expresión de *myc* en las NIC II y III se encontró la presencia aumentada de la proteína *myc* en la mayoría de los casos. En cuanto a la HIS se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de transcritos de los NICs II/III y los normales, indicando una presencia aumentada de transcritos en este tipo de lesiones, lo cual sugiere una posible elevación de la tasa transcripcional del gen *c-myc* en estos tejidos, pero no así aparentemente en los NIC I (que es una lesión de bajo riesgo). Sin embargo la muestra analizada de NIC II y III es muy pequeña, de forma que no es posible concluir al respecto, aunque sí nos da un indicio sobre una posible sobre-expresión del gen *c-myc* en lesiones más avanzadas. La posible alteración de este gen en este tipo de lesiones, es apoyado por lo anteriormente reportado por nuestro grupo de trabajo (Salcedo y Cols), en los que se encontró que tanto en cánceres invasores del cérvix, como en lesiones preinvasoras (NIC II y III) del mismo, hay alteraciones en el gen *c-myc* que pueden llevar a una posible sobre-expresión del mismo (95,96). Como ya ha sido mencionado, existen algunos trabajos en los que se correlaciona la presencia de HPV con activación del proto-oncogen *c-myc*, dado que todos los tejidos con NIC analizados fueron positivos para HPV de alto riesgo y que se encontró una

aparente alteración en la expresión del gen *myc*, es posible que esta alteración del oncogen *c-myc* pudiera deberse a la presencia de HPV. Para determinar esta asociación sería necesario analizar la expresión de este gen en biopsias de NIC no-infectadas con HPV ó infectadas con HPV de bajo riesgo.

Por otro lado, se encontró la presencia de señal para la proteína *myc* en el citoplasma de las células del estrato medio del epitelio particularmente, mientras que la señal nuclear se encontró principalmente en el estrato basal en estos mismos tejidos y la cantidad de esta señal va disminuyendo hacia los estratos superiores. Se ha reportado que una forma de controlar la actividad de proteínas nucleares, es através de regular su entrada al núcleo y que *myc* es una proteína nuclear (97), así proponemos que esta observación refleja un control semejante para esta proteína en el que, dependiendo de la utilización de *myc*, ésta puede entrar al núcleo ó quedarse en el citoplasma. Así tenemos que para las células de los estratos inferiores, las cuales están en proliferación y requieren de la presencia de *myc* en núcleo para dividirse, tienen toda la proteína *myc* que ha sido sintetizada, incorporada en el núcleo, al comprometerse la célula a diferenciar (en los estratos intermedios) ya no van a dividirse a una tasa elevada (como el estrato basal), por lo que ya no requieren a la proteína *myc* en el núcleo, y esta se acumula en el citoplasma, finalmente en las células de los estratos superiores en donde las células están diferenciadas, ya no hay síntesis de *myc* y la previamente sintetizada ha sido ya degradada en estas células. Lo anterior puede resumirse en el siguiente modelo:

ESTRATO DEL EPITELIO	NUCLEO	CITOPLASMA	ESTADO CELULAR
Superior	-	- (degradación/ no síntesis de <i>myc</i>)	Diferenciado
	+	++ (acumulación)	Compromiso a la diferenciación.
Medio	++	++ (se queda un poco en citoplasma)	Proliferación / diferenciación.
Inferior	++++	- (se usa toda en el núcleo)	Proliferación

- Modelo del control de entrada al núcleo de la proteína *myc*. Esta entrada de la proteína *myc* depende de la utilización de esta proteína en el núcleo, la cual a su vez depende del estado de diferenciación de la célula. - ausencia de proteína; + a ++++ presencia de

proteína en diferentes concentraciones.

Por supuesto, no se descarta la posibilidad de reactividad cruzada del anticuerpo con proteínas citoplásmicas, sin embargo llama la atención que este patrón ocurre en un estrato particular y no a todo lo ancho del epitelio. Ya que por HIS no se observa un aumento considerable de transcritos en el estrato medio del epitelio (comparando con el estrato basal por ejemplo), que pudieran explicar el aumento de concentración de proteína citoplásmica en este estrato, lo más probable es que el control que hemos mencionado sea pues, a nivel post-traduccional, tal y como se ha demostrado en ensayos *in vitro* (97).

En cuanto a **pRb** se encontró que se expresa principalmente en la capa suprabasal del epitelio cervical normal, lo cual como ya se ha mencionado puede significar que pRb controla la proliferación de aquellas células en camino de diferenciarse, más que controlar la proliferación de aquellas células indiferenciadas (76). Para el caso de los tejidos con NIC I, se encontró una mayor expresión de esta proteína al comparar con los tejidos normales, ya que se encuentra la señal en una mayor proporción del epitelio y con una intensidad mayor. Estos resultados sugieren, que de alguna forma se encuentra una mayor cantidad de proteína Rb en tejidos que han sufrido cambios neoplásicos a diferencia de aquellos tejidos que no han sufrido estos cambios.

En cuanto a los resultados por HIS, se encontró que la señal se observa mayoritariamente en el citoplasma. Al aplicar la prueba estadística se encontró que no hay diferencias significativas en la cantidad de transcritos de los NIC I y tejidos normales. Por lo tanto expresión aumentada de pRb que se observa en los NICs no parece deberse a un aumento en la transcripción del gen si no a una acumulación de la proteína. Una posibilidad es que, dado que HPV esta presente en todos los tejidos con NIC, la proteína E7 de estos virus este unida a la proteína RB de tal forma que se aumente la vida media de pRb permitiéndole que se acumule; sin embargo en los casos de cérvix normal en los que hay infección por HPV, no se observa este fenómeno. Esto puede sugerir que la presencia aumentada de pRb sea una característica de las células que han sufrido cambios neoplásicos, aparentemente de forma independiente a la presencia de HPV.

Hay pocos trabajos reportados acerca de la posible participación de Rb en el desarrollo del CaCU. En los trabajos que existen al respecto, se estudió el estado de los genes supresores Rb y p53 en líneas celulares derivadas de CaCU y en carcinomas del ano (principalmente), reportándose la existencia de alteraciones en estos genes supresores en aquellas líneas celulares o tumores no infectados con HPV, mientras que en los casos donde había infección por este virus los genes se encontraron sin

alteraciones (98-100). Estos datos sugieren una participación de estos genes supresores en el desarrollo del CaCU, en los que en ausencia de HPV parece ser necesaria la ocurrencia de mutaciones en estos genes. Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo (Salcedo y Col, manuscrito en preparación) se ha analizado el estado del gen RB y su proteína mediante análisis de Southern Blot e inmunohistoquímica en biopsias de tejidos con CaCU, encontrándose que en aproximadamente el 20% de las muestras analizadas existe una alteración en el gen, mientras que por inmunohistoquímica se encontró que hay una disminución en la señal, lo cual es posiblemente debido a las alteraciones en el gen. Estas alteraciones se encontraron aún en presencia de HPV, indicando que las alteraciones en este gen parecen tener un papel en el desarrollo de lesiones cervicales, independientemente de la presencia de HPV.

En cuanto los tejidos de NIC II y III, se encontró una expresión elevada de pRb, mientras que por HIS no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de transcritos con los tejidos normales. Estos resultados apoyan que la presencia aumentada de pRb, la cual no puede explicarse por un aumento en la tasa transcripcional del gen, sea una característica de las células neoplásicas de este epitelio.

Con esta evidencia sugerimos que, esta presencia de pRb en altas concentraciones pueda ser considerado como un "marcador" de cambios neoplásicos en el epitelio cervical (al menos para lesiones preinvasoras). De hecho, se ha reportado para otras neoplasias en particular leucemia mielocítica aguda, que un gran número de muestras presentan una elevada cantidad de pRb (la mayor parte de la cual esta fosforilada), considerando que esto puede representar un marcador de la presencia de una población de células tumorales (79), así mismo para cáncer de vejiga se ha reportado que patrones alterados de la proteína Rb pueden ser considerados como variables pronósticos (101,102). Estos datos junto con nuestros resultados apoyan que la acumulación de pRb sea consideradas un marcador de la presencia de células neoplásicas en el epitelio cervical.

Con respecto a la muestra de NIC I negativa para Rb, se encontró que presentaba señal positiva en el citoplasma, principalmente en las células de los estratos basal y parabasal. Se ha reportado que pueden ocurrir alteraciones en el gen RB, en la región de la proteína que corresponde a la secuencia de localización nuclear (NLS), de manera que el producto de ese gen alterado no puede ser translocado al núcleo como ocurre de manera normal, por lo que se acumula en el citoplasma de la célula (103). El Dr. Robert Weinberg (comunicación personal) ha sugerido que mutaciones en el gen RB provocan que la pRb no se transloque al núcleo. Este podría ser el caso de esta muestra, sin embargo para demostrar que este es el caso se deben hacer análisis más específicos al

respecto (por ejemplo secuenciación del gen).

En cuanto a aquellas muestras de NIC y cérvix normal en los que se encontró zonas con la presencia de pRb pero sin proteína myc y viceversa, se ha reportado que la proteína Rb puede regular la transcripción que es mediada por la proteína myc, aparentemente a través de interacciones proteína-proteína (Rb-myc) (88). Por otro lado, nuestro grupo ha reportado muy recientemente (104), que la proteína Rb puede reprimir transcripcionalmente al proto-oncogen *myc* (así como el promotor de HPV-18) *in vivo*, de manera que, la ausencia de proteína myc en zonas del tejido donde hay una elevada cantidad de proteína Rb, pudiera bien estar reflejando este control negativo de pRb sobre *myc* en el tejido cervical (ver Anexo). En cuanto al caso contrario, al no estar presente pRb, *myc* puede expresarse sin ser controlado por la presencia de pRb. Al comparar los resultados de inmunohistoquímica para ambas proteínas (porcentaje de positividad en el epitelio), se observan este tipo de diferencias en las que, cuando hay una elevada presencia de pRb hay poca proteína myc. Sin embargo, existen algunos casos en los que no se observa ninguna de estas relaciones, es decir se observa más o menos la misma cantidad de ambas proteínas. Es posible que en estos casos no esté ocurriendo este tipo de control de pRb sobre la expresión de *myc*; lo cual puede deberse a que, la pRb se encuentre no-funcional (por ejemplo asociación con la proteína viral E7), o bien a que la activación oncogénica de *myc* sobrepase el control que pRb puede ejercer sobre el gen *c-myc* normal. Al hacer este mismo análisis sobre los resultados globales de la HIS no se observan estas diferencias, sin embargo al comparar los resultados para ambos genes de cada muestra estudiada (datos no mostrados), es posible observar que al igual que en la inmunohistoquímica, algunos casos que muestran una elevada cantidad de señal para transcritos de Rb, tienen una menor cantidad de señal para *myc* y viceversa corroborando los resultados del análisis de proteína myc.

Con los datos obtenidos en el presente trabajo podemos llegar a las siguientes

VIII. CONCLUSIONES

1. Existe una mayor expresión de la proteína *myc* en los tejidos de NIC I y NIC II / III, por un incremento en la acumulación de la proteína y un aparente aumento en la tasa transcripcional del gen *myc*, respectivamente.
2. La expresión de proteína Rb en los tejidos con NIC es mayor que en los tejidos normales, por lo que sugerimos que la presencia de pRb en cantidades elevadas pudiera representar un marcador de la presencia de cambios o procesos neoplásicos en el epitelio cervical.
3. La ausencia de expresión de la proteína *myc* en algunas zonas de los tejidos analizados, frecuentemente correlaciona con la expresión de la proteína Rb; lo cual puede apoyar la sugerencia de que pRb puede controlar la expresión de *myc in vivo*.
4. En lesiones tempranas del cérvix, adicionalmente a la presencia de HPV al parecer participan de alguna manera (al menos por la acumulación de sus proteínas), los genes celulares *c-myc* y RB.

IX. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Torres LA, Cruz TF, Plata NP, Pérez VH, García GH, Román BE y Hernández AD. Cáncer Cérvico-Uterino, 1983-1984, Rev Inst Nal Cancerol 1988; 34:617-622.
2. DeVita VT., Hellman SJr., Rossenbarg AS. Cancer. Principles and Practice of Oncology. Lincott. USA. 1994.
3. Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Tenorio F, Britton RC, Gaitan E, García M, Rawls WE. Sexual behavior, Venereal Diseases, Hygiene practices, and invasive cervical cancer in high-risk population. Cancer 1990; 65:380-386.
4. Parazzini F, LaVecchia C, Negri E, Fedele L, Franceschi S, Gallotta L. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. Cancer 1992; 69:2276-2282.
5. Reeves WC, Rawls WE, Brinton LA. Epidemiology of genital papillomaviruses and cervical cancer. Rev Infect Dis. 1989; 11:426-439.
6. Kataja V, Syrjänen S, Yliskoski M, Hippeläinen M, Väyrynen M, Saarikoski S, Mäntyjärvi R, Jokela V, Salonen JT, Syrjänen K. Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case control study. Am J Epidemiol 1993; 138:735-745.
7. Zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. Cancer Res 1989; 49:4677-4681.
8. Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabryslak T, Köchel H, Kupsch E, Galubitz M, Niesert S, Kühnle H, Schedel I. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. Int J Cancer 1994; 57:836-840.
9. Lancaster W, Olson C. Animal Papillomaviruses. Microbiol Rev., 1982; 46:191-207.
10. Arends MJ, Wyllie A, Bird CC. Papillomaviruses and human cancer. Hum Pathol 1990; 21: 686-698.
11. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, Zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature 1985; 314:111-114.
12. Hines JF, Ghim SJ, Schlegel R, Jenson B. Prospects for a vaccine against human papillomavirus. Obstet Gynecol. 1995; 86:860-866.
13. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lörincz A. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. J Virol 1991; 65:606-612.
14. Doeberitz MK, Rittmüller C, Aengeneyndt F, Jansen-Dürr P, Spitkovsky D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells:

consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. *J Virol* 1994; 68:2811-2821.

15. Crook T, Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L. Human papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in the hormone-dependent transformations of primary mouse cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1988; 85:8820-8824.

16. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, *et al*. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:796-802.

17. Downey GP, Bavin PJ, Deery AR, Crow J, Griffiths PD, Emery VC, Walker PG. Relation between human papillomavirus type 16 and potential for progression of minor-grade cervical disease. *Lancet* 1994; 344:432-435.

18. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Branda BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stanton CK, Manos MM. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85:958-969.

19. Fuchs PG, Girardi F, Pfister H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 1988; 41: 41-45.

20. Moreno V, Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, González LZ, Tafur L., *et al*. Risk Factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1995; 4:459-467.

21. Cuzick J, Singer A, DeStavola BL, Chomet J. Case-control study of risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in young women. *Eur J Cancer* 1990; 26:684-690.

22. Kiviat NB and Koutsky LA. Specific human papillomavirus types as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: implications for current views and treatment. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:934-935.

23. McCance DJ, Campion MJ, Clarkson PK, Chasters PM, Jenkins D, Singer A. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br J Obstets Gynecol* 1985; 92:1101-1105.

24. Campion MJ, McCance DJ, Cuzick J, Singer A. Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic, and virological study. *Lancet* 1986; ii:237-240.

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

26. Mansur CP, Androphy EJ. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *B B*

Acta, 1993; 1155:323-345.

27. McCance DJ, Kopan R, Fuchs E, Laimins LA. Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1988; 85:7169-7173.
28. Stirdivant SM, Huber HE, Patrick DR, Defeo-Jones D, McAvoy EM, Garsky VM, Oloff A, Heimbrook DC. Human papillomavirus type 16 E7 protein inhibits DNA binding by the retinoblastoma gene product. *Mol Cell Biol* 1992; 12:1905-1914.
29. Munger K, Phelps WC. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *B B Acta* 1993; 1155:111-123.
30. Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79:671-677.
31. Wilczynski SP, Walker J, Liao SY, Bergen S, Berman M. Adenocarcinoma of the cervix associated with human papillomavirus. *Cancer* 1988; 62:1331-1336.
32. Walker J, Bloss JD, Liao SY, Berman M, Bergen S, Wilczynski SP. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1989; 74:781-785.
33. Wagatsuma M, Hashimoto K, Matsukura T. Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J Virol.*, 1990; 64:813-821.
34. Durst M, Croce CM, Glssmann L, Schwarz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1987; 84:1070-1074.
35. Reeves WC., Rawls WE., Brinton LA. Epidemiology of genital papillomaviruses and cervical cancer. *Rev. Infect. Diseases*, 1989; 11(3): 426-439.
36. Riou G, Barrois M, Tordjman I, *et al.* Presence de genomes de papillomavirus et amplification des oncogenes c-myc et c-Ha-ras dans des cancers envahissants du col de l'uterus. *C.R.Acad. Sci. Paris III*, 1984; 299:575-580.
37. Phelps WC, Howley P. Transcriptional *trans*-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol* 1987; 61:1630-1638.
38. Choo KB, Pan CC, Liu MS, *et al.* Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. *J Med Virol*, 1987; 21: 101-107.
39. Green AR. Recessive mechanisms of malignancy. *Br J Cancer* 1988; 38:115-121.
40. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinber RA, Harlow E. Association between an oncogene and antioncogene: the adenovirus E1A protein bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334:124-129.

41. Chung GT, Huang DP, Wailo K, Chan MK, Wong F. Genetic lesions in the carcinogenesis of cervical cancer. *Anticancer Res* 1992; 12:1485-1490.
42. Yokota J, Tsukada Y, Nakajima T, Goloh M, Shimamoto Y, *et al.* Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1989; 49:3598-3601.
43. Glew SS, Connor ME, Snijders P, Stanbridge CM, Buckley CH, Walboomers JM, Meijer C, Storn PL. HLA expression in pre-invasive cervical neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Eur J Cancer* 1993; 29A:1963-1970.
44. Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M, Graef AM, Gariglio P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1987; 47:4173-4177.
45. Pinion SB, Kennedy JH, Miller RW, MacLean AB. Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* 1991; 337:819-820.
46. Riou G, Barrois M, Tordjman I, Dutronquay V, Orth G. Detection of papillomavirus genomes and evidence for amplification of the oncogenes c-myc and c-Ha-ras in invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *C.R. Acad Sci, Paris*, 1984; 299:575.
47. Sagae S, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Kudo R, Hashimoto M. ras oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 1989; 63:1577-1582.
48. Bauknecht T, Kohler M, Janz I, Pfeiderer A. The occurrence of epidermal growth factor receptors and the characterization of EGF-like factors in human ovarian, endometrial, cervical and breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1989; 115:193-199.
49. Oka K, Nakano T, Arai T. c-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 1994; 73:668-671.
50. Oliner JD. The role of p53 in cancer development. *Sci Amer Science & Medicine* 1994; Sept/Oct 1:16-25.
51. Levine AJ. Tumor Suppressor Genes. *Sci Amer Science & Medicine* 1995; Jan/Febr 2: 28-37.
52. Kaelbling M, Burck RD, Atkin NB, Klinger HP. Loss of heterozygosity on chromosome 17p and mutant p53 in HPV negative cervical carcinoma. *Lancet* 1992; 340:140-142.
53. Sagae S, Kudo R, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Nihei T, Takeda T, Hashimoto M. Ras oncogene expression and progression in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Cancer* 1990; 66:295-301.
54. Riou G, Barrois M, Le MG, George M, LeDoussal V, Haie C. c-myc proto-oncogene expression and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Lancet* 1987; 1:761-

763.

55. Vecchione A, Cermele C, Giovagnoli MR, Valli C, Alimandi M, Carico E, Esposito DL, Costantini RM, Frech D. p53 expression and genetic evidence for viral infection in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1994; 55:343-348.
56. Hanson KD, Schichiri M, Follansbøe MR, Sedivy JM. Effects of c-myc expression on cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 1994; 14(9): 5748-5755.
57. Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. Myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:809-860.
58. Hesketh R. *The Oncogene Facts Book*. Academic Press, London GB. pp201-210. 1995.
59. Freytag SO. Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry in to a distinct predifferentiation state in G0/G1. *Mol Cell Biol* 1988; 8(4):1614-1624.
60. Amati B, Land H. Myc-Max-Mad a transcriptional factor network controlling cell cycle progression, differentiation and cell death. *Curr Op Genet Develop* 1994; 4:102-108.
61. Cole MD. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 1986; 20:361-384.
62. Land H, Chen AC, Morgenstern JP, Parada LF, Weinberg RA. Behavior of *myc* and *ras* oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1986; 6:1917-1925.
63. Eick D, Bornkamm GW. Expression of normal and translocated *c-myc* alleles in Burkitt's lymphoma cells: evidence for different regulation. *EMBO J* 1989; 8: 1965-1972.
64. Lu SH, Hsieh LL, Luo FC, Weinstein IB. Amplification of the EGF receptor and *c-myc* genes in human esophageal cancers. *Int J Cancer* 1988; 42:502-505.
65. Gu W, Bathia K, Magrath IT, Dang CV, Dalla-Favera R. Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107. *Science* 1994; 264:251-254.
66. Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyrtos F, Champeme MH, Gest J, Callahan R. Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1986; 83:4834-4838.
67. Rygard K, Vindelov LL, Thomsen S. Expression of *myc* family oncoproteins in small-cell lung-cancer cell lines and xenografts. *Int J Cancer* 1993; 54:144-152.
68. Collins S, Groudine M. Amplification of endogenous myc related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature* 1982; 298:679-681.
69. Lazo PA, DiPaolo JA, Popescu NC. Amplification of the integrated viral transforming genes of human papillomavirus 18 and its 5'-flanking cellular sequence located near the myc protooncogene in HeLa cells. *Cancer Res* 1989; 49:4305-4310.

- 70.** Ocadiz R., Saucedo R, Salcedo M., *et al.* Occurrence of human papillomavirus type 16 DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine-cervix carcinoma. *Arch Invest (Méx.)* 1989; 20(4): 355-362 .
- 71.** Fung YK, T'Ang A, Murphree AL, *et al.* The Rb gene suppresses the growth of normal cells. *Oncogene* 1993; 8:2659-2672.
- 72.** Picksley SM, Lane D. p53 and Rb: their cellular roles. *Curr Op Cell Biol.*, 1994; 6:853-858.
- 73.** Hinds PW, Weingerg RA. Tumor Suppressors Genes. *Curr Op Genet Develop.*, 1994; 4:135-141.
- 74.** Riley DJ, Lee EY, Lee WH. The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol.* 1994; 10:1-29.
- 75.** Hamel PA, Gallie B, Phillips RA. The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. *Trends In Genetics* 1992; 8(5): 180-185.
- 76.** Cordon-Cardo C, Richon VM. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol* 144 (3): 500-510.
- 77.** Xu HJ, Cairns P, Xu SX, Knowles MA, Benedict WF. Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlated with loss of heterozigosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer* 1993; 53:781-784.
- 78.** Xu HJ, Xu SX, Cagle PT, Moore GE, Benedict WF. Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51:2735-2739.
- 79.** Kornblau SM, Xu HJ, del Giglio A, Hu SX, *et al.* Clinical Implications of decreased retinoblastoma protein in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 199 ; 52:4587-4590.
- 80.** Benedict WF, Xu HJ, Hu SH, Takashi R. Role of the retinoblastoma gene in the initiation and progression of human cancer. *J Clin Invest*, 1990; 85:988-993.
- 81.** Sheffner M, Mürnger K, Byrne J, Howley P. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1991; 88: 5523-5527.
- 82.** Crook T, Wrede D, Tidy J, Scholefield J, Crawford L, Vousden KH. Status of c-myc, p53 and retinoblastoma genes in human papillomavirus positive and negative squamous cell carcinoma of the anus. *Oncogene*, 1991; 6:1251-1257.
- 83.** Crook T, Wrede D, Tidy JA, Mason WP, Evans DJ, Vousden KH. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet* 1992; 339:1070-1073.
- 84.** Wiman KG. The Retinoblastoma Gene: role in cell cycle control and differentiation. *FASEB J.*, 1993; 7:841-845.

85. Karantza V, Maroo A, Fay D, Sadivy JM. Overproduction of the Rb protein after the G1/S boundary causes G2 arrest. *Mol Cell Biol.* 13(11): 6640-6652, 1993.
86. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps W, Harlow E, Howley P. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989; 8:4099-4105.
87. Sheffner M, Münger K, Huibregtse JM, Howley PM. Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins. *EMBO J* 1992; 11:2425-2431.
88. Adnane J, Robbins PD. The retinoblastoma susceptibility gene product regulates myc-mediated transcription. *Oncogene* 1995; 10:381
89. Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res.* 1991; 82: 524-531.
90. Cordon-Cardo C, Waringer D, Petrylak D, *et al.* Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(16):1251-1256.
91. Presti JC, Reuter VE, Golan T, Fair WR, Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder. *Cancer Res* 1991; 51:5405-5409.
92. McCance DJ, Campion MJ, Clarkson PK, Chesters PM, Jenkins D, Singer A. Prevalence of human papillomavirus 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br J Obst & Gynaecol* 1985; 92:1101-1105.
93. Hopman E, van den Brule AJ, *et al.* Prevalence of HPV in cytologically normal cervical smears, as determined by polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* 1993; 53:919-923.
94. DeVilliers EM, Wagner D, Schneider A, Wösch H, Munoz F, Miklaw H, Zur Hausen H. Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: results of a 5-year follow-up study. *Gyneco Oncol* 1992; 44:33-39.
95. Gariglio P, Salcedo M. Molecular genetics of uterine cervix carcinoma. Involvement of C-MYC oncogene. XVII World Congress of Anatomic and Clinical Pathology. Monduzzi Editore S (Italy). 1994, pag 295-300.
96. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en la especialidad del Biología Molecular del CINVESTAV-IPN en 1991 de Mauricio Salcedo Vargas, "Estudio del oncogen c-myc y la presencia del papilomavirus humano tipo 16 en lesiones cervicales".

- 97.** Vriz S, Lemaître JM, Leibovici M, Thierry N, Méchali M. Comparative analysis of the intracellular localization of c-myc, c-fos, and replicative proteins during cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 1992; 12(8):3548-3555.
- 98.** Wrede D, Tidy JA, Crook T, Lane D, Vousden KH. Expression of RB and p53 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cells lines. *Mol Carcinog* 1991; 4:171-175.
- 99.** Schoffner M, Münger K, Byrne JC and Howley P. The state of the p63 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:5523-5527
- 100.** Crook T, Wrede D, Tidy J, Scholefield J, Crawford, Vousden KH. Status of c-myc, p53 and retinoblastoma genes in human papillomavirus positive and negative squamous cell carcinomas of the anus. *Oncogene* 1991; 6:1251-1257.
- 101.** Cordon-Cardo C, Waringer D, Petrylak D, *et al.* Altered expression of the retinoblastoma gene product: Prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(16):1251-1256.
- 102.** Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, *et al.* Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(16): 1256-1261.
- 103.** Zacksenhaus E, Bremner R, Phillips RA, Gallie B. A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. *Mol Cell Biol* 1993; 13:4588-4599.
- 104.** Salcedo M, Garrido E, Taja L, and Gariglio P. The Retinoblastoma Gene Product Negatively Regulates Cellular or Viral Oncogene Promoter *In Vivo*. *Arch Med Res* 1995; Vol 26, Suppl., S157-S162.

X. ANEXO

Original Article

The Retinoblastoma Gene Product Negatively Regulates Cellular or Viral Oncogene Promoters *In Vivo*¹

MAURICIO SALCEDO,* EFRAIN GARRIDO,**² LUCIA TAJA,**³
and PATRICIO GARIGLIO****

- * Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.
- ** División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, SSA, México, D.F.
- *** Laboratorio de Inmunología UMF, ENEP Izacala UNAM, Tlaxtepanilla, Edo. de México.
- **** Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Abstract

The protein product of the retinoblastoma tumor suppressor gene (pRb) has been demonstrated to bind transcriptional factors such as E2F and c-Myc *in vitro*. To determine whether pRb regulates both cellular (c-myc) and viral (HPV LCR) promoter activity *in vivo*, MYC-CAT or HPV LCR-CAT chimeric expression plasmids were generated and cotransfected with a pCMV-RB expression plasmid. pRb repressed both myc and LCR transcription but not SV40-CAT. Transcriptional repression induced by pCMV-RB was relieved by addition of pSV2-E7.

Moreover, immunohistochemical assays indicate that in cervical intraepithelial neoplasia lesions, an increased pRb expression correlates with decreased c-myc oncogene expression. These results suggest that pRb can negatively regulate c-myc transcription *in vivo* in both normal tissue or early cervical lesions. However, in HPV induced invasive cervical carcinomas where viral DNA is integrated expressing its oncoproteins, pRb could be complexed by HPV E7 oncoprotein releasing the repression effect and promoting cell growth. (*Arch Med Res* 1995;26:S157)

KEY WORDS: Retinoblastoma protein; myc oncogene; E7 protein; Regulation; Transcription.

Introduction

In several types of human malignant tumors the retinoblastoma (Rb) tumor suppressor gene, which normally encodes a nuclear phosphoprotein (p105Rb or pRb), is found mutated (1-3). Introduction of wild type

Rb gene into Rb-negative tumor cells *in vitro* stops cell proliferation and reverts tumorigenicity (4), suggesting that pRb acts in normal cells to inhibit growth and that its loss permits the unconstrained proliferation in characteristic of cancer cells.

Hypophosphorylated pRb predominates in G1 phase of the cell cycle (5-7), meanwhile, phosphorylated forms persist through S, G2 and M phases; when cells enter anaphase pRb dephosphorylation begins and continues to G1, reaching its lower phosphorylation level (8). Hypophosphorylated pRb can negatively regulate cycle progression by binding and reversibly inactivating several growth promoting proteins, such as E2F and c-Myc (9,10). Viral oncoproteins also bind the hypophosphorylated form of pRb (11-13) and probably cause the release of cell proliferation factors.

Correspondence to:

Dr. Patricio Gariglio, Depto. de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, Apdo. Postal 14-740, México 07000 D.F. Tel: (525) 747-7000 ext. 5313.

¹This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Mexico (N9108-0408), PNUJ (O.N.U.), UNIDO (Trieste, Italy) and Lic. Aarón Sáenz Fellowship (Mexico).

²Present address: Department of Molecular Biology, Howard Hughes Institute, Princeton University, Princeton, NJ, USA

In general, the loss of pRb function in tumor cells has been determined by biochemical techniques that do not discriminate between different cell populations in the tumoral mass; this problem can be circumvented by immunohistochemistry assays, which allow detection of altered pRb expression or decreased affinity for the nuclear compartment in specific cell populations (14,15). Actually, few reports have been published about expression of pRb in cervical tissues employing immunohistochemistry assays (16).

Human papillomavirus (HPV) infection has an important role in the development of anogenital carcinomas (17,18). High-risk HPV types (such as HPV 16 or 18) are frequently found associated with malignant uterine cervix neoplasia. In a high percentage of cervical carcinomas and cell lines derived from them, high-risk viral DNA has been found integrated into the cellular genome, with the E1-E2 gene region usually being disrupted (19-22). However, in premalignant dysplastic lesions these HPV types are frequently found in an extrachromosomal state (20). Of great basic and clinical importance has been the finding that the oncoprotein E7 encoded by high-risk HPVs interacts with the hypophosphorylated form of pRb inducing the release of growth promoting factors (13).

In uterine cervix carcinoma, both cellular gene alterations and high-risk HPV infection could represent important etiologic factors. In fact, we have reported that c-myc alterations in cervical tumors (23,24) correlate with overexpression (25). c-Myc protein is one of the proteins shown to interact with pRb *in vitro* (26). This protein plays an important functional role during cellular proliferation or differentiation (27-29). However, expression of Myc can induce both proliferation and apoptosis, and the cellular decision between these two responses is determined by other signals, such as the presence of growth factors (30,31).

In order to determine a possible relation between pRb and Myc expression, we utilized two different experimental approaches: a) to study whether pRb regulates myc or HPV-18 LCR transcriptional activity *in vivo*, myc-CAT or HPV-18LCR-CAT (having the long control region of HPV-18) chimeric expression plasmids were generated and cotransfected with a pCMV-RB (cytomegalovirus promoter-cDNA Rb gene fusion) expression plasmid. CAT assays showed a clear repression of myc transcriptional activity induced by pRb, as well as a dose-dependent repression effect on HPV-18 promoter activity; b) using immunohistochemical assays, pRb or Myc expression was detected in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions. We frequently found that in CIN lesions an increased pRb expression correlates with decreased c-myc oncogene expression, but in invasive lesions the opposite might be true. Taking together our results, we suggest that pRb can negatively regulate c-myc gene expression in normal

epithelial tissues, but during high-risk HPV infection pRb is complexed by E7 oncoprotein allowing c-myc expression and cellular growth through the release of this and other growth promoting factors. This might be an important event in the multistep nature of uterine-cervix carcinogenesis.

Materials and Methods

Cell Culture. C-33A cells were grown at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, in DMEM/F12 (1:1) medium, supplemented with 10% fetal bovine serum. The same medium was used in transfection experiments.

Genetic Constructions. The MYC-CAT (-100 to +71 DNA sequence with respect to c-myc gene P1 promoter) and pSV2-E7 (early promoter of SV40 with E7 HPV-16 gene) recombinant plasmids were obtained by A. Garcia (UNAM, Mexico); SV40-CAT (containing early promoter of SV40) and p18/42 (containing the HPV-18 LCR) constructs were obtained from F. Thierry (Institut Pasteur, France), and pCMV-RB (containing the cytomegalovirus promoter with human retinoblastoma gene cDNA) vector expression was obtained from N. Horikoshi (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA). The plasmids used are pBR322 DNA sequences-derivative.

Cell Transfection and CAT Assays. For transfection assays, 5 x 10⁵ cells were plated on 60 mm culture dishes 18 - 24 h before transfection. Fresh medium was added 1 h before transfection. Cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation method with 3 or 5 µg of the various CAT-containing reporter constructs and the amounts of Rb and E7 expression plasmids shown in Figure Legends. pBS plasmid (pBR322-derivative) was used to adjust the total amount of transfected DNA to 12 µg. All plasmids were CsCl double-banded purified. After overnight incubation with the calcium phosphate-DNA precipitates, at 37°C under 3% CO₂, fresh medium was added. Cells were incubated again for 24 h at 37°C in 5% CO₂. Cellular extracts were prepared (32) and protein amount adjusted. CAT assays were performed as previously described (33) and CAT activities quantified by cutting spots from the thin layer chromatography plates for liquid scintillation radioactivity determination.

Biopsies and Tissues. Twenty fresh CIN specimens were obtained from patients being treated at the Servicio de Ginecología, Instituto Nacional de Cancerología, SS, with abnormal PAP smear and ten normal cervical human tissues were obtained from fresh autopsies of individuals with normal PAP smear from Hospital de Ginecología y Obstetricia #4 - IMSS. All tissues were fixed and paraffin-embedded.

Immunohistochemistry Technique. Five micron slices from paraffin-embedded specimens were mounted on clean slides and deparaffinized routinely. They were preincubated in 3% H₂O₂ for 10 min, followed by a wash in water and treated with 10% non-immune blocking serum for 30 min at room temperature. Excess serum was decanted and tissues were incubated with the primary antibody for 18 h at room temperature in a moist chamber. The primary antibodies used in this study were the polyclonal anti-pRb C-15 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), which is raised against a 15 aa peptide mapping within the carboxy terminal domain of the human pRb, and the monoclonal antibody anti-myc 1 which also recognizes a Myc carboxy terminal peptide (408-439) (Oncogene Sciences, Inc.).

Subsequently, the slides were incubated with link antibody (rabbit anti-mouse 1:100 in the case of Myc or goat anti-rabbit 1:200 in the case of pRb) for 30 min, PBS washed and incubated with mouse or rabbit peroxidase anti-peroxidase complex (DAKO PAP kit) for 30 min. Finally, 0.06% diaminobenzidine (DAB) in 3% H₂O₂ was applied on tissues monitoring the reaction under light microscope. For pRb and Myc protein detection, specific staining was identified by the presence of brownish color. In each case the sections were hematoxylin counterstained.

Results

The Retinoblastoma Gene Product (Rb) Can Repress the Expression of the HPV-18 LCR and c-myc

To study the possibility that Rb tumor suppressor gene products could participate in HPV gene expression regulation during initial events post-infection, we analyzed the *in vivo* participation of pRb on HPV-18 E6 and E7 oncogene expression. Transient cotransfection assays were performed in the C-33A cell line (a cervical carcinoma derived cell line without HPV and presenting a deletion in the Rb gene and a mutation in the p53 gene) with a construct that possesses the HPV-18 LCR cloned in front of the CAT reporter gene, and an expression construct in which the cDNA from the human Rb gene was placed under the control of a strong CMV promoter (pCMV-RB). We also evaluated pRb effect on c-myc or SV40 early promoters. We observed a dose-dependent repressor effect of pRb on the HPV-18 early promoter (p105) transcriptional activity (Figure 1). It can be observed that the c-myc promoter was strongly inhibited and the SV40 early promoter was unaltered.

Several viral oncogenic products (the adenovirus E1A protein, SV40 large T antigen and HPV E7 protein) have been reported to physically interact with pRb and to block its activity. We analyzed the possibility that the E7 protein could affect the repression induced by pRb on the

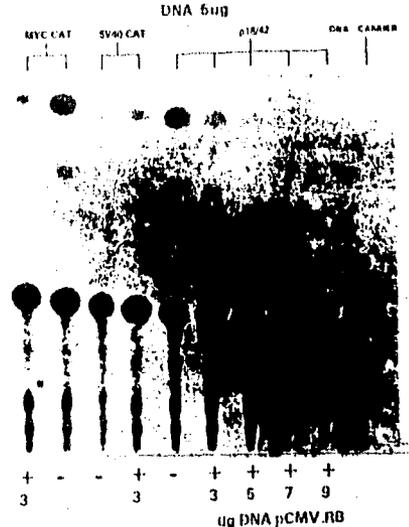


Figure 1. pRb effect on HPV-18 LCR. C-33A cells were cotransfected by calcium phosphate method with constructs containing c-myc, SV40 early or p105 (18/42) from HPV-18 promoters, cloned in front of the CAT reporter gene, and expression plasmid pCMV.RB (amounts indicated on the Figure). Lane 10 only DNA carrier (pBS plasmid). Cellular extracts were obtained 40-48 h after transfection assay and CAT activity evaluated as indicated under Materials and Methods.

c-myc promoter. Series of multiple cotransfection assays were performed by adding to the system the pSV2-E7 plasmid that allows high level HPV-16 E7 protein expression in eukaryotic cells. As expected, c-myc transcriptional repression induced by pCMV-RB was relieved by addition of pSV2-E7 (Figure 2). In both experiments (Figures 1 and 2) c-myc was clearly repressed.

Immunodetection of pRb and Myc Proteins in Cervical Tissues

Stratified squamous epithelium (cervical epithelium) is composed of discrete cell layers, including a basal layer of germinal cells that gives rise to several layers of differentiating and terminally mature cells (34). We found that cells of the normal cervical tissues expressed different amount of pRb in distinct cell layers, with basal/suprabasal or suprabasal staining frequently observed in most cases (data not shown). These observations are in agreement with recently published results (16).



Figure 2. HPV E7 release the pRb repression on c-myc promoter. C-33A cells were cotransfected by calcium phosphate method with a construct that contains the c-myc promoter in front of the CAT reporter gene, and increasing concentration of pCMV-RB. A multiple cotransfection assay with the addition of the expression plasmid pSV2-E7 (overexpresses E7 viral oncoprotein) was included. When p105 (18/42) from HPV-18 was employed instead of the c-myc promoter, a similar pRb inhibition and E7 release in CAT activity was obtained (not shown).

All the precancerous cervical lesions were positive for pRb, presenting predominantly nuclear staining (Figure 3). In general, the reaction appeared more pronounced in CIN than in normal cervical epithelium (not shown). Surprisingly, the results suggest that enhanced pRb expression is usually found in less differentiated cells of CIN lesions. In invasive cancerous lesions we observed in general reduced expression of pRb among a heterogeneous pRb expression pattern (M. Salcedo, in preparation).

For Myc, nuclear stain was observed frequently in cell nuclei (Figure 3). Interestingly, we found that many pRb positive cells presented c-Myc negative staining, and vice versa (compare c-Myc vs. pRb staining in Figure 3).

All samples were analyzed for the presence of HPV DNA sequences using PCR reaction. The results indicated HPV DNA sequences in all CIN samples, and in approximately 30% of the normal tissues employed (not shown).

Discussion

We have shown that *in vivo* pRb is capable of repressing the expression of both cellular (c-myc) and viral



Figure 3. Differential expression of c-Myc or pRb proteins in a cervical lesion. Serial tissue sections of a CIN lesion positive to high-risk HPV were used to perform PAP immunostain assays, for c-Myc or pRb as described under Materials and Methods. Brownish color shows a positive reaction. c-Myc staining (left) and pRb staining (right). The arrowheads show positive nuclear pRb and c-Myc stain; the arrows show a c-Myc positive reaction (left panel) and negative pRb reaction (right panel), x400 original amplification. The tissue sections were hematoxylin counterstained.

(E6, E7) oncogenes. Thus, Rb gene alterations or pRb inactivation could lead to oncogene activation. Recent studies showed that pRb is mutated in HPV-negative cervical carcinoma cell lines and wild type in HPV-positive cervical carcinoma cell lines (35). In HPV-negative cervical carcinoma cell lines, abnormal pRb expression has been observed despite grossly normal structure of the Rb locus. In addition, small mutations occurring in the Rb-1 locus result in expression of smaller or abnormally phosphorylated Rb proteins which have lost wild type function (36,37). HPV E7 can interact with pRb and the related proteins p107 and p130 and this binding activity correlates with cellular transformation. Binding of E7 to pRb requires at least two distinct contact sites: the high affinity interaction between the E7 CR2 domain and the Rb "pocket" region, and the interaction between the E7 CR3 domain and the COOH-terminal region of pRb. The latter interaction is sufficient for E7 dependent pRb release of E2F. These data suggest that inactivation of pRb and related proteins p107 and p130, either by mutation or through association with E7 is an important step in cervical carcinogenesis (38). Thus it seems likely that the higher pRb binding efficiency characteristic of high-risk E7 proteins would be an

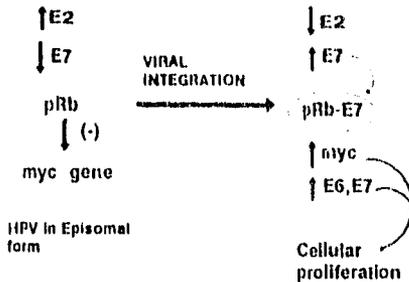


Figure 4. Model of early events involving high-risk HPV in cervical carcinogenesis. HPV in episomal form is present in premalignant lesions allowing E2 expression and E7 repression. *c-myc* is repressed by pRb in a normal manner. After high-risk HPV DNA integration, E6 and E7 expression is enhanced (E2 disrupted), and pRb-E7 complexes are formed releasing *c-myc* repression. Thus, both *c-myc* and other growth promoting molecules (E2F) will permit cellular proliferation. In parallel with these events, p53 is destroyed by E6 overexpression (not shown).

important determinant involved in human keratinocyte transformation.

Our results showed that *c-myc* transcriptional repression by pRb is relieved *in vivo* by addition of HPV E7. Very recently, Adnane et al. (26) have shown that pRb regulates *myc*-mediated transcriptional control *in vivo*; however, this cell-type specific effect occurs through protein-protein interactions. Thus, pRb blocks both *c-myc* transcription and Myc function as transcriptional factor.

In this work we have determined by immunohistochemistry assays pRb expression in human cervical tissues. This technique is convenient to study Rb gene expression in primary tumors and neoplastic lesions *in vivo*, if suitable antibodies are readily available. Thus far, relatively few immunohistochemical studies on pRb expression have been published (39,40). We were able to detect pRb in human cervical tissues by using the polyclonal anti-pRb antibody C-15, which recognizes a region of the carboxy terminal domain of both hypophosphorylated and hyperphosphorylated forms of human Rb protein (11). In general, we observed that most cells either in normal or CIN presented nuclear and/or cytoplasmic pRb staining. Several reports have been published indicating mainly nuclear pRb staining with cytoplasmic staining has been unregarded (for review see Reference 41). Different assays have demonstrated that presence of pRb in the cellular cytoplasm is related to Rb gene mutation (42). Thus, a positive cytoplasmic sample could indicate that the Rb gene is altered or that its product is somehow retained in the cytoplasm. Our

observations suggest that cytoplasmic reaction could be an important fact related to uterine cervix carcinogenesis.

Among the known cellular oncogenes, *c-myc* is one of the most frequently found in a variety of human tumors and cell lines derived from tumors. Both HPV DNA and *c-myc* alterations (23,24), which correlate with *c-myc* overexpression (25) are involved in the development of a high percentage of uterine cervix carcinomas. As shown in Figure 3, variation of positive immunoreaction to *c-Myc* protein could be observed in all layers of the epithelium mainly in the basal layer of CIN lesions. It is important to mention that in HPV-positive CIN samples there were pRb negative/*c-Myc* positive cells, and vice versa (Figure 3). Thus, as determined in this work, the same suppressor effect of pRb on *c-myc* expression was detected in both CAT-assays and immunohistochemistry, suggesting that pRb repression effect is present early in cervical carcinogenesis. However, in a few samples we have detected cells expressing both pRb and *c-Myc*. In these cases perhaps the interaction between the proteins has been altered.

All the CIN samples were positive for HPV sequences using PCR reaction, and according to our observations, the level of pRb expression as well as the nuclear or cytoplasmic distribution does not strictly correlate to the presence of HPV-16 and HPV-18 DNA sequences.

The results support the idea that in HPV positive lesions *c-myc* repression released by pRb-E7 protein complexes could explain in part the Myc overexpression observed in cervical intraepithelial neoplasias (see Figure 4, model of cervical carcinogenesis).

Acknowledgments

The authors would like to thank Biol. Pedro Chávez for art work, MC Cristina Castañeda, QFI Teresa Hernández, and Biol. Violeta Ibarra for technical assistance.

References

1. Friend SH, Horowitz JM, Greider MR, Wang XF, Bogenmann E, Li FP, Weinberg RA. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9059.
2. Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kay FI, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2775.
3. Cheng J, Scully P, Shew JY, Lee WH, Via V, Haas M. Homozygous deletion of the retinoblastoma gene in an acute lymphoblastic leukemia (T) cell line. *Blood* 1990; 75:730.
4. Huang HJ, Yee JK, Shew JY et al. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the *rb* gene in human cancer cells. *Science* 1988; 242:1563.
5. Chen PL, Scully JY, Shew JY, Wang I, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58:1193.

6. Lin BTY, Gruenwald AO, Motta WII, Lee WH, Wang JY. Retinoblastoma cancer suppressor gene product is a substrate of the cell cycle regulator cdc2 kinase. *EMBO J* 1991; 10:857.
7. DeCaprio JA, Furukawa Y, Ajechenbaum F, Griffin JD, Livingston D. The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:1795.
8. Ludlow JW, Glendening CL, Livingston DM, DeCaprio JA. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 1993; 13:367.
9. Shirodkar S, Ewen M, DeCaprio JA, Morgan J, Livingston DM, Chittenden T. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* 1992; 68:157.
10. Rustgi AK, Dyson NJ, Bernards R. Amino-terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature (London)* 1991; 352:541.
11. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Rayback M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature (London)* 1988; 334:124.
12. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988; 54:275.
13. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243:934.
14. Benedict WF, Xu JJ, Hu SX, Takahashi R. The role of the retinoblastoma gene in initiation and progression of human cancer. *J Clin Invest* 1990; 85:988.
15. Geradts J, Hu SX, Lincoln CE, Benedict WF, Xu JJ. Aberrant RB gene expression in routinely processed, archival tumor tissues determined by three different anti-RB antibodies. *Int J Cancer* 1994; 58:161.
16. Cnolou-Cardo C, Richon VM. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol* 1994; 144:500.
17. zur Hausen H. Viruses in human cancer. *Science* 1991; 254:1173.
18. Pfister H. Human papillomavirus and genital cancer. *Adv Cancer Res* 1987; 48:113.
19. Baker C, Phelps WC, Lindergerm M, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987; 61:962.
20. Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissman L. The physical state of human papillomavirus type 16 in benign and malignant genital tumors. *J Gen Virol* 1985; 66:1515.
21. Matsukura T, Kanda T, Furuno A, Yoshikawa H, Kawana T, Yoshiike K. Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J Virol* 1987; 61:962.
22. Schwarz B, Freese UK, Gissman L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremblau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma. *Nature (London)* 1985; 314:111.
23. Ocádiz R, Saucedo R, Cruz M, Graef A, Gargilio P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and uterine cervix carcinoma. *Cancer Res* 1987; 47:4173.
24. Gargilio P, Ocádiz R, Saucedo R. Human papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells, Papillomavirus, CIL* 1987; 5:343.
25. Gargilio P, Saucedo M. Molecular genetics of uterine cervix carcinoma. Involvement of c-myc oncogene. XVII World Congress of Anatomic and Clin Pathol. Monduzzi Editore. Santocoy G. Ed. Int Proc Div. Bologna, Italy, 1993:295.
26. Adnane J, Robbins PD. The retinoblastoma susceptibility gene product regulates myc-mediated transcription. *Oncogene* 1995; 10:381.
27. Cole MD. The c-myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 1986; 20:361.
28. Holt JT, Redner RL, Nienhuis AW. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* 1988; 8:963.
29. Seth A, Gupta S, Davis RJ. Cell cycle regulation of the c-myc transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 1993; 13:4125.
30. Bissunnetta RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature (London)* 1992; 359:552.
31. Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ et al. Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 1992; 257:217.
32. Herbolom P, Bouachou B, Yaniv M. Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell* 1984; 39:653.
33. Gorman CM, Moffat LF, Howard BH. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1982; 2:1014.
34. Fuchs E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 1990; 111:2807.
35. Wrede D, Tuly JA, Crook T, Lane D, Voutsden KH. Expression of RB and p53 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cell lines. *Mol Carcinogen* 1991; 4:171.
36. Horowitz JM, Yandell DW, Park SH, et al. Point mutational inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene. *Science* 1989; 243:937.
37. Mori N, Yokota J, Akiyama T, Saiteshima Y, Okanoy A, Mizoguchi H, Toyoshima K, Sugimura T, Terada M. Variable mutations of the RB gene in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 1990; 5:1713.
38. Defeo-jones D, Huang PS, Jones RE, Haskell KM, Vuccolo GA, Hanabick MG, Huber HH, Oloff A. Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991; 352:251.
39. Cance WG, Brennan MF, Dudas ME, Huang CM, Cordon-Cardo C. Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N Engl J Med* 1990; 323:1457.
40. Cordon-Cardo C, Waringer D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE. Altered expression of the retinoblastoma gene product is prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1251.
41. Shew JY, Ling N, Yang X, Fodstad O, Lee WH. Antibodies detecting abnormalities of the retinoblastoma susceptibility gene product (p110^{RB}) in osteosarcomas and synovial sarcomas. *Oncogene Res* 1989; 1:205.
42. Hinds PW, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 1992; 70:993.