

50524  
65



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

IDENTIFICACION DE LA EXPRESION DEL ONCOGEN E6 DEL  
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 EN EPITELIOS  
DE RATONES TRANSGENICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
ALBERTO MARROQUIN CHAVIRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2003.



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**JURADO:**

**PRESIDENTE:** DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

**VOCAL\*:** DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL

**SECRETARIO:** Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS

**SUPLENTE:** Q.F.B. FCO. JAVIER PARADA GARCÍA

**SUPLENTE:** Q.F.B. HUGO LEYNEZ CELISEO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

### A MI FAMILIA

Tatos y Babidis por que ellos han sido un gran estímulo para llevar esto a su fin. A Alejandra que también participó de alguna manera en esto.

### A MIS PADRES

A Juanandro "Malos modos" y Rosalinda "Doña Rosa". Por que sin presionar tuvieron más paciencia que yo.

### A MIS HERMANOS

Para los que si creyeron y porque no, para los que no también

### A ALGUNOS COMPAÑEROS DE LA ESCUELA

Miguel, Salvador, José Luis, Armando, Sinuhe, Marcos y hasta Carlos, todos con sus respectivas esposas. Por la amistad que después de los años nos mantiene en comunicación.

### A LOS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO QUE ESTUVIERON Y YA NO, Y LOS QUE AUN SIGUEN

Por esos momentos grandes y de gran susto; Pedro, Jave, Choracio, Armando, Jorge, Kihurrio, El Lindo, El Charro, Elba, Jazmín, El polo y Luz Ma.

### A PERSONAS DE OTROS LABORATORIOS

Ruth; Por su especial apoyo y amistad, Reina; sus enseñanzas en ejidos y Paty su apoyo en imágenes y presentación.

### A UNOS PRIMOS

Por que son de esa gente que nunca creé en la familia.

### A OTRO PRIMOS

Que no son de la gente anterior.

*Al Dr. Patricio Gariglio V.*

*Por las facilidades para realizar mi trabajo experimenta en su laboratorio.*

*A Enrique García Villa*

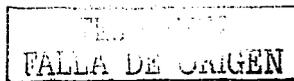
*Por su valiosa ayuda técnica.*

*A Guadalupe Villasana*

*Por su apoyo en el mantenimiento del material del laboratorio.*

*Al QBP Gustavo Miranda Contreras*

*Por los comentarios sobre mi trabajo, por asesorarme y por la presión ejercida.*



## INDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	3
2.1. Virus del Papiloma Humano (HPV)	3
2.2. Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) y HPV	6
2.3. Oncogenes, Antioncogenes y Cáncer	8
2.4. Ratones Transgénicos	9
3. Planteamiento del Problema	11
4. Objetivo General	12
4.1. Objetivos Particulares	12
5. Hipótesis de Trabajo	13
6. Diseño de Investigación	14
6.1. Diagrama de flujo	14
6.2. Material y Métodos	15
6.2.1. Materiales de Laboratorio	15
6.2.2. Material Biológico	17
6.2.2.1. Ratones Silvestres CD1	17
6.2.2.2. Ratones Transgénicos( K6-E6/E7)M8	17
6.2.3. Obtención de Muestras de Ratones	17
6.2.4. Proceso para Inclusión de los Tejidos en Parafina	17
6.2.5. Análisis Histológico	18
6.2.5.1. Proceso de Cortes de Tejidos	18
6.2.5.2. Tinción con Hematoxilina y Eosina	18
6.2.6. Inmunohistoquímicas	18
6.2.6.1. Inmunohistoquímica contra E6	19
6.2.6.2. Inmunohistoquímica contra Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)	20
6.2.6.3. Apoptosis <i>in situ</i> (TUNEL)	20
6.2.7. Extracción de DNA Genómico de Muestras Biológicas	20

6.2.8.	Reacción en Cadena por la Polimerasa (PCR)	20
6.2.8.1.	PCR para E6 y E7 Integrado en el Genoma del Ratón Tg(K6-E6/E7)M8.	21
6.2.8.2.	RT-PCR <i>in vitro</i>	22
6.2.8.3.	Extracción de RNA total	22
6.2.8.4.	Síntesis de DNA Complementario (cDNA)	23
6.2.8.5.	PCR con cDNA	24
6.2.9.	PCR y RT-PCR <i>in situ</i>	25
6.2.9.1.	Pretratamiento de las Muestras	25
6.2.9.2.	Síntesis <i>in situ</i> de cDNA	25
6.2.9.3.	PCR <i>in situ</i>	25
6.2.10.	Western Blot	26
6.2.10.1.	Extracción de Proteínas del Material Biológico	26
6.2.10.2.	Electroforesis de Proteínas	27
6.2.10.3.	Electrotransferencia	27
6.2.10.4.	Inmunodetección de la Proteína E7	27
6.3.	Tipo de Estudio	28
6.4.	Población	28
6.5.	Criterios	28
6.5.1.	De Inclusión	28
6.5.2.	De Exclusión	28
6.5.3.	De Eliminación	28
6.6.	Variables	28
7.	Resultados	29
8.	Análisis de Resultados	41
9.	Conclusiones	45
10.	Propuesta y/o Recomendaciones	46
11.	Referencias	47
12.	Anexos	51
A	Pies de Figuras	51
B	Preparación de Reactivos	54

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mapa Genómico del Papilomavirus Humano tipo 16 y Esquema de Epidermis.....	5
Figura 2	Mapa de Integración del Papilomavirus Humano al Genoma Celular.....	9
Figura 3	Esquema de Contrucción Transgénica.....	10
Figura 4	Hematoxilina y Eosina de Epitelios de Cérvix y Lengua de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	31
Figura 5	Inmunohistoquímica contra E6 en Lengua de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	32
Figura 6	Inmunohistoquímica contra E6 en Cérvix de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	33
Figura 7	RT-PCR <i>in situ</i> para E6/E7 en Lengua de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	34
Figura 8	PCR <i>in situ</i> para E6/E7 en Lengua de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	35
Figura 9	PCR <i>in vitro</i> para E6/E7 con ADN de Epitelios de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	36
Figura 10	RT-PCR <i>in vitro</i> para E6/E7 con ADN Epitelios de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	36
Figura 11	Inmunohistoquímica contra PCNA en Cérvix de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	37
Figura 12	Inmunohistoquímica contra PCNA en Lengua de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	38
Figura 13	TUNEL en Lengua de Ratones Tg (K6-E6/E7) M8 y Wt CD1.....	39
Figura 14	Western Blott contra E7.....	40

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	PCR Condiciones de Reacción para E6/E7.....	22
Tabla 2	Reactivos para Síntesis de DNA Complementario.....	23
Tabla 3	PCR Condiciones de Reacción para $\beta$ -Actina.....	23
Tabla 4	Lista de Oligonucleotidos Empleados.....	23

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## GLOSARIO

Ab(s)	Anticuerpo(s)
bK6	Promotor bovino de queratina 6
B	Bam HI
bp	pares de bases
CaCu	Cáncer Cérvicouterino
cDNA	Ácido Desoxiribonucleico Complementario
CD1	Ratones Silvestres CD1
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotidotrifosfato
EDTA	Etilendiamintetracetato
EV	Epidermoplasia Verruciforme
E1	gen E1 del HPV
E2	gen E2 del HPV
E4	gen E4 del HPV
E5	gen E5 del HPV
E6	Oncogén E6 del HPV
E7	Oncogén E7 del HPV
HPV	Virus del Papiloma Humano
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Agua bidestilada
IHQ	Inmunohistoquímica
K	Kpn I
KCl	Cloruro de potasio
LCR	Región larga de control
L1	gen L1 del HPV
L2	gen L2 del HPV
MB	Membrana basal
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mRNA	Mensajero del ácido ribonucleico
Mw	Molecular weight; en ingles
NMSC	Cáncer de piel no-melanómico
O/N	over night en ingles
pA	Señal de poliadenilación
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCNA	Antígeno de proliferación celular
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBS-Tween	Amortiguador de fosfatos con Tween 20
p53	Proteína 53
pRb	Proteína Rb
P97	Promotor temprano del HPV
R	Eco RI
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, en ingles
SCCs	Carcinomas de células escamosas
TA	Temperatura Ambiente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tg	Ratones transgénicos
Tm	Temperatura media de alineamiento
TR	Transcriptasa Reversa
tris-HCl	Clorhidrato de tris-(hidroximetil)aminometano
TUNEL	TdT-mediated dUTP-X Nick End Labeling; en ingles
UV	Luz ultravioleta
V	Eco RV
Wt	Wild type ; en ingles

## **RESUMEN**

Las Oncoproteínas E6 y E7 de los Virus del Papiloma Humano (HPV) de alto riesgo son capaces de transformar células en cultivos y de inducir formación de tumores *in vivo* (E6 trabaja degradando a la proteína p53 y E7 actúa inhibiendo a la proteína pRb). En el presente estudio se emplearon ratones transgénicos con los oncogenes E6 y E7 de HPV16, el cual es considerado uno de los tipos virales más agresivos en el desarrollo del cáncer cérvicouterino (CaCu). Con el objetivo de obtener un modelo de cáncer experimental, se desarrollaron ratones transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8, capaces de expresar las proteínas E6 y E7 del HPV16. Para caracterizar estos ratones, se realizaron ensayos de histología, inmunohistoquímica y de biología molecular, detectando la expresión de las oncoproteínas virales en epitelios de ratones transgénicos. Los resultados obtenidos nos indican que los ratones transgénicos son un modelo experimental valioso para estudio de algunos cánceres epiteliales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# 1 INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de la sociedad industrial y el aumento del promedio de vida de la población, las enfermedades neoplásicas han pasado a ocupar un lugar importante como causa de muerte en la mayoría de los países del mundo. Contrariamente a lo que pasa con las enfermedades bacterianas y parasitarias, a partir de 1965, las tendencias de mortalidad de las enfermedades crónico-degenerativas en México han mostrado un patrón ascendente. En la actualidad, el cáncer en México ocupa, junto con las enfermedades cardiovasculares, los primeros lugares como causa de muerte en la población mexicana, siendo el Cáncer Cérvicouterino (CaCU) el de mayor incidencia. A pesar de los esfuerzos realizados recientemente en el país para controlar el CaCU, este sigue representando un serio problema personal y familiar, con aproximadamente 30% de todos los tumores de la mujer. Así, las estadísticas indican que al menos una mujer mexicana muere por esta neoplasia cada 2 horas y que cada vez son más jóvenes las pacientes afectadas (1). El CaCU constituye además un serio problema socioeconómico, ya que afecta a personas en edad productiva y su tratamiento tiene un costo elevado. Datos epidemiológicos y de biología molecular ubican al Virus del Papiloma Humano (HPV) como un factor de riesgo importante principalmente los tipos 16 y 18.

Los HPVs expresan constitutivamente las oncoproteínas E6 y E7 producidas en células tumorales cervicales, la expresión de estas proteínas es requerida para mantener a las células en un estado transformado. La proteína E6 induce la degradación de p53, mientras que la proteína E7 se une e inhibe la actividad de la proteína Rb; puesto que determinar esto *in vivo* en humanos es verdaderamente complejo, se han desarrollado modelos *in vivo* no humanos que nos ayuden a solucionar problemas de salud humana.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Virus del Papiloma Humano.

El virus del papiloma humano (HPV) se encuentra dentro de la familia de los *Papovavirus* (2,3), tienen una cápside icosaédrica compuesta principalmente por la proteína L1 y, en menor medida por la proteína L2. El genoma viral es una cadena doble de DNA circular de alrededor de 8 Kb, que contiene seis genes de expresión temprana (del inglés Early; E1, E2, E4, E5, E6, E7), dos de expresión tardía (del inglés Late; L1, L2) y una región reguladora conocida como región larga de control (LCR) (Figura 1A), en la LCR encontramos tanto el origen de replicación como las regiones promotoras (por ejemplo P97 de HPV16 y P105 de HPV18). El genoma de HPV contiene un sitio de multiplicación nuclear y su información genética está localizada exclusivamente en una sola cadena; sin embargo, una vez que se ha integrado en el genoma celular, se compacta con histonas del huésped formando nucleosomas encapsulados en el interior de la cápside, misma que consta de 72 capsómeros (4,5). Se conocen más de 70 tipos de HPV, que se pueden encontrar en diferentes partes del cuerpo y aproximadamente 20 de ellos han sido encontrados en la región anogenital. Algunos tipos virales como los tipo 6 y 11 se presentan en lesiones benignas como; el condiloma acuminata, rara vez en lesiones malignas, por esta razón se les conoce como HPV de bajo riesgo. Los HPV de alto riesgo son los tipos 16 y 18 por su alto porcentaje de presencia y agresividad en los CaCU y finalmente los tipos 31, 33, 51, y 52 son considerados como de riesgo intermedio, porque su material genético se localiza en neoplasias malignas con menos frecuencia que los tipos 16 y 18 (6).

Los HPV infectan células epiteliales del estrato basal (Figura 1B), que son indiferenciadas y tienen la capacidad de dividirse; en condiciones normales algunas de las células de la capa basal dejan de dividirse, migran hacia la superficie del epitelio, y se diferencian hasta morir. La replicación del material genético viral, la expresión de sus genes, las síntesis de proteínas de la cápside, el ensamblado y liberación de la partícula viral para infectar otros individuos, dependen totalmente de este proceso de diferenciación y muerte de las células epiteliales; por ejemplo en las células de la capa basal no hay replicación del

genoma viral. En las células que abandonan la capa basal se expresan los genes tempranos E6 y E7 pero estos no se transcriben en las células diferenciadas, es hasta en el estrato granuloso (la capa de células epiteliales que se encuentra inmediatamente bajo del estrato corneo que es el más superficial) donde se observa replicación del DNA viral y síntesis de proteínas de la cápside. Tanto *in vivo* como *in vitro* (sistemas de cultivo organotípicos), la formación de partículas virales está restringida a las células diferenciadas (7-9).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

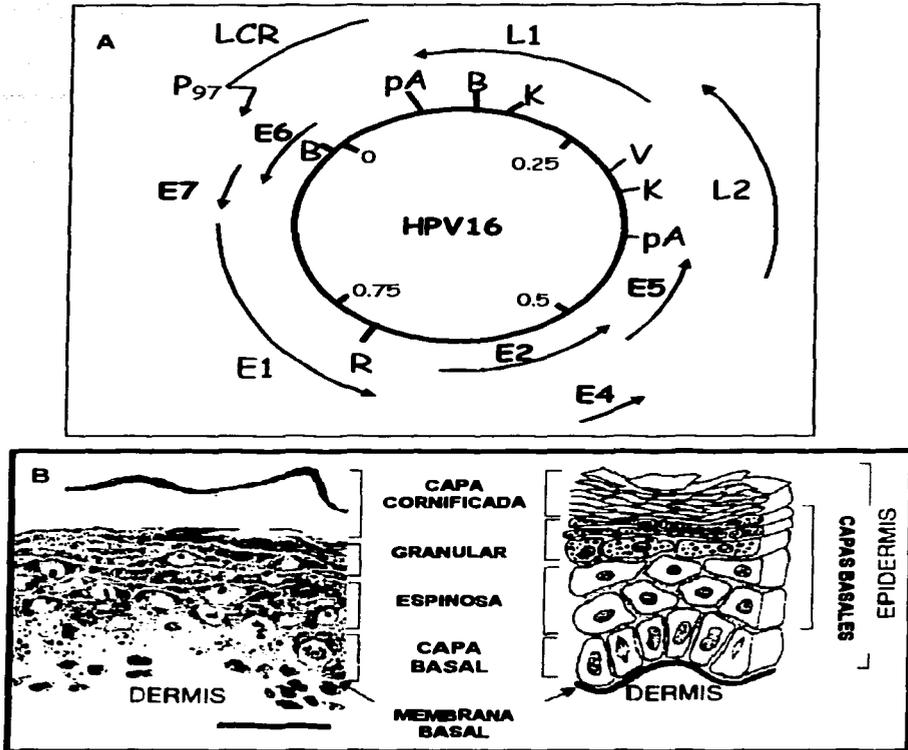


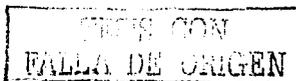
Figura 1. A) Mapa genético del HPV 16. El genoma del papilomavirus contiene aproximadamente 8 Kb, es de doble cadena, contiene toda la información genética en una sola cadena, y está dividido en genes tempranos (E) y tardíos (L) y una región larga de control (LCR). pA, señal de poliadenilación. B Bam HI; R, Eco RI; K, Kpn I; V, Eco RV son sitios de restricción del HPV. P<sub>97</sub> es el promotor temprano. (Gariglio P. Genética molecular del cáncer humano. Ciencia y desarrollo. 1995; 120 p. 69.) y B) Esquemática de la conformación celular del epitelio, donde se muestran las diferentes capas celulares : basal, espinosa, granular y cornificada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.2 Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) y HPV.

El CaCU constituye aún la principal causa de mortalidad entre las mujeres mexicanas con cáncer. En 1999, en México se diagnosticaron más de 11,000 casos nuevos de CaCU invasor y más de 9,000 casos de cáncer *in situ*. Solamente en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México, se presentan cada año más de 850 casos nuevos, la mayoría de los pacientes ingresan con enfermedad avanzada, con un mal pronóstico y representan una enorme pérdida de recursos humanos y económicos para el país (1). El desarrollo de CaCU está estrechamente relacionado con las infecciones persistentes que producen algunos tipos de HPV, a la fecha se han identificado ya cerca de 200 tipos distintos de HPV; de los 100 tipos clasificados hasta ahora, cerca de la tercera parte infecta las regiones genitales (10). De ellos existe un conjunto de tipos de HPV, denominados de "alto riesgo", los cuales se asocian de manera directa con el desarrollo de las neoplasias genitales, en particular los tipos 16 y 18, que se encuentran en el 80-90% de los cánceres invasores del cérvix y junto con los tipos 31, 33, 35, 45 y 58 alcanzan más del 95% de presencia en las diferentes displasias cervicales. De hecho, actualmente se consideran a las infecciones por estos tipos virales como necesarias (pero no suficientes) para el desarrollo de CaCU (11). Así pues, la historia natural de las infecciones por HPV de alto riesgo influye de manera directa en el curso y el pronóstico del CaCU y las infecciones persistentes por estos se asocian claramente con un mayor riesgo para desarrollarlo, aunque no debemos olvidar que existen otros factores de riesgo importantes para el desarrollo de esta enfermedad.

Los HPVs de alto riesgo codifican dos oncoproteínas, E6 y E7, las cuales inactivan la función de las proteínas supresoras de tumor p53 y retinoblastoma, respectivamente (12-14) y se ha demostrado que inmortalizan células en cultivo. Sin embargo, en el epitelio escamoso del cérvix humano, la mayoría de las lesiones que contienen HPVs de alto riesgo no progresan hacia carcinoma invasor o *in situ* (15,16), asociándose a éstos algunos cofactores ya sea ambientales o genéticos (mutaciones) en aquellos casos en donde ocurre una progresión tumoral, por ejemplo, tanto el humo del cigarro como la predisposición genética



han sido relacionados a la carcinogénesis cervical asociada con HPVs de alto riesgo (17,18). Otro cofactor que ha sido repetidamente asociado con neoplasias y HPV es la exposición a los estrógenos. Parece ser que el embarazo es un ambiente permisivo para una infección permanente con HPV (19), mientras que ha sido demostrado que el uso prolongado de anticonceptivos, la mayoría de los cuales contienen estrógeno, duplica el riesgo de neoplasia asociada a HPVs (20). Además de su papel en el desarrollo de cánceres de tipo anógeno, los HPVs están cercanamente asociados con cánceres cutáneos en pacientes con una enfermedad rara denominada Epidermoplastia Verruciforme (EV, 21-23). Estos individuos están propensos a infecciones con tipos específicos de HPVs y regularmente desarrollan carcinomas de células escamosas (SCCs) los cuales frecuentemente albergan HPVs tipo 5 y 8. Los cánceres en individuos con EV ocurren predominantemente en sitios del cuerpo expuestos a la luz solar, apuntando hacia la luz ultravioleta (UV) como cofactor en esta enfermedad (24). Otro papel que ha sido propuesto para los HPVs en el desarrollo de cáncer de piel no-melanómico (NMSC del inglés; Non Melanomic Skin Cancer) en individuos tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos, así como los receptores en transplantes de órganos (25-28). De manera interesante, estos individuos también desarrollan NMSC en sitios expuestos a UV (29). Así, los oncogenes E6 y E7 de HPV son necesarios pero no suficientes para la transformación maligna, cooperando también alteraciones genéticas adicionales en el desarrollo de un fenotipo maligno completo. La región temprana de los HPVs de alto riesgo codifica para las proteínas oncogénicas E6 y E7, para proteínas que se necesitan en la replicación del genoma viral y para una proteína (E2) que actúa como represor de la transcripción de los oncogenes virales (E6, E7) (30). La inhibición de p53 por la acción de la oncoproteína E6 abate la apoptosis (31-33), altera la estructura superior de la cromatina (34) y causa inestabilidad genómica (35-37), la cual conduciría a la alteración de diversos genes implicados en cáncer.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.3 Oncogenes, Antioncogenes y Cáncer.

Con el descubrimiento de los oncogenes y de sus genes precursores normales: los protooncogenes, se ha podido explicar el cáncer a nivel molecular. Debido a que los oncogenes son genes celulares mutados, ofrecen una indicación clara de los blancos genéticos que los agentes cancerígenos alteran. Los protooncogenes codifican factores de crecimiento, receptores a dichos factores, transductores de señales y proteínas nucleares que actúan como factores de replicación y transcripción activando genes clave para el crecimiento celular normal. Los protooncogenes mutados pueden transformarse en oncogenes activados; entre las alteraciones más frecuentes tenemos: mutación puntual, rearreglo génico y amplificación. La primera indicación de que los oncogenes participan en las diferentes etapas de desarrollo de un tumor maligno derivó de estudios de virus oncogénicos, algunos de los cuales poseen dos oncogenes que cooperan para inducir un fenotipo completamente tumorigénico. En el CaCU participan los oncogenes de los HPV de alto riesgo (**21,38**). La región temprana del genoma viral que codifica para las proteínas oncogénicas E6 y E7 y para la proteína E2 que, al unirse a sitios E2BS de la región promotora viral llamada LCR, actúa como inhibidor transcripcional de los oncogenes virales en HPV genitales de alto riesgo, pero activa aquella de los HPV cutáneos (**39, 40**). Entre las evidencias que indican que algunos HPV están involucrados causalmente en CaCU, tenemos: 1) El DNA viral se encuentra en 80-90% de dichos tumores, 2) El DNA de HPV se integra al genoma celular, rompiéndose e inactivándose el gen E2 y favoreciendo la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (figura 2), 3) Los oncogenes de HPV 16 o 18 son capaces de inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos, pero necesitan la cooperación del oncogén **ras** para transformarlos, además, al cultivar durante tiempos largos las células inmortalizadas por E6 y E7, éstas dan origen a clonas malignas, lo que sugiere que un gen celular se modifica en dichos cultivos y 4) Las oncoproteínas virales E6 y E7 destruyen la actividad de las proteínas antioncogénicas p53 y pRb, respectivamente (**41**), con lo que se facilita el desarrollo del CaCU.

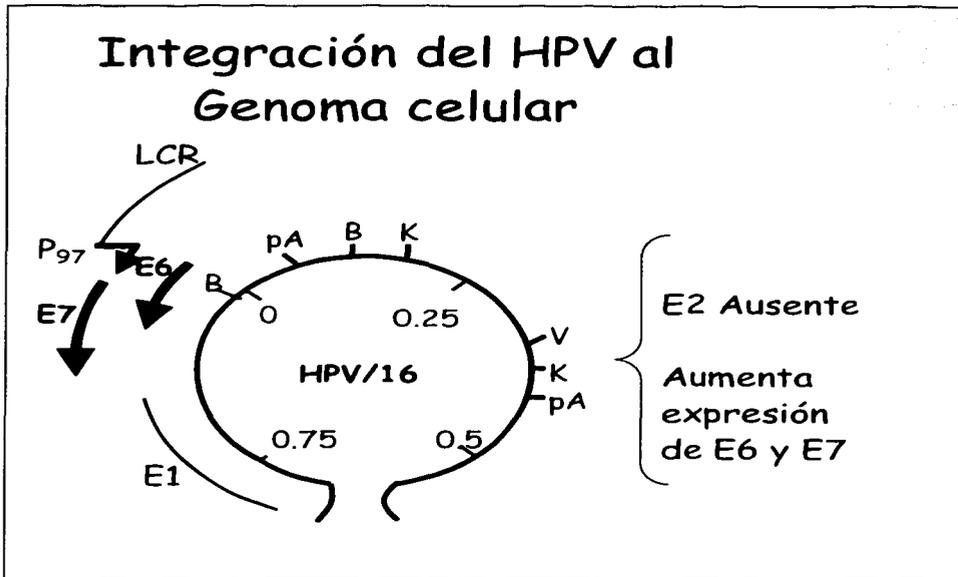


Figura 2. Integración del HPV al genoma celular. Se indica la interrupción del genoma viral al integrarse al genoma celular, con el consiguiente bloqueo de la proteína E2 ( un transregulador negativo de la transcripción de los oncogenes E6 y E7 de los HPV genitales). (Gariglio P. Genética molecular del cáncer humano. Ciencia y desarrollo. 1995; 120 p. 69.)

## 2.4 Ratones Transgénicos.

La formación de un tumor maligno es un proceso complejo que ocurre en etapas múltiples. En humanos deben mutar cuatro o cinco genes para que se desarrolle un cáncer y otro par de genes para la metástasis. Sin embargo en murinos es posible que se requiera menos eventos mutagénicos para llegar a la neoplasia. Una de las herramientas más valiosas para la construcción de modelos de experimentación *in vivo* la representan los Ratones Transgénicos. Estos ratones son producidos mediante la microinyección de material genético

seleccionado en los óvulos de cepas especiales de ratones. En nuestro caso, en el laboratorio contamos con ratones producidos en colaboración con el Dr. Luis Covarrubias (IBT-UNAM) (33), a los cuales se les ha insertado la secuencia correspondiente a los oncogenes E6 y E7 del HPV tipo 16, y un promotor bovino de queratina 6 (bK6) en su genoma (Fig. 3). Estos ratones fueron producidos con el propósito de contar con un modelo *in vivo* de infección por el HPV y los efectos que tienen los oncogenes E6 y E7 en epitelios del organismo. Hay varios reportes de enfermedad inducida por HPV en ratones transgénicos con los oncogenes E6 y E7 (42-45) y ha sido observado que una exposición crónica a estrógeno puede inducir carcinogénesis escamosa de cérvix y vagina en ratones transgénicos con HPV16 (46); cuando se emplean bajas concentraciones de estrógeno en el sistema modelo, solo en la zona de transformación fue observada carcinogénesis escamosa (47).

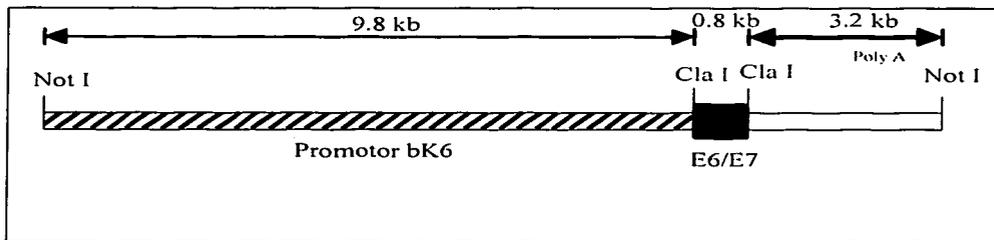


Figura 3. Mapa de la construcción del transgén. Representación esquemática de la construcción bK6-E6/E7 con la que se creó el ratón transgénico: Un fragmento de 0.8 kb conteniendo a los oncogenes E6 y E7 del HPV16 se fusionó con un fragmento de 9.8 kb del gen bK6 (gen de la queratina 6 de origen bovino; su característica principal es que se expresa en epitelio) que contiene el promotor y su región reguladora, junto con un fragmento genómico del SV40 que contiene una señal de poliadenilación. (Diana EA, et al. Cell growth & differentiation. 2000; 11 p. 528)

### **3 Planteamiento del Problema.**

Con base en lo anteriormente descrito, decidimos enfocar nuestros estudios a nivel molecular en este problema, desarrollando un sistema modelo que nos permita, en una primera etapa identificar la expresión de la proteína E6 del HPV, además; estudiar las bases del CaCU y obtener información que posteriormente nos ayude a tener mejores formas de diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad. Es evidente que para el estudio de estos aspectos del CaCU se emplearán, algunas tecnologías ya utilizadas por los distintos grupos que participarán en el proyecto, como PCR y RT-PCR *in vitro*, inmunohistoquímica, western blot y tecnologías de punta como son RT-PCR *in situ* y TUNEL *in situ*. Estas tecnologías su finalidad es la identificación de la expresión de el gen en cuestión de una manera cualitativa solamente.

## 4 Objetivo General.

- Detección del oncogén E6 de HPV-16 mediante diferentes métodos moleculares, en epitelios de ratones transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8.

### 4.1 Objetivos Particulares.

- Identificación del mRNA del oncogén E6 de HPV-16 en **cérvix** de ratones transgénicos por RT-PCR.
- Identificación de la proteína oncogénica E6 de HPV-16 en **cérvix** de ratones transgénicos por inmunohistoquímica.
- Identificación del mRNA oncogén E6 de HPV-16 en **lengua** de ratones transgénicos por RT-PCR.
- Identificación de la proteína oncogénica E6 de HPV-16 en **lengua** de ratones transgénicos por Inmunohistoquímica, y por RT-PCR *in situ*.

## 5 Hipótesis de trabajo

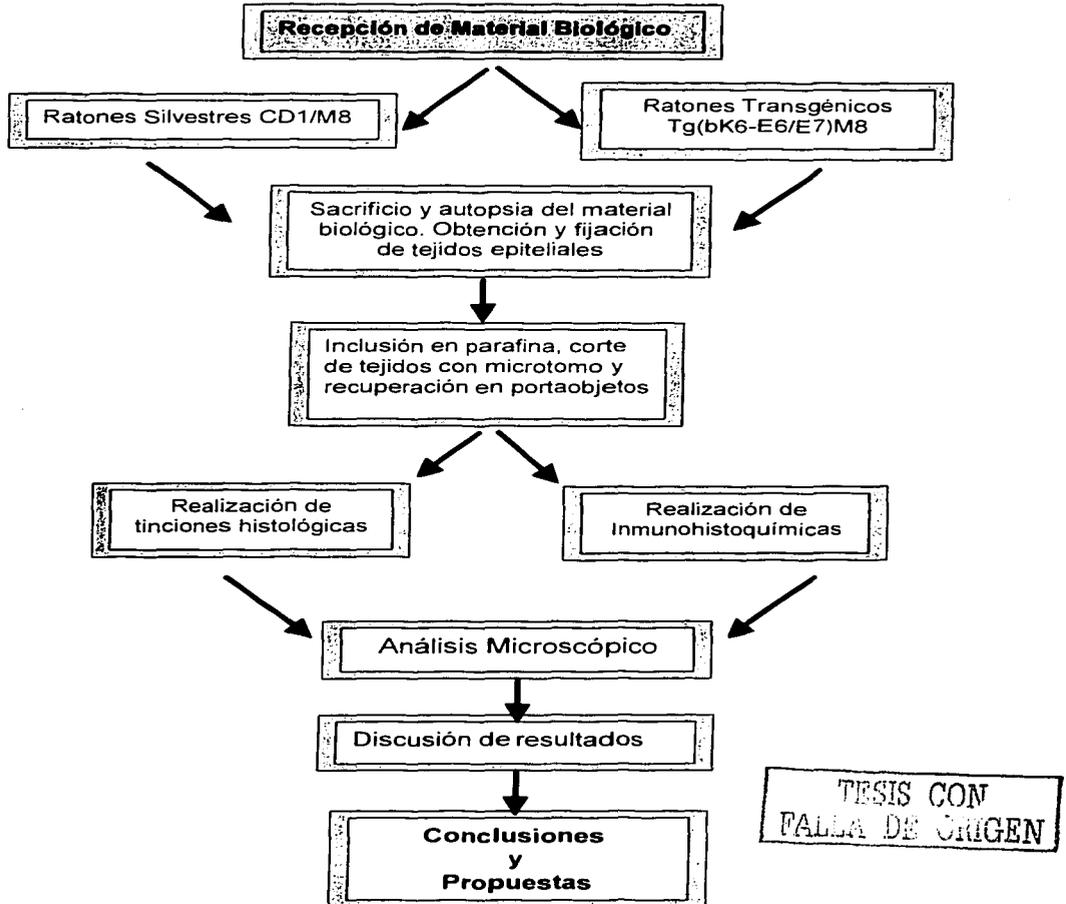
Si los ratones transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8 han sido producidos exitosamente se detectarán: la secuencia del oncogén E6, el transcrito y la proteína producida por el mismo en epitelios de cérvix y lengua de ratón transgénico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6 Diseño de Investigación.

### 6.1 Diagrama de flujo

#### Identificación del Oncogen E6 del Virus del Papiloma Humano Tipo 16 en epitelios de Ratones Transgénicos



## **6.2 Material y Métodos.**

### **6.2.1 Material de Laboratorio**

#### **Equipo de laboratorio**

- Agitador vortex
- Balanza analítica
- Baño maría de temperatura regulable
- Congelador de -20°
- Congelador de -70°
- Refrigerador 4°C
- Campana de extracción
- Homogenizador de olas
- Agitador orbital
- Microscopio de investigación
- Espectrofotómetro de luz UV
- Termociclador
- Termociclador *in situ*
- Microcentrifuga
- Micropipetas 10, 200 y 1000  $\mu$ L
- Horno
- Lámpara transiluminador UV
- Microtomo
- Baño de flotación
- Cámara de electroforesis para geles de agarosa
- Cámara de electroforesis para geles de acrilamida
- Fuente de poder
- Horno de microondas
- Parrilla de calentamiento con agitación
- Medidor de pH (potenciómetro)
- Sistema analizador de imágenes

### **Material de consumo continuo**

- Tubos eppendorf 1.5 mL
- Tubos eppendorf 0.5 mL
- Tubos para PCR 200  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta 10 – 200  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta 1000  $\mu$ L
- Vasos coplin
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Canastillas de acero inoxidable
- Guantes
- Probetas de (0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2 L)
- Vasos de precipitados
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz aforado (100, 250 y 500 mL)
- Pizetas

**6.2.2 Material Biológico.** Primero se trabajó con líneas celulares, con las cuales se realizó una serie de pruebas de estandarización. Una vez realizadas las estandarizaciones, se trabajó con muestras biológicas que fueron obtenidas de ratones, mismos que se sacrificaron de acuerdo a normas establecidas.

**6.2.2.1 Los ratones CD1** se han elegido por los tamaños grandes de camada. Este aumento en el tamaño de las camadas es porque se a incrementado la ovulación, se a alterado la población folicular ovárica y la respuesta del ovario a las gonadotropinas (14-United States. Environmental Protection Agency. EPA Special Report on Endocrine Disruption. Washington DC: GPO, Feb 1997).

**6.2.2.2 Ratones Transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8.** Los ratones transgénicos fueron hechos en colaboración con del Dr. Luis Covarrubias, por inyección pronuclear de DNA recombinante siguiendo protocolos estandarizados.

**6.2.3 Obtención de muestras de ratones.** Se obtuvieron muestras de ratón CD1 y ratón Tg(K6-E6/E7)M8, de diferentes tejidos para la extracción y purificación de ácidos nucleicos, así como para análisis por western blot, con especial énfasis en tejidos epiteliales (cérnix, útero, lengua). Los tejidos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y mantenidos a 70°C bajo cero, hasta el inicio del estudio. Muestras similares se procesaron de manera diferente para los estudios histológicos: HE, inmunohistoquímica, PCR *in situ* y RT-PCR *in situ*.

**6.2.4 Proceso para inclusión de los tejidos en parafina.** Una vez sacrificado el ratón se disecó con las normas adecuadas de patología diagnóstica. Se tomaron muestras de los órganos de interés e inmediatamente se depositaron en paraformaldehído al 4% en PBS para su fijación durante 24 horas a 4°C, posteriormente los tejidos se introdujeron en alcoholes seriados 50%, 60%, 70%, 80%, 90% preparados con agua destilada, por 1 hora en cada uno de los alcoholes con agitaciones periódicas, después 2 veces en alcohol 100% 1 hora cada vez, 1

hora en alcohol - xilol (dilución1:1), 1hora en xilol, 1hora en xilol, 1hora en xilol-parafina a 50°C (dilución1:1), 1hora en parafina 50°C, y 1hora en parafina 50°C. Posteriormente se realizaron los bloques de parafina, vaciando parafina líquida a 55°C sobre el tejido dentro de un molde y enfriándolos a 0°C para obtener los bloques.

## **6.2.5 Análisis Histológico.**

**6.2.5.1 Proceso de corte de tejidos.** Los bloques de parafina se colocaron en un microtomo (Leica RM2025, Alemania) y se realizaron cortes de 4 µm de espesor, los cortes se colocaron en un baño de flotación a 45°C y se recuperaron sobre portaobjetos silanizado, con la finalidad de tomar el tejido en las mejores condiciones de conservación, después, los cortes montados en las laminillas se introdujeron a un horno a 55°C durante 60 minutos para fijar el tejido al portaobjetos.

**6.2.5.2 Tinción de Hematoxilina y Eosina (HE).** Se desparafinó y rehidrató de la siguiente manera: se realizaron baños de 10 minutos cada uno en: xilol 2 veces, alcoholes seriados (100%, 90%, 80%, 70%, 60% y agua destilada). Para la tinción; se aplicó una gota de Hematoxilina a cada tejido durante 1 minutos y se lavó en agua corriente por espacio de 1 minutos, después se sumergió en una solución de bicarbonato de sodio para virar el color de morado a azul. Posteriormente se aplicó una gota de Eosina alcohólica por 2 minutos y se realizaron lavados con alcoholes seriados de manera inversa a la desparafinada, posteriormente alcohol absoluto por 5 minutos y después tres baños de xilol. Para el montaje: se realizó con resina sintética y se analizaron al microscopio directamente para su diagnóstico morfológico.

**6.2.6 Inmunohistoquímica (IHQ).** El concepto de emplear anticuerpos (Ab; del ingles antibody) en el laboratorio para localizar antígenos dentro de los tejidos se ha empleado como una potente herramienta en la investigación biológica desde

los 1940's, como una técnica se a empleado en todos los aspectos de patología, y desde mediados de los 70's con la ayuda de anticuerpos monoclonales se incremento la importancia de su uso. La IHQ permite la identificación y localización celular de antígenos presentes en tejidos por medio de interacciones antígeno-anticuerpo (48). El sitio de unión es identificado por la aplicación directa de un Ab marcado, que nos permite hacer una detección secundaria, misma que podemos hacer visible al microscopio óptico de luz o a la incidencia de luz ultravioleta (LUV), y así identificar la estructura proteica en cuestión.

**6.2.6.1 Inmunohistoquímicas contra E6.** Se desparafinó y se rehidrató como en el proceso (6.2.5.2), posteriormente se depositaron en un frasco coplin con buffer de citratos pH 6.5 a ebullición durante 30 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Después se bloqueó la peroxidasa endógena con  $H_2O_2$  al 3% en metanol al 80% durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavó muy bien con agua destilada por 2 veces de 2 minutos cada una, después se aplicó los reactivos del (Histomouse™ –SP Kit, Zymed S.A.): solución de reactivo 1A por 30 minutos, sin lavar, solamente escurrió el exceso, después se aplicó reactivo 1B por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavó con agua destilada, y se enjuagó con PBS por dos veces de 2 minutos cada una, posteriormente se aplicó el Ab anti-E6 (HPV-16, C1P5, Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:50 en PBS y se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente por 60 minutos, se lavó con PBS-TWEN 0.1% 2 veces por 10 minutos cada una, se aplicó el Ab secundario biotinilado a cada tejido por 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, se lavó dos veces con PBS de 3 minutos cada una, después se aplicó el conjugado estreptavidina-peroxidasa, se incubó por 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, se lavó por dos veces de 3 minutos cada una con PBS, se aplicó el substrato cromógeno {previamente preparado 1 mL de agua destilada + 20  $\mu$ L de buffer concentrado 20X, 20  $\mu$ L de  $H_2O_2$  0.6% 20X y 20  $\mu$ L de cromógeno AEC (aminoetil carbazol)}, y se observó hasta la generación de precipitado color rojo ladrillo entre 5 y 10 minutos, posteriormente se paró la reacción lavando muy bien con agua corriente,

se contratiñó con hematoxilina por algunos segundos evitando la sobre coloración, se lavó con agua destilada el exceso de colorante y se cubrieron con PBS para virar el color de la hematoxilina, se montaron las preparaciones con medio de montar acuoso, después se observaron las preparaciones en microscopio y se analizaron.

**6.2.6.2 IHQ contra Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA, del inglés; Proliferating Cell Nuclear Antigen).** Se siguió la misma técnica que contra Ab anti-E6, con un cambio en la dilución del Ab primario (Monoclonal Mouse anti-PCNA Clona PC10, Zymed Laboratories) 1:100 en PBS.

**6.2.6.3 Apoptosis *in situ*.** La determinación de los niveles de apoptosis en tejido cervical se realizó mediante ensayos de detección de los rompimientos del DNA. Identificando el marcaje de extremos terminales 3'-OH con nucleótidos modificados marcados con fluoresceína y, posteriormente se montaron con un medio acuoso que protege la fluorescencia (GVA) y permite un aumento de la vida media de la excitación de la fluorescencia al ser estimulada por la luz UV se empleo un microscopio con lampara de luz UV Leica DMLS. Este método ha sido denominado "TUNEL" por sus siglas en inglés (TdT-mediated dUTP-X Nick End Labeling) (49).

**6.2.7 Extracción de DNA Genómico de Muestras Biológicas.** Una porción de los tejidos congelados se homogenizó en Tris 0.1 M, NaCl 0.1 M, EDTA 5 mM (pH 8.0) y 10% SDS, en hielo; y se incubó con proteinasa K (10 µg/mL, NE Biolabs) a 48 °C de 14 a 16 horas. Luego se realizaron extracciones orgánicas (fenol, fenol-cloroformo-isoamílico), se agregó acetato de sodio 4 M al sobrenadante acuoso y el DNA se precipitó con etanol a -20 °C, se resuspendió y se cuantificó por su absorbancia a 260 nm en un Espectrofotometro Perkin Elmer MBA 2000.

**6.2.8 Reacción en Cadena por la Polimerasa (PCR).** La PCR (de inglés Polimerase Chain Reaction) fue descrita en 1985 por K. Mullis y colaboradores

automatizando el empleo de la enzima polimerasa. La subsiguiente introducción de polimerasas térmicamente más estables a facilitado la práctica y aplicación de este recurso, expandiéndose para diferentes usos y por diferentes usuarios de la PCR. Se emplea principalmente para amplificar un segmento de DNA que se encuentra entre dos regiones de secuencias conocidas, dos oligonucleótidos son usados como iniciadores para una serie de reacciones que son catalizadas por la DNA polimerasa. Esos oligonucleótidos son fragmentos de secuencias que se complementan con el segmento de DNA que se busca amplificar. El DNA a amplificar sufre una primera desnaturalización en presencia de una cantidad molar en exceso de cada uno de los dos oligonucleótidos y los cuatro dNTPs, esta mezcla de reacción es enfriada a una temperatura en que los oligos se alinean con sus secuencias complementarias blanco y son capaces de unirse, posteriormente la enzima Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*) a una temperatura adecuada se encarga de ir polimerizando cada uno de los nucleótido formando una cadena de acuerdo al tamaño del fragmento de DNA que se esta localizando. Aunque es una técnica relativamente nueva, la amplificación por la PCR se usa en: la detección de desórdenes genéticos, detección de secuencias de ácidos nucleicos de organismos patógenos en muestras clínicas, identificación genética de individuos en medicina forense (incluyendo el DNA extraído de un cabello o de un simple espermatozoide) y el análisis de mutaciones en oncogenes activados. En resumen la amplificación de secuencias por la PCR es una técnica altamente elegida para una variedad de análisis de DNA.

**6.2.8.1 PCR para E6 y E7 Integrado en el Genóma del Ratón Tg(K6-E6/E7)M8.** Para este estudio se utilizó el DNA ya obtenido, tomando la metodología estandarizada, para el uso en PCR se empleó: 400 ng de DNA genómico de ratón como templado en cada análisis, 10 pmol de oligonucleótidos consenso PU1M y PU2R (sentido y antisentido respectivamente; **50**), para la identificación de la secuencia genómica de los oncogenes de E6 y E7 de HPV-16, 2 u de Taq DNA polimerasa, en volumen final de 25  $\mu$ L de 200 mM tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP mix. (tabla 1), la temperatura de

alineamiento ( $T_m$ ) de 55°C. Las reacciones de amplificación de cada una de las muestras se realizaron en un termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400).

**Tabla 1. Condiciones de reacción de PCR para E6/E7**

REACTIVOS	VOLUMEN	PROGRAMA DE AMPLIFICACION
DNA 400 ng	-----	
Buffer 10X	2.5 $\mu$ L	
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 $\mu$ L	94°C 5 minutos
dNTPs 10 mM	1 $\mu$ L	94°C 30 seg
PU1M	10 pmoles	55°C 60 seg 35 CICLOS
PU2R	10 pmoles	72°C 90 seg
Agua	Ajustar a 25 $\mu$ L	72°C 10 minutos
Taq Pol 2 U/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L	

**6.2.8.2 RT-PCR *In vitro*.** El RNA puede ser empleado como un templado para amplificaciones por PCR después de su transcripción reversa, de mRNA a cDNA, por la enzima Transcriptasa Reversa (TR). Lo que conoceremos después de la amplificación será el gen transcrito que posiblemente se traducirá a proteína. Herramienta importante la RT-PCR en la identificación de los niveles de expresión con el mRNA.

**6.2.8.3 Extracción de RNA Total.** Para extraer el RNA se pulverizaron las muestras (51). Esto se realizó en el cuarto frío (4°C). Las muestras se sacaron del ultracongelador, se sumergieron en nitrógeno líquido y se envolvieron en sobres de papel aluminio. Cada sobre tenía un grosor de por lo menos tres capas de papel aluminio. Cada paquete con su fragmento de tejido se sumergió, de nuevo en nitrógeno líquido, y se depositó sobre una placa metálica, esta placa se cubrió con papel aluminio y para mantenerla fría se colocó sobre una cama de hielo seco, con la finalidad de pulverizar la muestra se golpeo con un martillo enfriado en hielo seco. En el mismo cuarto frío se abrió el sobre y el tejido pulverizado se bañó con 300  $\mu$ L de reactivo Trizol (LTI/Gibco, USA) incubando en hielo. Con una micropipeta se transfirió la mezcla a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se añadieron otros 100  $\mu$ L de Trizol al sobre para asegurar que todo el tejido fuera recuperado,

al final se añadió más reactivo Trizol hasta completar 500  $\mu\text{L}$ . Se agitó el tubo eppendorf hasta homogenizar la mezcla del Trizol con el tejido (52). Después se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Enseguida se le añadieron 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitó vigorosamente con la mano durante 15 seg, se dejó reposar por 3 minutos a TA, después se centrifugaron los tubos por 15 minutos a 4°C a 12500 rpm. Con esto se formó una fase acuosa, transparente en la parte superior del tubo; una fase inferior roja translúcida, y una interfase blanca y viscosa. La fase acuosa se transfirió con una micropipeta, a un tubo eppendorf de 1.5 mL, teniendo mucho cuidado de no tocar la interfase ni las paredes del tubo para evitar la contaminación de proteínas y DNA. Se añadió 300  $\mu\text{l}$  de isopropanol y se sometió a vortex muy suave por 2 seg, y se dejó reposar por 10 minutos a TA, a continuación se centrifugaron por 20 minutos a 4°C a 12500rpm en una micro centrifuga. Se eliminó por decantación el sobrenadante y se añadió 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75% con agua dietil-pirocarbonato (DEPC; 0.1% de DEPC en agua destilada y esterilizada), se sometió a vortex por 5 seg, después se centrifugó por 5 minutos a 12500 rpm en cuarto frío, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en posición invertida los tubos sobre una toalla de papel. Una vez deshidratados se añadió 50  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, y se incubaron por 10 minutos a 55°C, y se cuantificó en un espectrofotómetro (Perkin Elmer MBA200).

**6.2.8.4 Síntesis de DNA Complementario (cDNA).** Se tomaron 2  $\mu\text{g}$  del RNA total, en un medio con 1  $\mu\text{L}$  (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de oligo dT<sub>12-18</sub>, 4  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora inicial (first strand buffer 5X), 2  $\mu\text{L}$  de 0.1 M DTT, 1  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP mix, después se incubaron con 200 u de SuperScript II (SS II, GibcoBRL) (Tabla 2), posteriormente se empleó como templado para realizar la técnica de PCR mencionada anteriormente, con oligonucleótidos dirigidos a  $\beta$ -actina (que es un gen constitutivo) y E6/E7 (tabla 4).

Tabla2: Reactivos y concentraciones usadas para cada reacción de la síntesis de cDNA.

REACTIVOS	VOLUMEN	STOCK	CONCENTRACION FINAL
ARN	-----	-----	2 µg
Oligo dT	1 µL	50 Mm	5 mM
H <sub>2</sub> O	Hasta 12µL	-----	-----
Incubar 10 minutos a 70°C			
Buffer 5X	4 µL	5X	1X
DNTPs	1 µL	10 mM c/uno	2 mM
ARNsin	0,25 µL	40 U/µL	10 U/µL
DTT	2 µL	0.1 M	0.01 M
SS II	1 µL	200 U/µL	10 U/µL
42°C por 50 minutos, después 10 minutos a 70°C			
Almacenar A -20°C			

**6.2.8.5 PCR con el cDNA.** Se tomo 1 µL de cDNA, 10 pmol de oligonucleótidos *consensus* (secuencia homologa de diferentes tipos de HPV) para la identificación de la secuencia genómica de los oncogenes de E6 y E7 de HPV-16 y de β-actina (como control interno de expresión), 2 u de Taq DNA polimerasa, en volumen final de 50 µL de 200 mM tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, y 10 mM dNTP mix., con una temperatura media de alineamiento (T<sub>m</sub>) de 55°C, (tabla 3).

Tabla 3: Condiciones de reacción de PCR para β-Actina.

REACTIVOS	VOLUMEN	PROGRAMA DE AMPLIFICACION
CDNA	1 µL	94°C 3 minutos 94°C 15 seg 55°C 60 seg 35 CICLOS 72°C 90 seg 72°C 10 minutos
Buffer 10X	2.5 µL	
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 µL	
dNTPs 10 mM	0.5 µL	
β-actina sentido	10 pmoles	
β-actina -antisentido	10 pmoles	
H <sub>2</sub> O	ajustar a 25 µL	
Taq Pol 2 U/µL	0.2 µL	

Tabla 4. Oligonucleotidos empleados

Nombre	Secuencia	TM °C	Tamaño	Gen
PU1M	TgT CAA AAA CCg TTg TgT CC	55	20	E6/E7
PU2R	GAg CTg TCg CTT AAT TgC TC	55	20	E6/E7
β-actinaAS	ACC TTC AAC ACC CCA gCC ATg TAC g	55	25	β-actina
β-actinaS	CTg ATC CAC ATC TgC Tgg AAg gTg g	55	25	β-actina

**6.2.9 PCR y RT-PCR *in situ*.** De la misma manera que las amplificaciones *in vitro*, el fundamento de estas técnicas, es la amplificación de fragmentos de DNA y de cDNA respectivamente, con la salvedad de que en este caso se empleó tecnología de "GeneAmp 1000 PCR *in situ* Sistem, Perkin Elmer", que es un termociclador adaptado para usar portaobjetos de vidrio, en lugar de tubos, sobre los cuales se realiza las reacciones (transcripción inversa, amplificación, detección, etc.).

**6.2.9.1 Pretratamiento de las muestras.** Inicialmente, los cortes fijados en las laminillas, se desparafinaron para posteriormente someterlas a digestión parcial mediante proteasas (p.ej. Proteinasa K) para reducir la red proteína-proteína y proteína-ácido nucleico que se produce durante el proceso de fijación del tejido. En el caso de las muestras destinadas a RT-PCR se trataron con DNAsa libre de RNAsa para eliminar el DNA genómico el cual puede amplificar lo que daría como resultado "fondo" o señal inespecífica.

**6.2.9.2 Síntesis de cDNA *in situ*.** Posterior a la DNAsa se realizó la síntesis de la primera cadena del cDNA. Se aplicó la mezcla de reacción con RT a los especímenes tratados con DNAsa, en presencia del oligo antisentido específico para retrotranscribir los RNAm correspondientes. Usando el sistema GeneAmp *In situ* PCR 1000 de Perkin Elmer Applied Biosystems se realizó la siguiente metodología:

**6.2.9.3 PCR *in situ*.** Se utilizaron los oligonucleótidos específicos para la amplificación (tabla 4). Se cubrió el espécimen con la mezcla de reacción para PCR, se sellaron con los AmpliCover Discs para introducir estas laminillas al GenAmp *In situ* PCR System 1000 y se inició el programa convenido para la amplificación del producto de interés. Después de bloquear las muestras, se incubó con Ab anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina. Se realizó el desarrollo de color azul-morado incubando con el substrato NBT-BCIP. Se

contratiñó y se montó las muestras con medio de montaje no-acuoso para realizar el análisis por microscopía.

**6.2.10 Western Blot.** Western blotting (**53, 54**) es para las proteínas lo que el Southern blotting es para el DNA. La técnica inmunoquímica del Western blot, es la más común para la detección de proteínas, en un Western blot las proteínas son separadas electroforéticamente en un gel de acrilamida, después se transfieren a una membrana, y puede ser detectados uno o más epítopes con uno o más Abs. La técnica de detección puede ser: a) Directa; cuando la membrana es incubada con un conjugado enzimático (una peroxidasa o fosfatasa alcalina) de un Ab específico, y b) Indirecto; cuando la membrana es incubada primero con un Ab específico primario, posteriormente se incubaba con un Ab que reconozca algunos epítopes de la especie donde fue creado el Ab primario y al final se incubaba con un complejo conjugado enzimático que nos facilita la identificación específica de la proteína de interés.

**6.2.10.1 Extracción de Proteínas de Material Biológico.** De la fase inferior roja translúcida y la interfase blanca y viscosa formada en la extracción del RNA (**6.2.8.3**); se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de la muestra y se depositó en un tubo eppendorf, se agregó 800  $\mu\text{L}$  de metanol (4 vol), se agitó vigorosamente por 30 segundos, se llevó a centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm, después se agregó 400  $\mu\text{L}$  (2 vol) de cloroformo y se agitó en vortex por 30 seg, se centrifugó como arriba. Se agregó 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ , se agitó vigorosamente en vortex por 30 seg y se repitió el proceso de centrifugación como anteriormente. Después se recuperó la fase superior y se agregó 600  $\mu\text{L}$  de metanol y se mezcló por inversión, luego se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante, quedando las proteínas en la pastilla, después se secó la pastilla a temperatura ambiente por 15 minutos y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de SDS 1% a 50°C.

**6.2.10.2 Electroforesis de Proteínas.** Se preparó un gel de acrilamida al 10%, y se cargaron 15  $\mu$ L de las proteínas extraídas (y resuspendidas en 50  $\mu$ L), en el proceso anterior con buffer de carga y se realizó la electroforesis a 110 volts durante 90 minutos.

**6.2.10.3 Electrotransferencia.** Se equilibró el gel por 10 minutos en buffer de transferencia (Tris-Glicina) también se equilibró la membrana de nitrocelulosa por 5 minutos en el mismo buffer, se cortaron 4 hojas de papel wattman 3MM y se empaparon con buffer (para usarse como reservorios de buffer), después se colocaron dos hojas del papel wattman 3MM sobre la superficie de la cámara de transferencia semi-seca, se pasó una pipeta pasteur con la finalidad de eliminar las burbujas formadas, después se colocó la membrana de nitrocelulosa sin formar burbujas, después se colocó el gel sin formar burbujas, luego se colocaron las dos hojas restantes de papel wattman 3MM, se colocó la tapa de la cámara y se transfirió por 30 minutos a 25 volts.

**6.2.10.4 Inmunodetección de la proteína E7:** Después de la transferencia el filtro de nitrocelulosa se bloqueó en PBS con leche descremada Svelty<sup>MR</sup> 5% durante 60 minutos a TA. Enseguida se lavó durante 5 minutos con PBS-Tween 0.1% y posteriormente se incubó con el Ab anti-E6 de HPV16 a una dilución 1:500 en PBS O/N (del inglés; over night) a 4°C, se lavó el papel tres veces de 10 minutos cada una con PBS-Tween 0.1% y se incubó por 90 minutos con un Ab secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (HP). Se lavó nuevamente con PBS-Tween 0.1% tres veces de 10 minutos cada una, el papel se incubó por 90 seg con la solución de quimioluminiscencia, exponiéndose sobre una placa de autoradiografía y se reveló, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ECL, Amersham).

### **6.3 Tipo de estudio**

Este trabajo fue un estudio experimental, empleando técnicas de biología molecular y de inmunohistoquímica.

### **6.4 Población**

La población fue variable, porque dependió del nacimiento de los ratones transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8.

### **6.5 Criterios:**

#### **6.5.1 De Inclusión.**

El manejo de las muestras se realizó tomando en cuenta que:

1. Se obtuvieron de manera comprobada (molecularmente) de ratones transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8.
2. Se tomaron como muestras control ratones de la cepa silvestre CD1 original.
3. Las muestras fueron de ratones hembra.

#### **6.5.2 De Exclusión.**

1. Los que presentaran algún cuadro de enfermedad.
2. Los que murieron de manera natural.

#### **6.5.3 De Eliminación.**

1. Se eliminaron los ratones generados que no presentaron el transgén.
2. Se eliminaron los ratones machos.

### **6.6 Variables**

1. El mRNA de E6 HPV16.
2. Proteína de E6 expresada.

## 7 Resultados

En la tinción de HE se observó la presencia de una serie de irregularidades celulares que se pueden diferenciar marcadamente entre el ratón CD1 y el Tg(K6-E6/E7)M8. En el epitelio cervical identificamos que la capa celular basal de los ratones CD1 se manifiesta de manera normal como unicapa sin alteraciones (Figura 4A), a diferencia del epitelio cervical de los ratones Tg(K6-E6/E7)M8 que presenta un engrosamiento anormal de la capa basal celular, dicho engrosamiento en el epitelio de los ratones Tg(K6-E6/E7)M8 esta acompañado de una desorganización de las capas celulares y de algunas deformaciones nucleares, que son características de un epitelio que presenta tendencia a una displasia. Para el epitelio de lengua en ratones Tg(K6-E6/E7)M8 aunque no es tan marcado un engrosamiento, se ve una desorganización de la capa celular basal (figura 4C). En los ratones Tg(K6-E6/E7)M8 se pueden observar algunos cambios celulares particulares como: una hiperplasia leve de la capa basal, algunas células binucleadas, lo que no se observa en el ratón CD1 (figura 4C y D respectivamente).

En experimentos iniciales que se realizaron en piel obtenida tanto en ratones CD1 como de ratones Tg(K6-E6/E7)M8, se detectó expresión de las oncoproteínas E6 y E7 (30). En las IHQ contra la proteína E6 realizadas se detectó la presencia de esta en epitelio de lengua (Figura 5A), así como también se detectó proteína E6 en epitelio de cervix (Figura 6A) en ambos casos podemos ver las diferencias cuando comparamos entre el epitelio en ratones Tg(K6-E6/E7)M8 y CD1 wt, así como con un control negativo (lengua figuras 5A,B y C; cervix figuras 6A,B y C). Por otro lado también se detectó la expresión del transgén E6/E7 en lengua de ratón Tg(K6-E6/E7)M8 mediante RT-PCR *in situ*, en (figura 7) se puede ver que las muestras del ratón Tg(K6-E6/E7)M8 presentan una señal citoplásmica azul-morada después de 5, 15 y 18 ciclos de amplificación (Figura 7 A, B y C respectivamente). Y en lengua de ratón CD1, después de 18 ciclos (figura 7D) no se observa señal alguna.

Mediante la técnica de amplificación de secuencias genómicas *in situ* (PCR *in situ*), se logró detectar el DNA del transgén E6/E7 en las muestras

correspondientes a los ratones Tg(K6-E6/E7)M8. La señal se detectó en el núcleo de las células; como se esperaba, en los ratones CD1 no se obtuvo señal en ninguno de los casos (Figura 8), la amplificación de genes constitutivos como  $\beta$ -actina, presentes tanto en los ratones transgénicos como silvestres, permitió que obtuviéramos una señal evidente en todos los casos (Datos no mostrados).

Por otro lado también se manifestó la presencia del transgén y de su transcrito por medio de PCR [para ADN extraído de los diferentes tejidos en los dos tipos de ratones (figuras 9)], y RT-PCR [para el ARN (figuras 10)] respectivamente. Se ve una banda de un peso aproximado de 235pb, por medio de una señal que manifiesta los fragmentos amplificados en las diferentes muestras de tejidos analizadas, vemos la presencia del transgen en las muestras de ratones Tg(K6-E6/E7)M8 y en los CD1 Wt no se observan. También se realizó amplificación para un fragmento del gen  $\beta$ -Actina de aproximadamente 400pb como control de las buenas condiciones del templado para los transcritos en la RT-PCR.

La presencia de PCNA, nos manifiesta que hay un aumento de la proliferación celular en lengua y cervix en el caso de los Tg(K6-E6/E7)M8 (figuras 11 y 12 respectivamente), donde se observa la presencia marcada de PCNA en los epitelios del ratón Tg(K6-E6/E7)M8 en comparación con el CD1, que solamente se manifiesta una línea de células que presentan la señal, a diferencia de los Tg(K6-E6/E7)M8 donde la presencia de PCNA alcanza varias capas

El análisis mediante la técnica de TUNEL nos permitió detectar aquellas células en estado de apoptosis (muerte celular por existencia de fragmentación de DNA genómico). En las muestras de lengua obtenidas de ratones Tg(K6-E6/E7)M8, se observó una disminución discreta en los niveles de apoptosis, tanto en el epitelio como en el estroma. En los ratones CD1 la cantidad de células apoptóticas es considerada como en la normalidad (Figura 13).

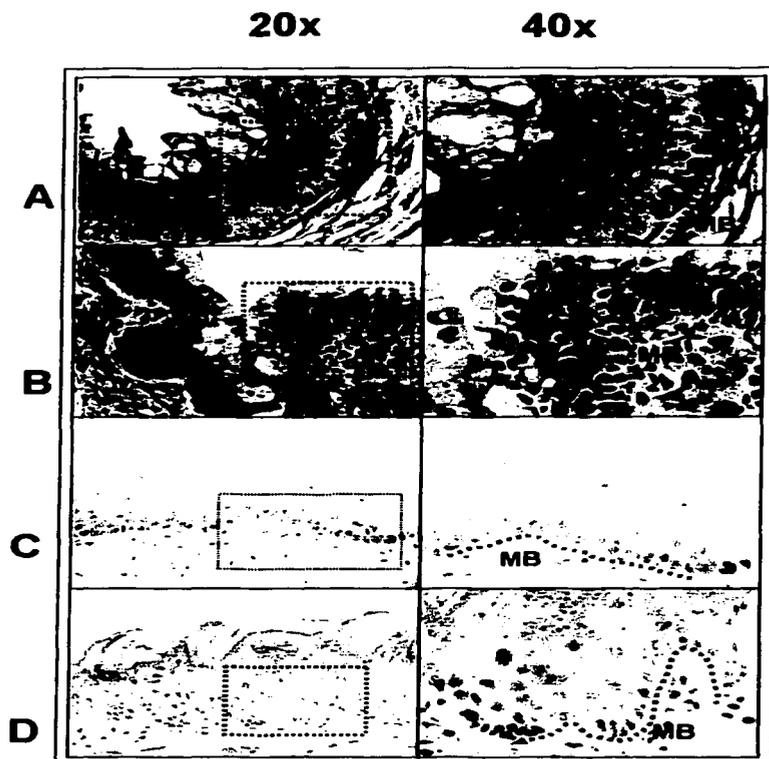


Figura 4. Tinción con HE de tejidos cervical y lengua de ratones Tg(K6-E6/E7) M8 y de ratones silvestre CD1 (20X y 40X ), MB= membrana basal.

A Cérvix silvestre CD1,

B Cérvix Tg(K6-E6/E7) M8.

C Lengua Tg(K6-E6/E7) M8,

D Lengua silvestre CD1.

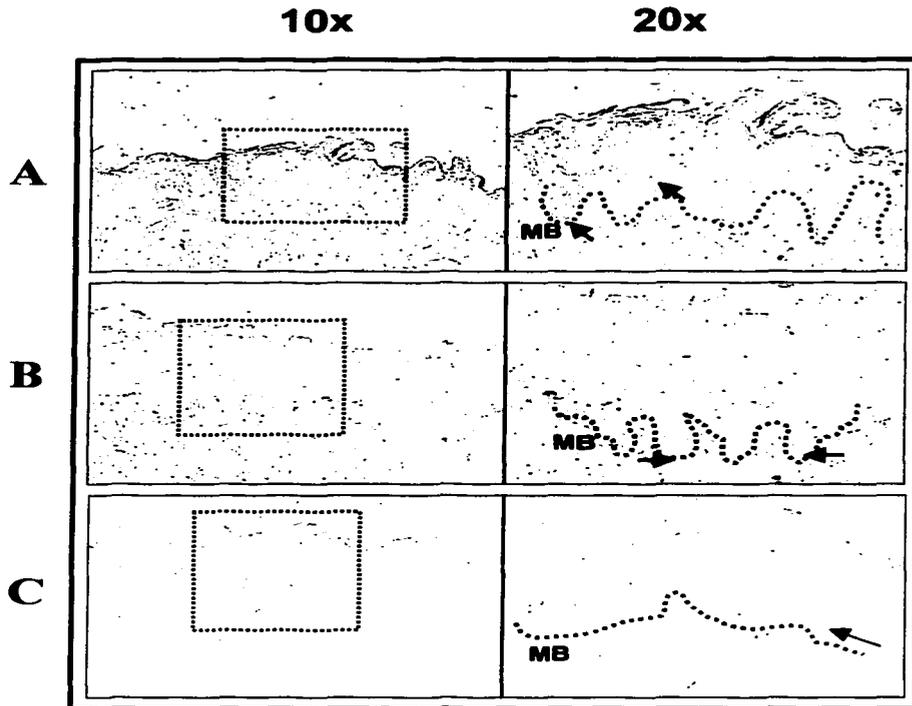


Figura 5. Inmunohistoquímica para la oncoproteína E6 de HPV16 en lengua de ratón Tg(K6-E6/E7)M8 y ratón silvestre CD1 (10 y 20X ).  
 A. Tg(K6-E6/E7)M8 con Ab específico anti-E6 de HPV16.  
 B. Ratón Silvestre con anti-E6 de HPV16.  
 C. Tg(K6-E6/E7)M8 sin Ab primario.

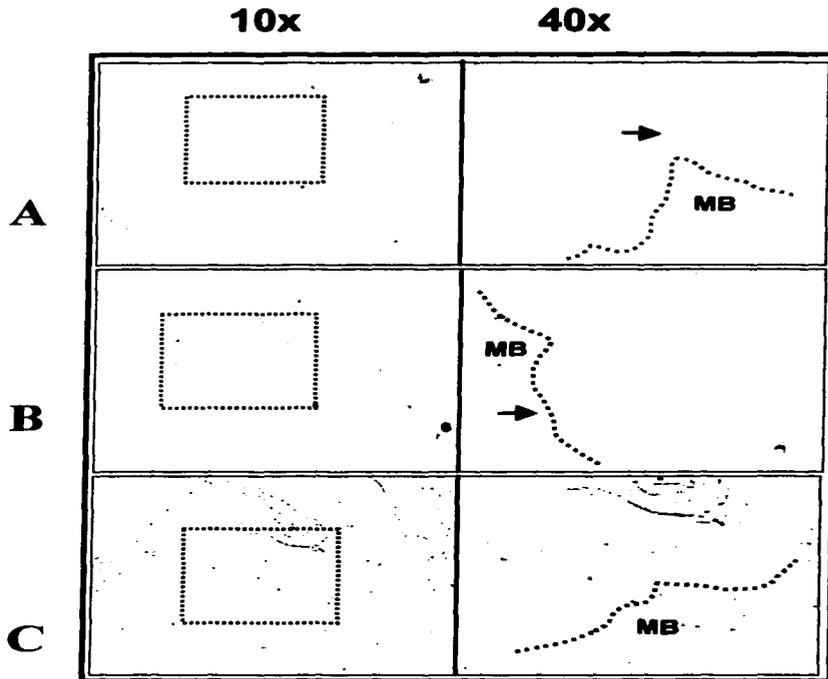


Figura 6. Inmunohistoquímica para la oncoproteína E6 de HPV16 en Cérvix de ratón Tg(K6-E6/E7)M8 y ratón silvestre CD1. MB= membrana basal.

- A. Tg(K6-E6/E7)M8 con Ab específico anti-E6 de HPV16, 10X y 40X respectivamente.
- B. Ratón Silvestre con anti-E6 de HPV16, 10X y 20X respectivamente.
- C. Tg(K6-E6/E7)M8 sin Ab primario, 10X y 20X respectivamente.

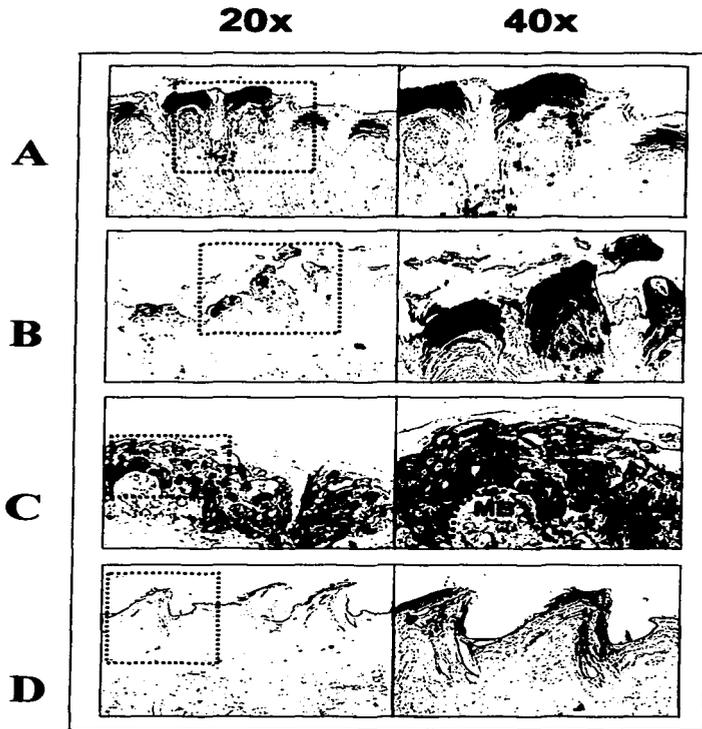


Figura 7. Determinación del número óptimo de ciclos en RT-PCR *in situ* para E6/E7 de HPV16 en lengua de ratón transgénico Tg(K6-E6/E7)M8 y ratón silvestre CD1(10X y 20X).

- A Lengua Tg(K6-E6/E7)M8 5 ciclos
- B Lengua Tg(K6-E6/E7)M8 15ciclos
- C Lengua Tg(K6-E6/E7)M8 18ciclos
- D Lengua silvestre CD1 15 ciclos

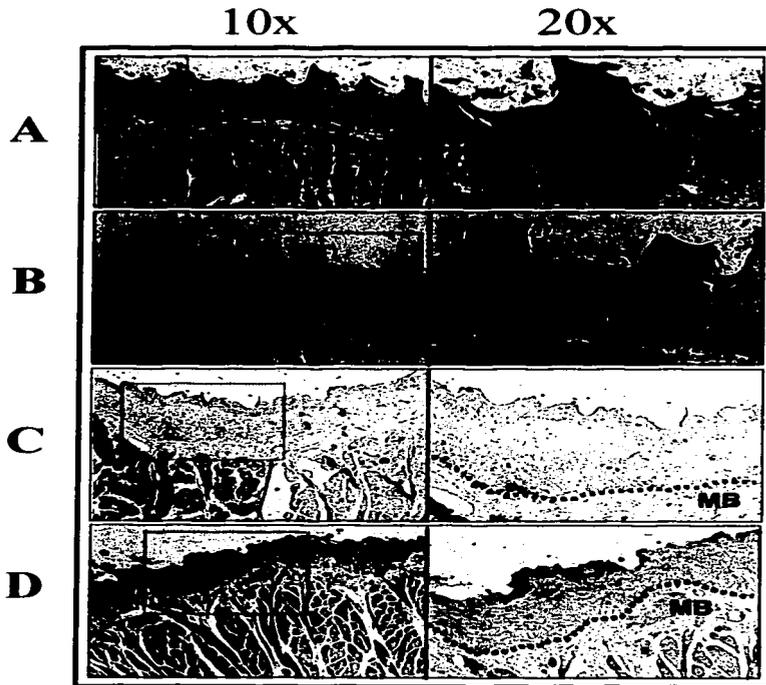


Figura 8. PCR *in situ* para E6/E7 de HPV16 en Lengua de ratón y Tg[K6-E6/E7] M8 ratón silvestre CD1 (10X y 20X respectivamente en todos los incisos).

- A) Tg(K6-E6/E7)M8,
- B) Tg(K6-E6/E7)M8 sin Taq polimerasa,
- C) Ratón silvestre CD1
- D) Ratón silvestre CD1 sin Taq polimerasa.

Figura 9

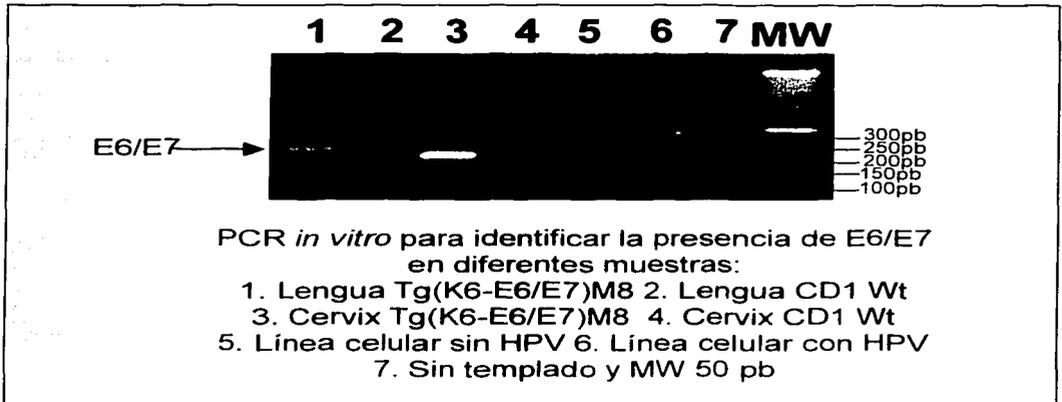
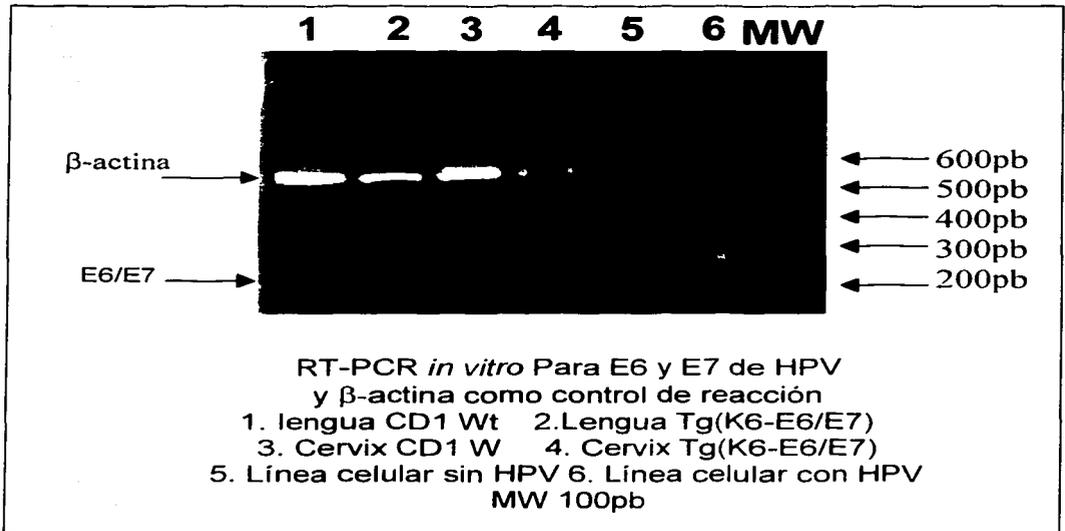


Figura 10



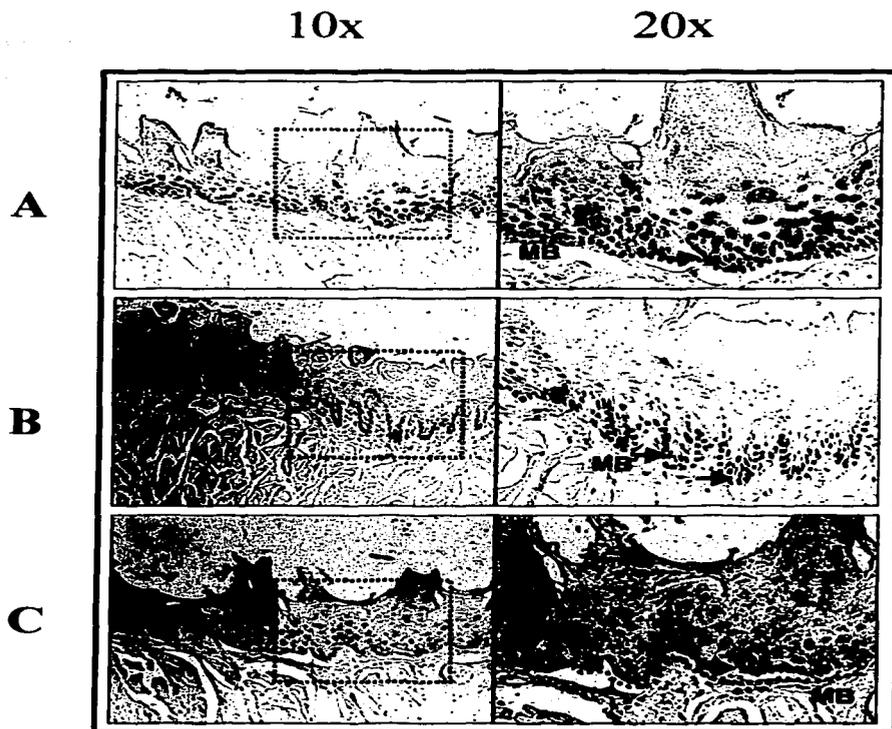


Figura 11. Inmunohistoquímica para la proteína PCNA en Lengua de ratón transgénico Tg(K6-E6/E7)M8 y silvestre CD1:

- A. Tg(K6-E6/E7)M8 con Ab específico anti-PCNA
- B. Ratón silvestre CD1 con anti-PCNA
- C. Tg(K6-E6/E7)M8 sin Ab primario

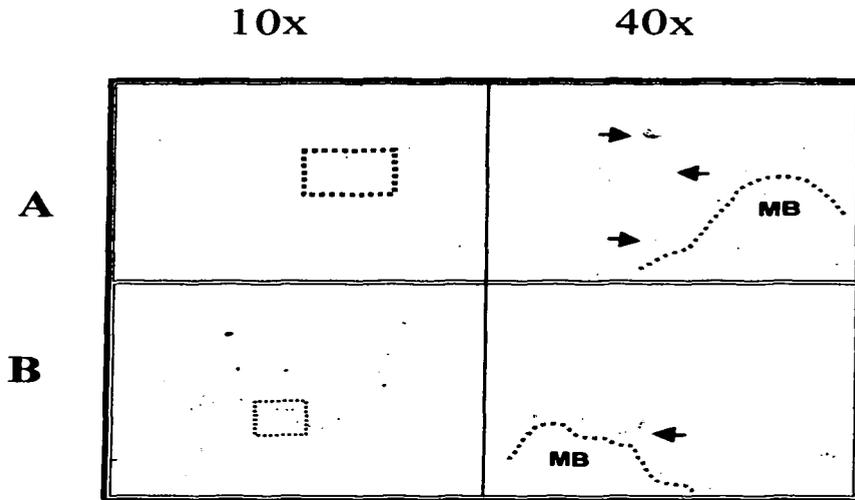


Figura 12. Inmunohistoquímica para la proteína PCNA en Cérnix de Ratón Transgénico Tg(K6-E6/E7)M8 y Silvestre CD1:  
A. Tg(K6-E6/E7)M8 con anticuerpo específico anti-PCNA  
B. Ratón Silvestre con anti-PCNA

**CD1**

**Tg[K6-E6/E7]M8**

**TUNEL**

**Control  
Positivo**

**Control  
Negativo**

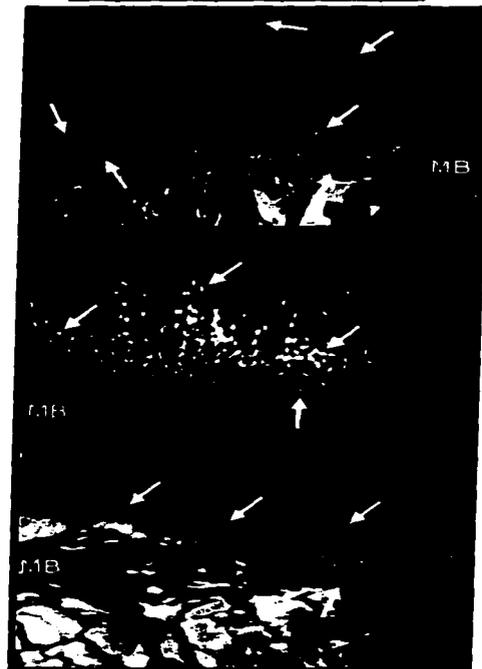
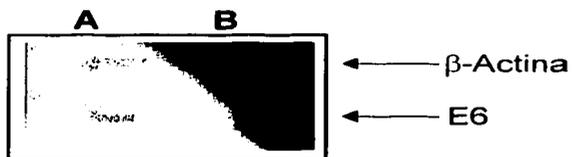


Figura 13. Análisis de TUNEL para detectar células apoptóticas en lengua de Ratones Silvestres CD1 y en Ratones Transgénicos Tg[K6-E6/E7] M8. El control positivo se realizó tratando los tejidos con DNasa y posteriormente se adicionó TdT. En el control negativo los tejidos no se trataron con DNasa y no se adicionó TdT. Por medio de las flechas podemos identificar los núcleos positivos (verdes) y negativos (anaranjados). MB: membrana basal.

Figura 14



Western blot para la detección de la proteína E6 de HPV en líneas celulares [keratinocitos transformados con A) con E6 y B) con E7 de HPV 16].  $\beta$  actina como control

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **8 Análisis de Resultados**

En ensayos iniciales para la inducción de tumores en los ratones Tg(K6-E6/E7)M8, se han observado algunos casos de carcinoma de ovario, en los cuales se ha detectado no sólo la expresión de las oncoproteínas virales sino también una señal intensa para la proteína oncogénica c-Myc sugiriendo una sobre-expresión de esta. Estos resultados indican que los ratones transgénicos de la línea Tg(K6-E6/E7)M8 representan un modelo experimental valioso para el estudio de algunos cánceres epiteliales.

Al analizar los epitelios teñidos con HE se hicieron manifiestas algunas irregularidades en las células de las diferentes capas en la epidermis de lengua de ratón Tg(K6-E6/E7)M8 como son: en la capa basal; presencia de algunos coilocitos, displasias moderadas, algunas células binucleadas, un aumento del número de células, infiltrado inflamatorio, contorno irregular de los núcleos, en la capa intermedia; binucleación, contorno irregular de núcleos cromatina en gránulos grandes, mitosis, dos o más núcleos e infiltrado inflamatorio, cabe mencionar que en ningún caso se observa displasia (figura 4C), esto no lo presentó el epitelio de los ratones silvestre CD1 (figura 4D). Por otro lado en los epitelios cervicales de los ratones Tg(K6-E6/E7)M8 se observa una desorganización de la capa basal celular, una irregularidad nuclear respecto a su forma (figura 4B), al hacer un comparativo de manera solamente cualitativa con el epitelio cervical de ratón silvestre CD1 vemos que hay una diferencia marcada en cantidad y conformación celular (figura 4A) que no se presenta en el caso silvestre.

Las IHQ para la identificación de la oncoproteína E6 en epitelio de lengua muestran una señal muy difusa, no muy homogénea, positiva para la identificación de la oncoproteína, si comparamos contra los epitelios silvestres CD1 y tejidos en los cuales no se aplicó Ab anti-E6, y aunque la señal es positiva no se logra diferenciar claramente cuando esta en núcleo o cuando en el citoplasma en las células de la capa basal (figura 5A) y esto podemos atribuirlo a que la proteína E6 puede ser transportada hacia citoplasma cuando se acopla a la proteína p53. El mismo argumento se maneja para el epitelio cervical (figura 6A). Por otro lado,

comparando con el tejido de ratón silvestre CD1 podemos ver que son evidentes los cambios celulares que se hicieron notar en la (figura 4) y afirmamos que así como está presente la proteína E6 también hay cambios celulares evidentes en el ratón Tg(K6-E6/E7)M8.

La amplificación específica de transcritos en tejidos mediante (RT-PCR *in situ*), nos permitió detectar la expresión del transgén E6/E7 en los ratones transgénicos, la señal obtenida se visualizó en el citoplasma de las células epiteliales, esto porque es donde se localiza el RNA una vez que es transcrito a partir del DNA. En tejidos silvestres no se detectó ninguna señal para este transcrito de acuerdo a lo esperado (Figura 7). La amplificación de transcritos requiere de la estandarización no sólo del tratamiento (por ejemplo; con proteinasa K, DNAsa, RNAsa etc.) de los tejidos, sino también del número de ciclos en la reacción por la polimerasa, para la amplificación de las copias del mRNA presente en las células, por lo que se realizó una cinética para determinar el número óptimo de ciclos para la amplificación de los transcritos de E6/E7 en lengua de ratón Tg(K6-E6/E7)M8; con un número bajo de ciclos obtuvimos una señal positiva pero débil (Figura 7A), al incrementarse el número de ciclos la detección de la señal se facilitó obteniéndose resultados evidentes a 15 y 18 ciclos de amplificación (Figura 7B y 7C). En tejidos de ratones CD1 incluso a 18 ciclos de amplificación, no se obtuvo ninguna señal (figura 7D), lo que indicó que las condiciones utilizadas fueron óptimas para una detección específica de los transcritos de E6/E7. Por otro lado la técnica de PCR *in situ* muestra como está presente el transgén mismo que podemos identificar por la presencia de señal azul en los núcleos (Figura 8A) y comparando con los controles que se pusieron, vemos que el ratón silvestre CD1 no presenta señal alguna por la falta de coloración (Figura 8B).

Como un buen complemento se realiza la amplificación *in vitro* del transgén (Figura 9) y del transcrito (Figura 10), con el auxilio de una previa extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA). Las (Figuras 9 y 10) muestran como se ve la presencia de una banda de DNA esperada aproximadamente de 250 pb, y que nos indica el tamaño del fragmento amplificado por medio del cual deducimos que el transgén realmente esta dentro del "genoma" del ratón Tg(K6-E6/E7)M8.

Dentro de lo que son las pruebas para verificar la presencia y expresión del oncogén E6 en el ratón Tg(K6-E6/E7)M8, precisamente como una parte de la caracterización de este, se realizaron la serie de experimentos mencionados anteriormente. Y es importante mencionar que como el ratón Tg(K6-E6/E7)M8 tiene insertados los genes E6 y E7 del HPV16 y así como es importante verificar la presencia y expresión de estos genes, también debemos considerar que existe una gran cantidad de genes que son afectados por la presencia de E6 y E7. Por lo que debemos tomar en cuenta otra serie de pruebas y experimentos igual de importantes como son: identificación de PCNA; esta proteína es un indicador de que se está generando una proliferación celular y precisamente algo de esto sucede en los epitelios del ratón Tg(K6-E6/E7)M8: en lengua Tg(K6-E6/E7)M8 (figura 11A), podemos ver como se manifiesta la presencia de esta proteína, en diferentes cantidades al comparar con CD1 (Figura 11B) la señal en los núcleos de Tg(K6-E6/E7)M8 es mucho muy significativa puesto que se presenta en casi todos las capas celulares del epitelio transgénico, mientras que solamente en la capa basal en el epitelio del silvestre CD1. De igual manera se puede ver en cervix que la presencia de la proteína PCNA alcanza diferentes estratos epiteliales y en algunos casos se puede identificar como se desorganiza la unicapa celular basal del epitelio de los Tg(K6-E6/E7)M8 (figura 12A), lo cual no ocurre en los CD1 (figura 12B). Así como la presencia de la proteína PCNA es significativa para determinar cuando hay alguna irregularidad celular epitelial (en este caso), también el análisis mediante la técnica de TUNEL nos permitió detectar aquellas células en estado apoptótico y de esta manera identificar si hay gran cantidad de células muriendo o si se manifiesta lo contrario, es decir que la muerte celular normal se vea suprimida o aumentada en este caso por la presencia de dos oncogenes E6 y E7. En las muestras de lengua en ratones Tg(K6-E6/E7)M8, se observó una disminución discreta en los niveles de apoptosis, tanto en el epitelio como en el estroma (Figura 13), en los ratones CD1 se detectaron niveles que se considera como normales para apoptosis, esto realmente es esperado porque de esta manera (aunque se tendría que hacer algunas pruebas más) podemos ver como el transgén está de alguna forma inhibiendo lo que sería una muerte celular

normal, en el control positivo podemos identificar como se vería la señal cuando hay muerte celular (Figura 13), donde se ve como la señal del DNA fragmentado está presente en casi todos los núcleos celulares.

A manera de control se realizó un western blot para verificar que los Abs que se emplearon son capaces de detectar la proteína E6 y E7 en cuestión dentro del trabajo, puesto que lo más importante es identificar la expresión de la proteína dentro de los ratones Tg(K6-E6/E7)M8.

## 9 Conclusiones

El gen que codifica para la proteína E6 de HPV16, fue genéticamente insertado en una cepa de ratones silvestres CD1, y se generó un ratón transgénico Tg[K6-E6/E7]M8 con la finalidad de obtener un modelo experimental que fuera encaminado para realizar estudios tendientes a solucionar un problema nacional; como lo es el Cáncer Cervico-Uterino. Por lo que es de vital interés, caracterizar este ratón transgénico Tg(K6-E6/E7)M8, que es donde se planteó el objetivo principal de este trabajo: La identificación de la presencia del oncogen E6 en diferentes epitelios del ratón transgénico Tg(K6-E6/E7)M8 a modo de expresión en diferentes niveles; mRNA y proteínas. Una de las formas *in vitro* para identificar la expresión de la proteína E6 de HPV16 definitivamente es por RT-PCR *in vitro* como se puede ver en la (figura 10). También es evidente en el epitelio de lengua y de cérvix, tal como se muestra en los estudios de IHQ con un anti-E6 (figuras 5 y 6); se ve como la señal esta presente de manera importante y significativa. Además de poder observar esto, los experimentos de RT-PCR *in situ* nos muestra que el mRNA de la proteína E6 se transcribió y está presente en los estratos de la capa epitelial (figura 7). Por otro lado a modo de complemento el PCR *in situ* directo sobre el tejido epitelial muestra que sí está insertado el gen E6 dentro del genoma del ratón Tg(K6-E6/E7)M8 tal como se esperaba.

Se puede decir que con las pruebas de IHQ contra PCNA (figuras 11y12), identificamos un cambio celular muy marcado que podemos atribuirle a la presencia del transgén E6/E7 puesto que se ven manifiestas grandes diferencias entre el silvestre CD1 y el Tg(K6-E6/E7)M8, de alguna manera los genes E6 y E7 estimulan la proliferación y/o la no muerte normal de las células, como se puede evidenciar la técnica de TUNEL (figura 13), donde se ve que no hay muerte celular anormal incluso sea menos que el silvestre.

Por todo lo anterior puedo concluir que el objetivo principal, al igual que los objetivos particulares se alcanzaron satisfactoriamente, ya que se identifico la proteína E6 del HPV en los epitelios mencionados de los ratones Tg[K6-E6/E7]M8. Y que nuestro modelo experimental *in vivo* es candidato serio para ayudar a resolver grandes problemas de salud en México y el mundo.

## **10 Propuestas y/o Recomendaciones**

Debido a que en el ratón Tg(K6-E6/E7)M8, la generación de tumores no es espontánea solo por la presencia de los genes E6 y E7 de HPV. Es importante buscar la forma de que por medio de algún estímulo físico o químico se le ayude a generar los tumores y que de esta forma sea eficiente para los fines que se creó. Posteriormente hacer evaluación de la expresión de genes que están involucrados directamente con la proliferación celular y con la apoptosis.

## 11 Referencias

1. Mohar A, Lazcano E, Gariglio P, et al. Carcinoma cérvico-uterino en México: Una perspectiva multidisciplinaria. En: J.R. de la Fuente y J. Sepúlveda, Compiladores. Diez Problemas de Salud Pública. Fondo de Cultura Económica; 1999; p. 187-208.
2. Kurmann R, Norris H, Wilkinson E. Atlas of tumor pathology. Tumors of the Cervix, Vagina and Vulva. Armed Forces Institute of Pathology, Washintong, D.C. 1992; p. 262.
3. Fuchs P, Pfister. Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirolgy*, 1994; 37(3-4):159-167.
4. Figueroa AP, Gariglio P. Infección por el Virus del Papiloma Humano y Cáncer Cervico-uterino. *Infectologia*. 1990; 10(4): 231-240.
5. zur Hausen H. Papillomaviruses in Human Cancer. *Cancer*. 1987; 59(10): 1692-1696.
6. zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. En : zur Hausen H, *Human pathogenic papillomaviruses. Current Topics and Immunology*, 1994: 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. 1994; p.131-156.
7. Vousden KH. Human Papillomavirus Oncoproteins. *Semin Cancer Biol*. 1990;1(6):415-24.
8. Meyers C, Laimins LA. *In Vitro* systems for the study and propagation of human papillomavirus. En : zur Hausen, H., *1994. Human pathogenic papillomaviruses. Current Topics and Immunology*, 1994: 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. 1994; p. 199-215.
9. Mc Dougal JK. En : zur Hausen H., *1994. Human pathogenic papillomaviruses. Current Topics and Immunology*, 1994: 186. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. 1994; p. 101-119.
10. Bosch FX, Castellsague X, Munoz N, de Sanjose S, Ghaffari AM, Gonzalez LC, Gili M, et al. Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. *J Natl. Cancer Inst*. 1996; 88(15):1060-7
11. zur Hausen, 1996; 19<sup>th</sup> HPV meeting, 2001
12. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248:76-79.
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: 934-937.
14. Scheffner M, Romanczuk H, Münger K, Huibregtse JM, Mietz JA, Howley PM. Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186: 83-99.
15. zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991; 184: 9-13.
16. Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2436-2440.

17. Schiffman M, Halye NJ, Felton J S, Adrews AW, Kaslow, RA, Lancaster WD, et al. Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituents in the cervix. *Cancer Res* 1987; 47: 3886-3888.
18. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat. Genet* 1994; 6: 157-162.
19. Schneider A, Hotz M, Gissmann L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 1987; 40: 198-201.
20. Brisson J, Morin C, Roy M, Bouchard C, Leclerc Jmeisels A, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low-and high-grade lesions. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 700-710.
21. Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991; 254:1167-1173.
22. Wang XW. Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res* 1999; 19: 4759-4771.
23. Arrowsmith CH. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1169-1173.
24. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18: 7621-7636.
25. Aranda A, Orozco F, García E, Gariglio P. p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1446:181-192.
26. Wani M, Zhu Q, El-Mahdy M, Venkatachalam S, Wani AA. Enhanced sensitivity to anti-benzo(a)pyrene-diol-epoxide DNA damage correlates with decreased global genomic repair attributable to abrogated p53 functions in human cells. *Cancer Res* 2000; 15: 2273-2280.
27. Agarwal M, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J Biol Chem* 1998; 273: 1-4.
28. Hidalgo A, Schewe C, Petersen S, Salcedo M, Gariglio P, Schluns K, et al. Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines. *Eur J Cancer* 2000; 36: 542-548.
29. Arbeit JM, Münger K, Howley PM, Hanahan D. Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E6/E7 ORF's. *Am J Pathol* 1993; 142: 1187-1197.
30. Griep AE, Herber E, Jeon S, Lohse JK, Dubielzig RR, Lambert PF. Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J Virol* 1993; 67: 1373-1384.
31. Lambert PF, Pan H, Pitot HC, Liem A, Jackson M, Griep AE. Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5583-5587.
32. Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* 1999; 7:5887-93.

33. Escalante D, Recillas F, Marroquin A, Gutierrez L, Gariglio P, Covarrubias L. Expression of E6 and E7 papillomavirus oncogenes in the outer root sheath of hair follicles extends the growth phase and bypasses resting at telogen. *Cell Growth & Differentiation* 2000;11: 527-539.
34. Song S, Liem A, Miller JA, Lambert PF. HPV type 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. *Virology* 2000; 267(2): 141-150.
35. Arbeit J, Münger K, Howley P, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol* 1994; 4358-4368.
36. Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2930-2935.
37. Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res* 2000; 60: 1267-1275.
38. Zur Hausen, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta*. 1996; 1288: F55- F78.
39. Pfister, H. The role of human papillomavirus in anogenital cancer. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 1996; 23: 579-595.
40. Guido, M., Zamorano, R., Garrido, E., Gariglio, P., Garcia, A. Early promoters of genital and cutaneous HPVs are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J General Virol* 1992. 73: 1395-1400.
41. Stöppler, H., Stöppler, M.C. and Schlegel, R. Transforming proteins of the papillomaviruses. *Intervirol* 1994; 37: 168-179.
42. Griep AE, Herbert E, Jeon S, et al. Tumorigenicity by HPV type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation. *J Virol*. 1993; 67: 1373-1384.
43. Lambert PF, Pan H, Pitot HC, Liem A, Jackson M. and Griep AE. Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice *Proc. Natl Acad. Sci.. USA.* 1993; 90:5583-5587.
44. Song S, Liem A, Miller JA, and Lambert PF. HPV type 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis. 2000; *Virology* 267 (2): 141-150.
45. Arbeit J, Munger K, Howley P and Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human HPV16 transgenic mice. 1994; *J. Virol.* 4358-4368.
46. Arbeit JM. et al. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci.. USA.* 1993; 93: 2930-2935.
47. Elson DA, Riley RR, Lacey A, and Arbeit JM. Sensivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. 2000; 60: 1267-1275.
48. Andrew R. Heryet y Kevin C. Gater. *Immunocytochemistry for light microscopy. En: Diagnostic Molecular Pathology A Practical Approach, Oxford University Press, 1992; p 7-10.*
49. Gavrieli Y Sherman Y Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992; 119(3): 493-501.

50. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991; 72:1039-44.
51. Gramza AW, Lucas JM, Mountain RE, Schuller DE, Lang JC. Efficient method for preparing normal and tumor tissue for RNA extraction. *Biotechniques* 1995; 18:228-31.
52. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-4, 536-7
53. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; 76(9): 4350-4.
54. Burnette WN. "Western blottin": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981; 112(2):195-203.

## **12. Anexos**

### **A Pies de figura**

Figura 1. A) Mapa Genómico del Papilomavirus Humano tipo 16 (HPV16). El genoma del HPV16 está constituido por 2 genes de expresión tardía (del inglés Late; L1 y L2), 6 genes de expresión temprana (del inglés Early; E1,E2,E4,E5,E6 y E7). También, el genoma viral posee un promotor P97 y una Región Larga de Control (LCR), B) Esquema general de las diferentes capas celulares que conforman la epidermis del epitelio.

Figura 2. Integración del Papilomavirus Humano al genoma celular. Se señala la ausencia de E2 y un aumento en la expresión de E6 y E7.

Figura 3. Representación esquemática de la construcción bK6-E6/E7 con la que se creó el ratón transgénico: Un fragmento de 0.8 kb conteniendo a los oncogenes E6 y E7 del HPV16 se fusionó con un fragmento de 9.8 kb del gen bK6 (gen de la queratina 6 de origen bovino; su característica principal es que se expresa en epitelio) que contiene el promotor y su región reguladora, junto con un fragmento genómico del SV40 que contiene una señal de poliadenilación.

Figura 4. Tinción con HE de tejidos cervical y lengua de ratones Tg(K6-E6/E7)M8 y de ratones silvestre CD1 (20X y 40X ), MB= membrana basal.

A Cérvix silvestre CD1,                      B Cérvix Tg(K6-E6/E7)M8.  
C Lengua Tg(K6-E6/E7)M8,              D Lengua Silvestre CD1.

Figura 5. Inmunohistoquímica para la oncoproteína E6 de HPV16 en lengua de ratón Tg(K6-E6/E7)M8 y ratón silvestre CD1 (10 y 20X ).

A. Tg(K6-E6/E7)M8 con Ab específico anti-E6 de HPV16.  
B. Ratón silvestre con anti-E6 de HPV16.  
C. Tg(K6-E6/E7)M8 sin Ab primario.

Figura 6. Inmunohistoquímica para la oncoproteína E6 de HPV16 en Cérvix de ratón Tg(K6-E6/E7)M8 y ratón silvestre CD1. MB= membrana basal.

- A. Tg(K6-E6/E7)M8 con Ab específico anti-E6 de HPV16, 10X y 40X respectivamente.
- B. Ratón silvestre con anti-E6 de HPV16, 10X y 20X respectivamente.
- C. Tg(K6-E6/E7)M8 sin Ab primario, 10X y 20X respectivamente.

Figura 7. Determinación del número óptimo de ciclos en RT-PCR *in situ* para E6/E7 de HPV16 en lengua de ratón transgénico Tg(K6-E6/E7)M8 y ratón silvestre CD1(10X y 20X).

- A Lengua Tg(K6-E6/E7)M8 5 ciclos
- B Lengua Tg(K6-E6/E7)M8 15ciclos
- C Lengua Tg(K6-E6/E7)M8 18ciclos
- D Lengua silvestre CD1 15 ciclos

Figura 8. PCR *in situ* para E6/E7 de HPV16 en lengua de ratón Tg(K6-E6/E7)M8 y ratón silvestre CD1 (10X y 20X respectivamente en todos los incisos).

- A) Tg(K6-E6/E7)M8,
- B) Tg(K6-E6/E7)M8 sin Taq polimerasa,
- C) Ratón silvestre CD1
- D) Ratón silvestre CD1 sin Taq polimerasa.

Figura 9. Amplificación del transgén E6/E7 en epitelios de ratones transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8, mediante PCR *in vitro*: 1)Lengua Tg(K6-E6/E7)M8, 2)Lengua CD1 silvestre, 3)Cérvix Tg(K6-E6/E7)M8, 4)Cervix CD1 silvestre, 5)Células SW13 HPV negativas (Células de cáncer cervical), 6)Células C-4.1 HPV positivas (Células de Cáncer Cervical), 7)Control Negativo sin templado. MW: marcador de peso molecular, 50 pb.

Figura 10. Amplificación del transcrito para E6/E7 en epitelios de ratones transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8 y CD1 WT, (mediante RT-PCR *in vitro*): 1) lengua de ratón CD1 Wt, 2) lengua de ratón Tg(K6-E6/E7)M8, 3) cérvix de ratón CD1 Wt, 4) cervix de ratón Tg(K6-E6/E7)M8, 5) línea celular sin HPV. 6) línea celular con HPV y MW: marcador de peso molecular, 50 pb.

Figura 11. Inmunohistoquímica para la proteína PCNA en lengua de ratón transgénico Tg(K6-E6/E7)M8 y silvestre CD1:

- A. Tg(K6-E6/E7)M8 con Ab específico anti-PCNA
- B. ratón silvestre CD1 con anti-PCNA
- C. Tg(K6-E6/E7)M8 sin Ab primario

Figura 12. Inmunohistoquímica para la proteína PCNA en cérvix de ratón transgénico Tg(K6-E6/E7)M8 y silvestre CD1:

- A. Tg(K6-E6/E7)M8 con anticuerpo específico anti-PCNA
- B. ratón silvestre con anti-PCNA

Figura 13. Análisis de TUNEL para detectar células apoptóticas en lengua de ratones silvestres CD1 y en ratones transgénicos Tg(K6-E6/E7)M8. El control positivo se realizó tratando los tejidos con DNAsa y posteriormente se adicionó TdT. En el control negativo los tejidos no se trataron con DNAsa y no se adicionó TdT. Por medio de las flechas podemos identificar los núcleos positivos (verdes) y negativos (anaranjados). MB: membrana basal.

Figura 14. Western blot para la detección de la proteína E6 de HPV en líneas celulares; Queratinocitos inmortalizados que contienen E6 y E7 de HPV 16 A y B respectivamente, con la finalidad de verificar la especificidad del Ab contra E6 (CIP HPV 16 E6 de Sta. Cruz, Biotechnology, inc).

## **B Soluciones y reactivos**

**ACIDO ETILEN-DIAMINOTETRA-ACETICO (EDTA 0.5 M, pH 8.0).** Se pesaron 168.1 g de EDTA dihidratado y se disolvieron en 800 mL de agua bidestilada, se agregaron algunas lentejas de hidróxido de sodio para alcalinizar un poco el medio y facilitar la disolución del EDTA. Se ajustó a pH 8.0. Se aforó a 1 L y se esterilizó en autoclave.

**ACETATO DE SODIO 3 M.** Se pesaron 408.1 g de Acetato de Sodio y se disolvieron en 800 mL de agua bidestilada. Se ajustó a pH 5.2 con ácido acético glacial. Se ajustó a 1 L y se esterilizó en autoclave.

**ACETATO DE POTASIO 5 M.** Se pesaron 58.88 g de acetato de potasio y se disolvieron en 120 mL de agua bidestilada.

**BROMURO DE ETIDIO (10 mg/mL).** Se pesaron 1 g de bromuro de etidio y se disolvieron en 100 mL de agua bidestilada, se agitó durante varias horas hasta su disolución total. Se envasó en frasco ámbar y se almacenó a 4 C°.

**CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMILICO (24:1).** Se preparó una solución con 24 volúmenes de cloroformo por cada volumen de alcohol isoamílico.

**BUFFER DE CARGA PARA ACIDOS NUCLEICOS.** La preparación del colorante para muestras se realizó de la siguiente manera:

Xilen Cianol	0.25 %	Tris pH 8.5	0.1 M
Azul de Bromofenol	0.25 %	EDTA pH 8.0	0.06 M
Glicerol	50 %	Todo disuelto en agua	

**CLORURO DE MAGNESIO 1 M.** Se pesaron 203.3 g de cloruro de magnesio hexahidratado, se disolvieron en 800 mL de agua bidestilada, y se aforó a 1 L. Se esterilizó en autoclave.

**CLORURO DE SODIO 5 M.** Se pesaron 292.2 g de cloruro de sodio y se disolvieron en 800 mL de agua bidestilada aforando a 1 L.

**DNA DESNATURALIZADO DE ESPERMA DE SALMON (10 mg/mL).** Se pesaron 100 mg de DNA de esperma de salmón (Sigma tipo III de la sal de sodio). Se agitó de 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Se rompió por pasaje en jeringa con aguja delgada varias veces. Se llevó a ebullición durante 10 minutos en baño maría y se almacenó en alícuotas a -20 C°. Antes de utilizarse, se llevó a ebullición de 5 a 10 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo.

**DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS pH 7.2).** Se preparó una solución de SDS al 10 %. Se pesaron 10 g de SDS y se agregaron 90 ml de agua bidestilada. Se calentó a 68 C° para disolver, se ajustó a pH 7.2 y se aforó a 100 mL.

**FENOL SATURADO CON TRIS-HCl pH 8.0.** Se utilizó fenol ultrapuro redestilado (grado biología molecular). El fenol se calentó a 60°C hasta disolverse, se añadieron 500 ml de Tris base 50 mM y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Se dejó en reposo hasta separación de fases y se eliminó la fase acuosa (fase superior). Se añadieron 500 mL de Tris-Cl pH 8.0 50 mM, se mezcló y se separaron las fases; se eliminó la fase acuosa y se repitió 2 veces o hasta lograr un pH 8.0. Posteriormente se añadieron 250 mL de TE (ver más adelante) y se almacenó a 4° C en un frasco ámbar.

**FORMAMIDA (DESIONIZADA).** Por cada 50 mL de Formamida se agregaron 5 g de resina de intercambio iónico (Bio-Rad AG501-X8). Se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se filtró y almacenó a - 20°C.

**PROTEINASA K.** Se preparó una solución de Proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL en agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20°C, la concentración de trabajo es de 50 mg/mL, su temperatura de reacción es de 37° a 50°C.

**RIBONUCLEASA (LIBRE DE DESOXIRIBONUCLEASA).** Se disolvió ribonucleasa pancreática (RNAsa A) a una concentración de 10 mg/mL en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5) y NaCl 15 mM. Se calentó a ebullición en un baño maría durante 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se guardó en alícuotas a  $-20^{\circ}$  C. Concentración de trabajo: 50 mg/mL.

**SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA DE FOSFATOS, pH 7.2 (PBS).** Se añadieron aproximadamente 500 mL de agua bidestilada a un vaso de precipitados de 2 L y se pesaron:

NaCl	8 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KCl	0.2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g

Se mezcló hasta disolver y se añadió agua bidestilada hasta 900 mL, se mezcló de nuevo y se ajustó a pH 7.2, se aforó a 1 L y se esterilizó en autoclave.

**SOLUCION AMORTIGUADORA DE LISIS.** Se preparó una solución en agua bidestilada con las siguientes concentraciones:

NaCl	100 mM
Tris pH 8.0	10 mM
EDTA	25 mM
Dodecil Sulfato de Sodio	0.5 %

Se esterilizó en autoclave

**SOLUCION DE DENHARDT (50 X).** Se pesaron 5 g de Ficoll tipo 400, 5 g de polivinilpirrolidona y 5 g de albúmina sérica bovina. Se disolvieron en 500 mL de agua bidestilada, se esterilizó por filtración y se almacenó en alícuotas a  $-20^{\circ}$  C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**SOLUCION AMORTIGUADORA DE TRIS-EDTA, pH 7.5 y pH 8.0 (TE).** Se preparó una solución:

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Se ajustó a pH 7.5, o bien a pH 8.0

Se esterilizó en autoclave

**TRIS 1M.** Se disolvieron 121.1 g de Tris base en 800 mL de agua bidestilada, se ajustó al pH deseado con ácido clorhídrico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN