

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE *E6* Y *E7* (HPV 16) SOBRE LA
EXPRESIÓN DE *MDM2* EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER
CERVICAL**

Por

Daniel Díaz García

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

Marzo, 2009

...when you have eliminated the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth.

-Sir Arthur Conan Doyle

Anyone who has never made a mistake has never tried anything new.

EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE E6 Y E7 (HPV 16) SOBRE LA

A theory is a methodical way of thinking about the world based on facts. A hypothesis is a prediction that can be tested by further observation or experiment.

EXPRESIÓN DE MDM2 EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER

The beginning of wisdom is to doubt the dogmatism of your own opinions.

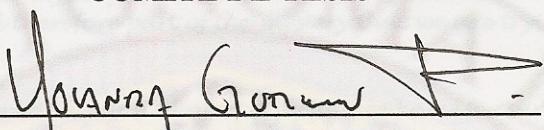
-Friedrich Nietzsche

CERVICAL

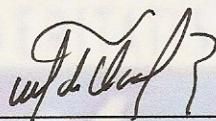
To abandon duty is to destroy that which makes man an individual unique and capable of prodigious feats. Duty is the essence of life, it is the only thing over which death has no dominion. It is true immortality.

-Friedrich Nietzsche

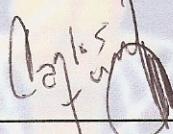
COMITÉ DE TESIS



Dra. Yolanda Gutiérrez Puente
Director de Tesis



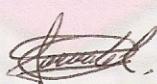
Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director de Tesis



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Secretario



Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
Vocal



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Vocal

...when you have eliminated the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth.

~Sir Arthur Conan Doyle

Anyone who has never made a mistake has never tried anything new.

~Albert Einstein

A theory is something nobody believes, except the person who made it. An experiment is something everybody believes, except the person who made it.

~Albert Einstein

The beginning of knowledge is the discovery of something we do not understand.

-Frank Herbert

To abandon duty is to destroy that which makes any individual unique and capable of prodigious feats. Duty is the essence of life. It is the only thing over which death has no dominion. It is true immortality.

~Eric van Lustbader

Science cannot solve the ultimate mystery of nature. And that is because, in the last analysis, we ourselves are part of nature and therefore part of the mystery that we are trying to solve.

~Max Planck

What gets us into trouble is not what we don't know; it's what we know for sure that just ain't so.

~Mark Twain

The Road Not Taken

Robert Frost

*Two roads diverged in a yellow wood,
And sorry I could not travel both
And be one traveler, long I stood
And looked down one as far as I could
To where it bent in the undergrowth;*

*Then took the other, as just as fair,
And having perhaps the better claim,
Because it was grassy and wanted wear;
Though as for that the passing there
Had worn them really about the same,*

*And both that morning equally lay
In leaves no step had trodden black.
Oh, I kept the first for another day!
Yet knowing how way leads on to way,
I doubted if I ever should come back.*

*I shall be telling this with a sigh
Somewhere ages and ages hence:
Two roads diverged in a wood, and I -
I took the one less traveled by
And that has made all the difference.*

Ulysses

It little profits that an idle king,
By this still hearth, among these barren crags,
Match'd with an aged wife, I mete and dole
Unequal laws unto a savage race,
That hoard, and sleep, and feed, and know not me.

I cannot rest from travel; I will drink
Life to the lees. All times I have enjoy'd
Greatly, have suffer'd greatly, both with those
That loved me, and alone; on shore, and when
Thro' scudding drifts the rainy Hyades
Vext the dim sea. I am become a name;
For always roaming with a hungry heart
Much have I seen and known, -- cities of men
And manners, climates, councils, governments,
Myself not least, but honor'd of them all, --
And drunk delight of battle with my peers,
Far on the ringing plains of windy Troy.

I am a part of all that I have met,
Yet all experience is an arch wherethro'
Gleams that untravell'd world whose margin fades
For ever and for ever when I move.
How dull it is to pause, to make an end,
To rust unburnish'd, not to shine in use!
As tho' to breathe were life! Life piled on life
Were all too little, and of one to me
Little remains; but every hour is saved
From that eternal silence, something more,
A bringer of new things; and vile it were
For some three suns to store and hoard myself,
And this gray spirit yearning in desire
To follow knowledge like a sinking star,
Beyond the utmost bound of human thought.

This is my son, mine own Telemachus,
to whom I leave the sceptre and the isle, --
Well-loved of me, discerning to fulfill
This labor, by slow prudence to make mild
A rugged people, and thro' soft degrees
Subdue them to the useful and the good.
Most blameless is he, centred in the sphere

Of common duties, decent not to fail
In offices of tenderness, and pay
Meet adoration to my household gods,
When I am gone. He works his work, I mine

There lies the port; the vessel puffs her sail;
There gloom the dark, broad seas. My mariners,
Souls that have toil'd, and wrought, and thought with me,-
That ever with a frolic welcome took
The thunder and the sunshine, and opposed
Free hearts, free foreheads, -- you and I are old;
Old age hath yet his honor and his toil.
Death closes all; but something ere the end,
Some work of noble note, may yet be done,
Not unbecoming men that strove with Gods.
The lights begin to twinkle from the rocks;
The long day wanes; the slow moon climbs; the deep
Moans round with many voices. Come, my friends.
'T is not too late to seek a newer world.
Push off, and sitting well in order smite
The sounding furrows; for my purpose holds
To sail beyond the sunset, and the baths
Of all the western stars, until I die.
It may be that the gulf's will wash us down;
It may be we shall touch the Happy Isles,
And see the great Achilles, whom we knew.
Tho' much is taken, much abides; and tho'
We are not now that strength which in old days
Moved earth and heaven, that which we are, we are,--
One equal temper of heroic hearts,
Made weak by time and fate, but strong in will
To strive, to seek, to find, and not to yield.

Alfred Tennyson
(1809-1892)

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por todo el apoyo brindado durante mi formación y sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

No. De Becario 163557

Clave del Proyecto 49196-M

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Manipulación Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. y en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.

DEDICATORIA

Para Estela y Bernardo...

Para mi papá, gracias por estar en todo momento a mi lado, siempre con palabras de aliento
y tu interminable optimismo.

Para mamá, quien me ha enseñado gran parte de lo que sé, siempre con tu fuerte e
inquebrantable presencia.

Para Bárbara, gracias por tu apoyo en mis momentos difíciles y por hacerme reír tanto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Roberto Montes de Oca, quien, con todo y a pesar de todo, me obsequió la oportunidad de trabajar con él, siempre me dio su apoyo y me impulsó para aprender cosas nuevas, me enseñó a preguntar, antes que nada, “¿por qué?”, me instó a innovar, improvisar y sobre todo a buscar la mejor y más práctica solución, creyó en mí y no permitió que abandonara mis estudios. Gracias por todo, Doc.

A la Dra. Yolanda Gutiérrez Puente, por su gran e incondicional apoyo.

A la Dra. Lilia H. Morales Ramos sin cuya ayuda y enorme apoyo la obtención de mi grado no hubiera sido posible.

A mi comité de tesis: Dra. Yolanda Gutiérrez, Dr. Carlos Hernández, Dr. Roberto Montes de Oca, Dr. Mario Morales y Dra. Odila Saucedo.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides y su “staff” por la instrucción proporcionada en el ámbito del cultivo celular y por el apoyo brindado.

A la Dra. María Julia Verde Star, quien me recibió y orientó cuando por primera vez llegué a la FCB, UANL, y quien alguna vez me dijo –“Aún recuerdo cuando era usted un chiquillo!”, gracias, Doctora.

A mis maestros, Dr. Juan M. Alcocer González, Dr. Juan F. Contreras Cordero, Dr. Rahim Foroughbakchk Pournavab, Dr. Carlos E. Hernández Luna, Dr. Roberto Montes de Oca Luna, Dr. Benito Pereyra Alférez, Dra. Lydia G. Rivera Morales, Dra. María de los Ángeles Rojas, Dra. Laura M. Trejo Ávila y al Dr. Pablo Zapata Benavides, por la gran educación proporcionada.

A mis compañeros de laboratorio: Adolfo, Analí, Aracely, Arelí, Armando, Arnulfo, Blanca, Carlos, Cathy, Cecy, Cristian, David, Deyanira, Diana, Franco, Gaby, Gil, Humberto, Jorge, Julio, Katy, Lalo, Laura, Luis, Marcos, Mariana, Marychú, Naty, Nayma, Pablo y Sonia (creo que son todos y espero no haber omitido a nadie) con quienes compartí buenos momentos, me ayudaron y me enseñaron muchas cosas. Les deseo a todos lo mejor, siempre.

A la Dra. Guillermina Lozano, al Dr. Tomoo Iwakuma y al Dr. Héctor Martínez. Gente brillante de la cual aprendí muchas cosas.

A la Dra. Clara Díaz Velázquez y al M.C. Mauricio Andrés Salinas Santander por los valiosos consejos y ayuda que me dieron durante el desarrollo de este trabajo.

A Fito, Franco, Laura, Mariana y Marychú, buenos amigos y compañeros de charlas interminables sobre mil y un temas.

Por último, quiero agradecer de forma muy especial a aquellas personas que me han brindado su gran e incondicional amistad, consejos, compañía y optimismo en todo momento, en especial los difíciles (que siempre pueden ponerse peor): Claudio, Gamita y el Gran Mauro (CDTM). No existen las palabras adecuadas para hacerles saber mi enorme agradecimiento, cariño y aprecio.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	vii
Agradecimientos	viii
Lista de Figuras.....	xi
Índice de Tablas	xiii
Nomenclatura.....	xiv
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Hipótesis	6
Importancia y Justificación	7
Objetivos	8
Antecedentes	
Cáncer Cervical y HPV	9
Características Generales de E6 y E7, HPV.....	10
Características Generales de P53	13
Características Generales de Rb	16
Características Generales de Mdm2.....	17
Generalidades del RNA de Interferencia	20
Material y Métodos	24
Diseño Experimental.....	28
Actividades a Realizar.....	29
Metodología	31
Resultados	
<u>Crear un vector para la expresión inducible de shRNA.</u>	
Elección de un Promotor para la Expresión de RNAi.....	41
Introducir la Secuencia Operadora TetO1 dentro del Promotor de RNAPolIII U6.....	41

Clonar un Cassette de Selección en el Vector pSilencer-U6 _{TetO1}	44
<u>Clonar las secuencias de shRNA en el vector inducible <i>pSilencer</i>_{TZ}.</u>	
Alinear y Clonar las Secuencias de shRNA en pSilencer _{TZ}	46
<u>Crear una línea celular de cáncer cervical que exprese de manera estable la proteína de represión TetR.</u>	
Transfectar el Plásmido pcDNA6/TR en la Línea Celular SiHa.....	48
Detectar el gen TetR por PCR en las Líneas Establemente Transfектadas con pcDNA6/TR.....	48
Detectar la Expresión de TetR por RT-PCR en las Líneas Establemente Transfектadas con pcDNA6/TR	49
Ensayo LacZ en las Líneas Establemente Transfектadas con pcDNA6/TR.....	50
<u>Crear líneas celulares de cáncer cervical establemente transfectadas con los vectores de expresión de shRNA.</u>	
Determinar el Funcionamiento del Promotor U6 _{TetO1}	51
Transfectar en SiHa/TR los Plásmidos que Expresan RNA de Interferencia para los Genes E6 y E7 (HPV-16)	52
Genotipificar las Líneas Celulares Establemente Transfектadas por PCR.....	53
<u>Determinar si existe un cambio en la expresión de Mdm2 provocado por la inhibición de E6 y E7 en una línea celular de cáncer cervical.</u>	
Estandarizar las Reacciones de PCR Semi-Cuantitativo.....	57
Analizar el Efecto del Silenciamiento Post-Transcripcional de E6 y E7 (HPV-16) por medio de RNAi en la Expresión de Mdm2 por medio de PCR Semi-Cuantitativo	60
Discusión	71
Conclusiones	74
Literatura Citada	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Virus de papiloma humano	10
2. Mecanismos de acción de E6 y E7	11
3. E6, HPV	12
4. E7, HPV	12
5. P53	14
6. Mecanismos de acción de P53	15
7. pRb	16
8. Mecanismo de acción de pRb	17
9. Mdm2	17
10. Esquema de actividad de Mdm2	20
11. RNAi	22
12. pSilencer 1.0	24
13. pcDNA6/TR	25
14. pcDNA4/TO/ <i>LacZ</i>	25
15. pEGFP-N3	26
16. Co-transfección GFP	37
17. Esquema de alineación de oligos de U6	38
18. Esquema de inducción por tetraciclina	39
19. Esquema tet-on/tet-off	43
20. PCR U6	43
21. <i>pSilencer_{TetO1}</i>	44
22. PCR zeocina	45
23. <i>pSilencer_{tz}</i>	45
24. Caracterización de <i>pSilencer_{tz}</i>	46
25. Esquema gráfico de la expresión de shRNA	46
26. pS _{tz} -shRNA	48
27. PCR TetR	49

Figura	Página
28. RT-PCR TetR	49
29. Tinción LacZ.....	50
30. Análisis GFP	52
31. PCR zeo	53
32. PCR estandarización U6tet fwd-U6 rvs.....	54
33. PCR estandarización U6tet fwd-pSU6 rvs.....	55
34. PCR estandarización U6tet fwd-U6tetO1 rvs.....	55
35. Genotipificación U6tet fwd-U6 rvs	56
36. Genotipificación U6tet fwd-U6tetO1 rvs	56
37. Genotipificación U6tet fwd-pSU6 rvs	57
38. PCR multiplex.....	58
39. Curva de estandarización semi-cuantitativa de <i>Mdm2</i>	58
40. Curva de estandarización semi-cuantitativa de <i>p53</i>	59
41. Curva de estandarización semi-cuantitativa de <i>E6</i>	59
42. Curva de estandarización semi-cuantitativa de <i>E7</i>	60
43. Calidad de RNA.....	61
44. Análisis estadístico de la expresión de MDM2	62
45. Análisis estadístico de la expresión de p53	63
46. Análisis estadístico de la expresión de E6*I.....	64
47. Análisis estadístico de la expresión de E6*II	64
48. Análisis estadístico de la expresión de E7	65
49. Análisis estadístico de la expresión de MDM2, clonas shRNA-mdm2.....	66
50. Análisis estadístico de la expresión de p53, clonas shRNA-mdm2.....	67
51. Análisis estadístico de la expresión de E6*I, clonas shRNA-mdm2	68
52. Análisis estadístico de la expresión de E6*II, clonas shRNA-mdm2.....	68
53. Análisis estadístico de la expresión de E7, clonas shRNA-mdm2	69
54. RT.PCR para el análisis de TetR	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Prueba “t” en la expresión de mdm2	62
2. Prueba “t” en la expresión de p53.....	63
3. Prueba “t” en la expresión de E6*I.....	63
4. Prueba “t” en la expresión de E6*II.....	64
5. Prueba “t” en la expresión de E7	65
6. Prueba “t” en la expresión de mdm2, clonas shRNA-mdm2.....	66
7. Prueba “t” en la expresión de p53, clonas shRNA-mdm2	67
8. Prueba “t” en la expresión de E6*I, clonas shRNA-mdm2	67
9. Prueba “t” en la expresión de E6*II, clonas shRNA-mdm2	68
10. Prueba “t” en la expresión de E7, clonas shRNA-mdm2	69
11. Diferencia de expresión de los genes analizados.....	72

NOMENCLATURA

,	minutos
”	segundos
aa	aminoácidos
Arg	arginina
°C	grados centígrados
µg	microgramos ($1\mu\text{g}=0.000\ 001$ gramos)
µl	microlitros ($1\ \mu\text{l}=0.001$ ml)
µM	micromolar ($1\mu\text{M}=0.000\ 001$ Molar)
A	adenina
bp	pares de bases
BSA	albumina de suero bovino
C	citosina
CaCl ₂	cloruro de calcio
cDNA	DNA codificante
<i>cis</i>	<i>definición.</i> - que actúa sobre la misma molécula de la cual se origina
CO ₂	dióxido de carbono
cRNA	RNA complementario
DDH ₂ O	agua doble destilada
DEPC	di-etyl pirocarbonato
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil sulfoxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucléotido trifosfato
dsRNA	RNA de doble cadena
EDTA	ácido tetra.acético etilen-di-amino
EGTA	ácido etilen-glicol tetra-acético
<i>g</i>	gravedad aparente causada por aceleración
G	guanina
GFP	proteína verde fluorescente
HPV	Virus de Papiloma Humano
Kbp	kilo pares de bases (1,000 bp)
KCl	cloruro de potasio
KDa	kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	fosfato de potasio monobásico
KOAc	acetato de potasio
M	Molar (peso molecular, en gramos, de un soluto disuelto en 1 litro de solvente)
mg	miligramos ($1\text{mg}=0.001$ gramos)
MgCl ₂	cloruro de magnesio
min	minutos
ml	mililitros (1 litro=1000 mililitros)
mM	milimolar ($1\text{mM}=0.001$ Molar)
MOPS	3-(N-morfilino) ácido propanosulfónico

mRNA	RNA mensajero
NaOAc	acetato de sodio
Na ₂ HPO ₄	fosfato di-sódico
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
ng	nanogramos (1ng=0.000 000 001 gramos)
nm	nanómetro (1nm=0.000 000 001 metros)
PBS	buffer salino de fosfatos
PCR	reacción en cadena de polimerasa
PCR-SQ	PCR semi-cuantitativo
PIPERES	piperazine-N,N'-bis(2.ácido etanosulfónico)
PKR	proteín-quinasa dependiente de RNA de doble cadena
Pro	prolina
PTGS	post-transcriptional gene silencing
RdRP	RNA polimerasa-RNA dependiente
RNA	ácido ribonucleico
RNA-AS	RNA antisentido
RNAi	RNA de interferencia
RNApolIII	RNA polimerasa III
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa
SDS	sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
FBS	suero fetal bovino
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interference RNA
snRNA	small nuclear RNA
T	timina
TAE	buffer Tris-ácido acético-EDTA
TE	buffer Tris-EDTA
TET	tetraciclina
TetO	secuencia operadora <i>tet</i>
TetR	proteína de represión <i>tet</i>
u	unidades
U	uracilo
UTR	región <u>no</u> traducible
UV	ultra violeta
v/v	relación volumen/volumen
wt	wild type (tipo silvestre)
x	n veces concentrado

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino da muerte a una gran cantidad de mujeres a nivel mundial sin mencionar que en México ocupa el primer lugar de muerte por cáncer. La aparición del cáncer cervical ha sido asociada, en 99% de los casos, con la infección previa del virus de papiloma humano (HPV) en especial los serotipos 16 y 18. La actividad carcinógena del HPV se debe, principalmente, a la integración de DNA viral en el genoma de la célula hospedera y la expresión constitutiva de los genes *E6* y *E7*, cuyos productos peptídicos interfieren con las proteínas endógenas P53 y Rb que son vitales en la vía de supresión de tumores. Se ha demostrado que la expresión continua de las onco-proteínas *E6* y *E7* es necesaria para la conservación del estado maligno de las células transformadas y que la represión de alguna de ellas puede inducir arresto en el crecimiento o apoptosis en las células carcinógenas. Se ha encontrado, además, que la vía de *Mdm2*, que es el represor natural de *p53*, se encuentra aparentemente funcional pero al mismo tiempo sustituida por *E6*. Es posible que al reprimir la expresión de *E6*, la vía de *Mdm2* vuelva a estar funcional, más no ha sido reportado hasta el momento. Se ha logrado reprimir de manera eficiente y por diversos métodos la expresión de la proteína *E6* más nunca se ha comprobado que efecto pudiera tener esta supresión sobre la expresión del gen *mdm2*. Se han desarrollado diferentes estrategias para la supresión de genes, entre las cuales se encuentra integrada, de manera relativamente reciente, el uso del RNA de interferencia (RNAi). El efecto del RNAi consiste en el silenciamiento de genes mediante la degradación específica del RNA mensajero correspondiente a la proteína que se desea suprimir, tal efecto de silenciamiento puede alcanzar hasta un 85% de efectividad y es conocido como *knock-down*. Tal eficiencia y especificidad de la vía de silenciamiento post-transcripcional lo vuelve una estrategia importante en la búsqueda de los efectos que pudieran presentarse en la expresión de un gen al silenciar otro que pudiera estar relacionado. En este trabajo se silenciaron los mRNA de *E6* y *E7* (HPV-16) por medio de RNAi y se analizó, por medio de PCR semi-cuantitativo, el efecto que el silenciamiento de alguno de estos oncogenes tiene sobre la expresión de *mdm2* encontrando que la modificación en la expresión de *E6* y *E7* no tiene efecto alguno sobre *mdm2*, sin embargo, al inhibir la expresión de *mdm2* el patrón de expresión de *E6* y *E7* se ve modificado en forma negativa mientras que la expresión de *p53* se ve alterada en forma positiva.

ABSTRACT

Cervical cancer is currently one of major causes of death amongst women world wide, and in Mexico is the main cause of death by cancer. The incidence of cervical cancer has been greatly associated, in as much as 99% of the cases, with the previous infection of human papilloma viruses, particularly the serotypes 16 and 18. The carcinogenic potential of HPV infections is mainly due to the integration of the viral DNA into the genomic material of the host cell and the subsequent constitutive expression of the *E6* and *E7* genes, which have the ability of repressing tumor suppressing proteins such as P53 and Rb. It has been proved that the continuous expression of these oncoproteins is essential for the conservation of the malignant state of the transformed cells and that the repression of either, can and will induce growth arrest or apoptosis or both. Moreover, it is important to notice that though Mdm2, P53 natural repressor, is apparently functional, it is at the same time, completely replaced by E6. It is possible that in repressing E6, Mdm2 will quickly resume its normal functions, but it has not been reported so far. Efficient repression of E6 has been previously achieved by different methods but, so far, it has not been reported what effect it could have over the expression of *mdm2*. Different strategies for gene suppressing have been developed over time, amongst which is the use of the relatively new RNA interference. RNAi, known also as post-transcriptional gene silencing, promotes the specific degradation of the target mRNA and such silencing can reach an 85% of effectiveness, therefore, is known as gene *knock-down*. This kind of efficient and specific effect makes of the RNAi a tempting strategy in searching for the effects that silencing one gene could have over the expression of another associated gene. In the present work the mRNA's of *E6* and *E7* (HPV-16) were silenced using RNAi and the results were analyzed by semi-quantitative PCR to determine if the silencing of either oncogene has any effect over the expression pattern of *mdm2*. It was found that the inhibition of the expression of *E6* and *E7* has no modifying effect in the expression of *mdm2*, however, in silencing *mdm2* the expression pattern of *E6* and *E7* is negatively modified whereas the expression of *p53* is positively modified.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad o desorden caracterizado por la división no controlada de células y la habilidad de estas células para invadir otros tejidos ya sea por crecimiento directo en tejidos adyacentes o por implantación en sitios distantes por metástasis. La metástasis es definida como la etapa en la cual las células de cáncer son transportadas a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático y son dispersadas en sitios diferentes del cual se originaron.

Todas las personas pueden verse afectadas por cáncer en cualquier periodo de su vida, pero el riesgo tiende a incrementarse conforme aumenta la edad debido al hecho de que el daño al material genético se vuelve más aparente.

Existen muchos tipos de cáncer. La severidad de los síntomas depende del sitio y carácter de la neoplasia y de si existe, ó no, metástasis. Un diagnóstico definitivo usualmente requiere un examen histológico realizado por un patólogo, donde el tejido es obtenido por medio de una biopsia. La mayoría de los casos de cáncer pueden ser tratados y algunos curados, dependiendo en el tipo específico, su localización y etapa. Una vez diagnosticado, el cáncer es comúnmente tratado con una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia.

Conforme se realizan avances en la investigación contra el cáncer, los tratamientos se vuelven cada vez más específicos para el tipo de patología neoplásica. Las drogas que tienen como objetivo tipos de cáncer en particular ya existen para diferentes neoplasias. El cáncer eventualmente provoca la muerte si no es tratado, aunque este no es siempre el caso.

El crecimiento no regulado que caracteriza al cáncer es provocado por daños al material genético resultando en la mutación de genes que codifican proteínas que controlan el crecimiento celular. Varios eventos de mutación pueden ser requeridos para transformar una célula normal en una maligna. Estas mutaciones pueden ser causadas por agentes químicos ó físicos llamados carcinógenos, por ejemplo, la exposición a materiales

radioactivos ó ciertos virus que pueden insertar su material genético dentro del DNA de la célula hospedera. Las mutaciones ocurren de manera espontánea o son pasadas de generación en generación como resultado de una mutación en la línea germinal.

Empero, muchas formas de cáncer están asociadas con la exposición a factores ambientales como son el humo de tabaco, radiación, alcohol y ciertos virus, algunos de estos pueden ser evitados, pero no existe manera eficiente de evadir la enfermedad.

Los tipos de cáncer son clasificados por el tipo de célula con el cual guardan alguna semejanza y por tanto, de la cual se presume proviene el tumor. Las siguientes categorías generales son las usualmente aceptadas:

1. Carcinoma: tumores malignos derivados de células epiteliales. Este grupo representa los tipos más comunes de cáncer, incluyendo cáncer de mama, próstata, pulmón y colon.
2. Linfoma y Leucemia: tumores malignos derivados de células sanguíneas y de médula ósea.
3. Sarcoma: Tumores malignos derivados de tejido conectivo o células mesenquimales.
4. Mesotelioma: Tumores derivados de las células mesoteliales que recubren el peritoneo y la pleura.
5. Glioma: Tumores derivados de las neuroglías, el tipo más común de célula cerebral.
6. Tumores de Células Germinales: Derivados de las células germinales, normalmente encontradas en los testículos y ovarios.
7. Coriocarcinoma: Tumores derivados de la placenta.

En el año 2007, la Organización Mundial de la Salud (WHO), estimó un total de 7.6 millones de muertes (12.5% del total) debidas al cáncer, con una estimación proyectada de 12 millones en el año 2030, ya que la incidencia de los casos de cáncer va claramente en aumento y puede volverse un problema aún más serio.

El cáncer de pulmón, colon, hígado y mama se encuentran entre los de mayor ocurrencia y cabe mencionar que el 80% de las muertes por cáncer se presentaron en países

pobres o en vías de desarrollo, de los cuales, México es parte. Entre los tipos de neoplasias, el cáncer cérvico-uterino es la causa número uno de muerte en las mujeres de México, seguido por el cáncer de mama.

El cáncer cervical se encuentra asociado, en 90% de los casos, con la infección del virus de papiloma humano (HPV), de los cuales, HPV-16 y 18 son causantes, en conjunto, del 70% de los casos. Se estima que 20 millones de personas sexualmente activas son infectadas con HPV cada año, de éstas, alrededor de 500,000 desarrollan neoplasias y ~200,000 mueren a causa de ello.

Estos datos estadísticos se ven repetidos de manera trágica a nivel mundial y lo que es más, un aumento en la tasa de mortalidad por cáncer se encuentra proyectado hacia el cercano futuro. Es por tal motivo que la investigación de los procesos cancerígenos, asociados con HPV, debe ocupar un lugar de máxima prioridad para el futuro desarrollo de métodos de terapia génica, diseñados y dirigidos, para contrarrestar el índice de mortalidad causado por el virus de papiloma humano.

HIPOTESIS

El silenciamiento de los oncogenes *E6* ó *E7* (HPV-16) por medio de RNA de interferencia puede ocasionar cambios en el patrón de la expresión de *mdm2* en una línea celular de cáncer cervical.

IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN

En este trabajo, se busca establecer el efecto de la inhibición de *E6* y *E7* en la expresión de *Mdm2*, con el propósito de establecer cómo se comporta la expresión de éstos genes entre sí en una línea celular de cáncer cervical infectada por el virus de papiloma humano tipo 16.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si la inhibición de *E6* ó *E7* (HPV-16) mediante RNA de interferencia provoca cambios en la expresión de *mdm2* en una línea celular de cáncer cervical.

Objetivos Específicos

1. Crear un Vector para la Expresión Inducible de shRNA.
2. Clonar las Secuencias de shRNA en el Vector Inducible *pSilencer_{tz}*.
3. Crear una Línea Celular de Cáncer Cervical que Exprese de Manera Estable la Proteína de Represión *TetR*.
4. Crear Líneas Celulares de Cáncer Cervical Establemente Transfектadas con los Vectores de Expresión de shRNA.
5. Determinar si Existe un Cambio en la Expresión de *mdm2* Provocado por la Inhibición de *E6* y *E7* en una Línea Celular de Cáncer Cervical.

ANTECEDENTES

Cáncer Cervical y el Virus de Papiloma Humano (HPV)

El cáncer es una de las enfermedades que afecta a la humanidad de una manera notable y uno de los tipos que ha cobrado más importancia últimamente es el cáncer cérvico-uterino ya que, a nivel mundial, da muerte a una gran cantidad de mujeres sin mencionar que en México ocupa el primer lugar de muerte por cáncer. La aparición del cáncer cervical ha sido asociada, en 90% de los casos, con la infección previa del virus de papiloma humano (HPV) y se estima que actualmente cerca de 20 millones de personas se encuentran infectadas con este virus. El HPV es una de las infecciones sexualmente transmisibles más comunes y se estima que un 80% de la población adulta sexualmente activa ha sido infectada con uno u otro serotipo durante el curso de su vida. La gran mayoría de la gente infectada no sufre de efectos adversos y nunca se entera de que ha sido infectada más puede infectar a otras personas. El sistema inmune, por lo regular, remueve el virus del cuerpo dentro del lapso de un año, después del cual la persona será inmune a ese serotipo del virus en particular (Münger, 2002; Greenblatt *et al.*, 2005; Sinal, 2005). Se han identificado más de 200 serotipos de HPV pero solo 23 de estos infectan el cérvix y de estos solo 13 están asociados con cáncer y son considerados de “alto riesgo”.

La mayoría de las infecciones de HPV no progresan hasta la aparición de cáncer ya que el proceso de transformación de células cervicales a células cancerosas es lento. De manera común, los casos de cáncer se presentan en personas que han estado infectadas por un largo periodo de tiempo, usualmente, más de una década (Münger, 2002; Greenblatt *et al.*, 2005; Sinal, 2005).

El virus de Papiloma Humano es no-envuelto y su cápside es de forma icosaédrica de 55nm de diámetro. El genoma del HPV es de DNA de doble cadena circular con un tamaño

aproximado de 8Kbp y contiene ocho marcos de lectura que codifican para diez proteínas, (Münger, 2002; Greenblatt *et al.*, 2005; Sinal, 2005); figura 1.

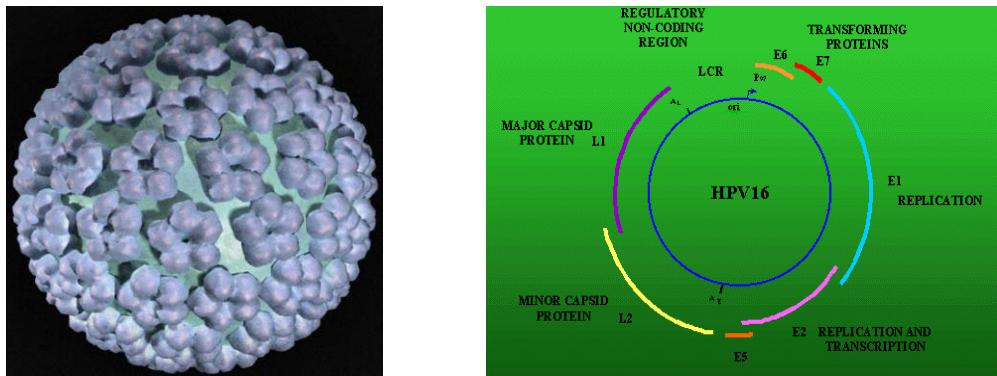


Figura 1. Virus de Papiloma Humano

En general, los Virus de Papiloma Humano de tipo 16 y 18 en su conjunto, son responsables de más del 70% de los casos de cáncer cervical, siendo el tipo 16 el causante de un 41 a 54% de los casos de cáncer (Noel *et al.*, 2001; Baseman, 2005). La actividad carcinogénica del HPV se debe, principalmente, a la integración de DNA viral en el genoma de la célula hospedera y por la expresión constitutiva de los genes *E6* y *E7*, cuyos productos peptídicos interfieren con las proteínas endógenas P53 y Rb que son vitales en la vía de supresión de tumores.

Características Generales de E6 y E7 (HPV)

Se ha encontrado que existen proteínas virales que son capaces de unirse a la proteína P53 y volverla no funcional o degradarla. Tal es el caso de la proteína E6 del virus de Papiloma Humano. Los virus de papiloma humano (HPV), que infectan el tracto genital, están asociados con el cáncer de tracto ano-genital humano, en particular el cáncer cervical (revisado en World Health Organization, 1995). Se sabe que los HPV son los agentes causantes primarios de más del 90% de los casos de cáncer cervical (Bosch *et al.*, 1995), siendo HPV tipo 16 el más frecuentemente encontrado en estos tumores. Aproximadamente 500,000 mujeres desarrollan cáncer cervical cada año y 200,000 mueren por ello, haciendo de esta enfermedad la segunda causa más común de muerte de mujeres por cáncer en todo

el mundo (Pisani *et al.*, 1993). Sin embargo, el cáncer se desarrolla de manera poco frecuente aún después de la infección por estos tipos de HPV, y comúnmente pasan de años hasta décadas después de la infección inicial hasta la aparición del cáncer.

Dos genes de HPV, *E6* y *E7*, son expresados en los carcinomas cervicales y en las líneas celulares derivadas del carcinoma (Goodwin, 2000). Estos genes son, básicamente, los responsables de la transformación cancerígena de las células infectadas, el mecanismo por el cual lo realizan se esquematiza brevemente en la figura 2.

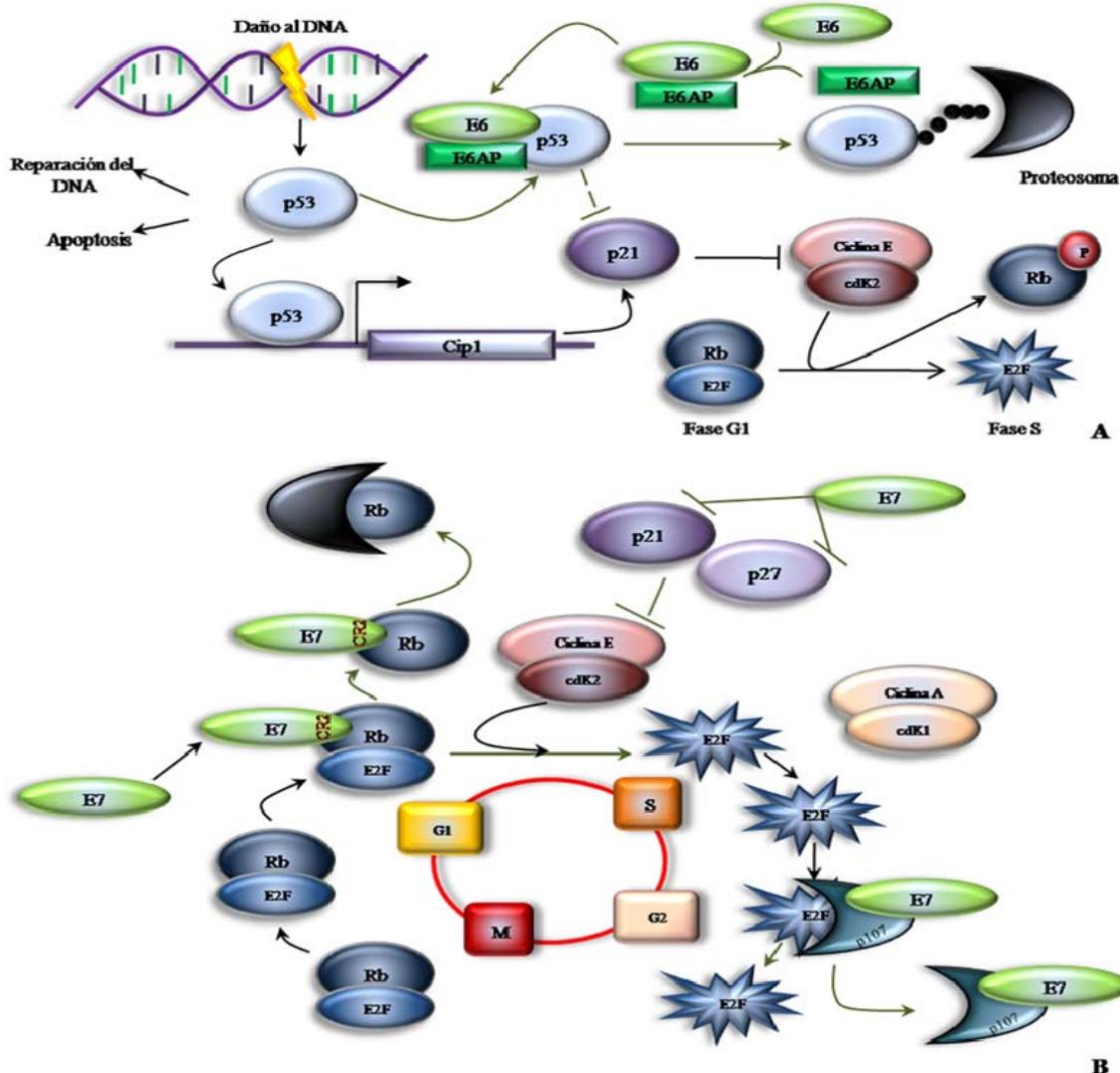


Figura 2. Esquema de los mecanismos de E6 (A) y E7 (B).

E6 posee una secuencia de ~550bp y codifica una proteína de 158aa con un peso molecular de ~19KDa, esta proteína, en conjunto con la proteína asociada a E6 (E6AP), se une a P53 y lo lleva a su rápida degradación mediada por ubiquitina, deshabilitando así las funciones de arresto celular y apoptosis de las cuales *p53* es responsable (Figura 3).

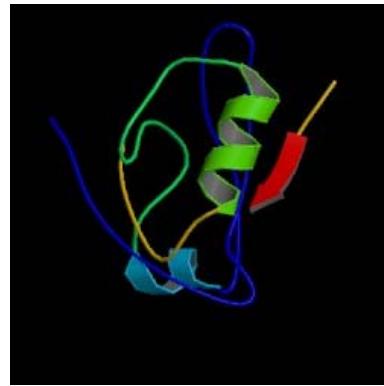


Figura 3. Proteína E6 del Virus de Papiloma Humano

Por otro lado, *E7* tiene una secuencia de ~300bp y codifica un polipéptido de 98aa con un peso aproximado de 11KDa, *E7* se une a los miembros hipofosforilados de la familia de retinoblastoma resultando en su desestabilización y la disruptión de los complejos Rb/E2F (Berezutskaya *et al.*, 1997; Dyson *et al.*, 1989; Smith-McCune *et al.*, 1999) facilitando y promoviendo la entrada en la fase replicativa de la célula infectada (Figura 4).

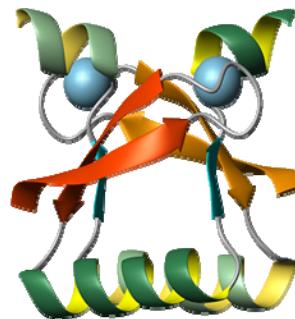


Figura 4. Proteína E7 del Virus de Papiloma Humano

Por lo tanto, la expresión de las proteínas *E6* y *E7* puede facilitar la adquisición de cambios genéticos adicionales que conducen a la progresión carcinogénica (Goodwin, 2000). La correlación de la infección con HPV y la mutación de *p53* ha sido muy estudiada en el cáncer cervical, y a causa de que la proteína *E6* inactiva a *P53*, parecería que las mutaciones de *p53* estarían confinadas a los casos de HPV negativos. Esto, con unas pocas

excepciones, resulta ser cierto (Park *et al.*, 1994), pues incluso una variante de *p53wt* (Arg72) es más susceptible a ser degradado por E6 que su contraparte *p53wt* (Pro72) (Zehbe *et al.*, 2001). Además de su interacción con P53, se acumula evidencia de que E6 posee actividades transformantes y reguladoras de crecimiento independientes de su interacción con P53 (Kubbutat, 1998; Rapp, 1998).

Aún con la expresión de *E6*, actividad residual de *p53* de tipo silvestre ha sido reportada, sugiriendo que la cantidad de expresión de *E6* es proporcional a la inhibición de la actividad de P53 (Butz *et al.*, 1999). Por lo menos en algunas líneas celulares de cáncer cervical, la expresión continua de *E6* y *E7* parece ser requerida para el mantenimiento del estado maligno (von Knebel-Doeberitz *et al.*, 1992). Por lo tanto, inclinar la balanza a favor de *p53* podría restablecer la función supresora de tumores de P53 en células de cáncer cervical (Hietanen *et al.*, 2000).

En resumen, las funciones supresoras de tumores de P53 y Rb son abrogadas en las células de cáncer cervical por las proteínas E6 y E7. Se han propuesto varias estrategias para controlar el crecimiento de las células cancerígenas que expresan *E6* y *E7*, entre éstas se incluyen (a) el uso del gen *E2* de papilomavirus bovino para reprimir la expresión de *E6* y *E7* (HPV-16) (Dowhanick *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1996), (b) estrategias de anti-sentidos para *E6* y *E7* (HPV-16) (Beer-Romero *et al.*, 1997; Greenstone *et al.*, 1998; Traidej *et al.*, 2000), (c) el uso de formas variantes de *E6* (HPV-16) que interactúan con la proteína E6 (HPV-16) completa y con P53, resultando en la supresión de la degradación de P53 mediada por E6 (HPV-16) (Pim *et al.*, 1997), (d) el tratamiento con drogas como Leptomicina B y Actinomicina D que activa la respuesta *p53* por inhibición de E6 (HPV-16) y daño al DNA (Hietanen *et al.*, 2000) y recientemente se han realizado ensayos de supresión de alguno de los oncogenes (*E6* o *E7*) por medio de RNAi (Hall, 2003).

Características Generales de P53

En el desarrollo del estudio de las enfermedades de cáncer, el aspecto genetista creció junto a la ciencia de la biología molecular y el interés en particular sobre el estudio del gen *p53* ha cobrado gran importancia desde el descubrimiento de que éste es el gen que se

encuentra mutado con más frecuencia durante el desarrollo de tumores cancerígenos (Greenblatt *et al.*, 1994).

P53 es codificado por el gen *TP53* que se encuentra en el *locus* 17p13.1 y su secuencia codificante mide 2.64Kbp que se traduce en un polipéptido de 393aa (Figura 5) con un peso aparente de 53KDa (de ahí su nombre) y un peso real de 43.7KDa, esta diferencia está dada por su alto contenido de residuos de prolina, que provocan su migración retardada en SDS-PAGE.

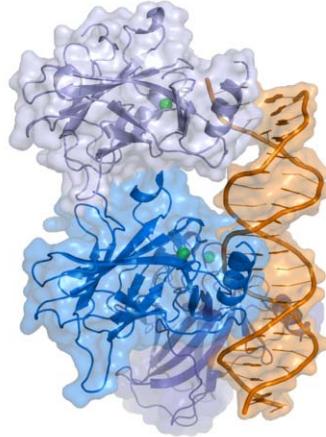


Figura 5. Proteína Supresora de Tumores P53.

La frecuencia de mutaciones que ocurren en *p53* aunado a la variedad de tumores, que incluyen los carcinomas de mama y de cérvix, que se generan como resultado de la inactivación de *p53*, señala la importancia que este gen tiene como un agente supresor de la formación de tumores. Una de las evidencias contundentes de que el gen *p53* actúa como un gen supresor de tumores se deriva del hecho de que ratones a los cuales se les ha inactivado el gen *p53* mediante recombinación homóloga desarrollan diversos tipos de tumores (Donehower *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1994). Aún no se ha descifrado completamente el mecanismo mediante el cual *p53* funciona como un agente supresor de tumores, sin embargo se sabe que su función como factor de transcripción es importante en esta vía (Raycroft *et al.*, 1990; Fields, 1990). Como ejemplo, al ocurrir un daño en el material genético, la proteína P53 se estabiliza dando como resultado un incremento en la concentración de la misma y como consecuencia ocasiona los procesos de arresto celular en la fase G1 del ciclo celular (prolonga la fase G1 dando oportunidad a que las mutaciones se reparen antes de entrar a la fase de síntesis de DNA) u ocasionando una muerte celular

programada (apoptosis) (Finlay *et al.*, 1989; Lowe *et al.*, 1993). Durante la activación de P53 se induce la expresión de *mdm2*, que es su regulador natural, y otros genes como *p21*, *bax*, y *gadd45* (Barak *et al.*, 1993; Kastan *et al.*, 1992; Miyashita, 1995; el-Dairy *et al.*, 1993). El gen *p21* está involucrado en el proceso de arresto celular en la fase G1 del ciclo celular, ésto es logrado gracias a su actividad reguladora de diversas Quinasas Dependientes de Ciclinas (CDK) (Harper *et al.*, 1993) y también a su afinidad con la molécula PCNA que es una de las subunidades de la DNA Polimerasa δ y por tanto inhibe directamente la replicación del DNA sin afectar los procesos de reparación del mismo (Chen *et al.*, 1995, y Luo *et al.*, 1995); por otro lado, Bax está relacionado con la proteína Bid que ocasiona la liberación de Citocromo C que a su vez, activará la vía de caspasas provocando apoptosis (LeBlanc *et al.*, 2002). Un esquema general de la actividad de P53 puede apreciarse en la figura 6.

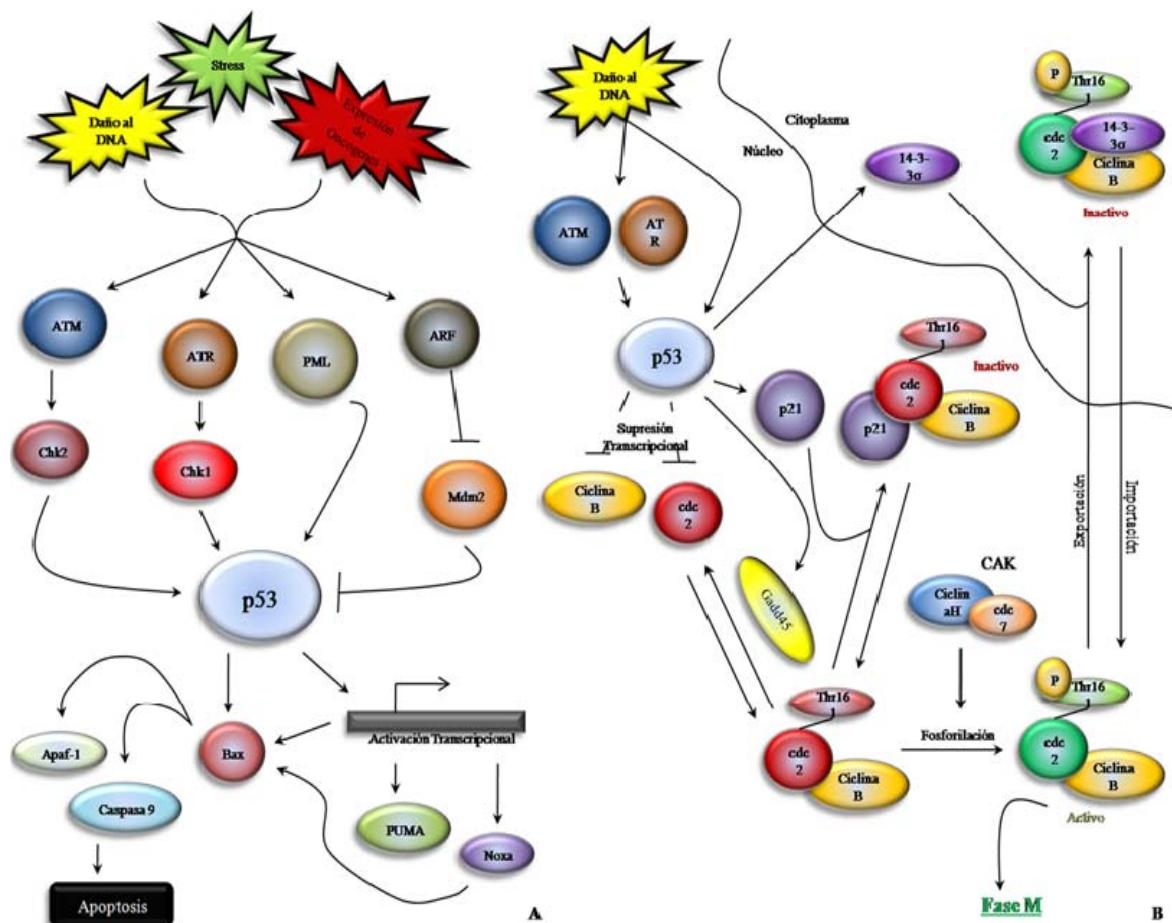


Figura 6. Mecanismos de acción de P53. (A) Apoptosis. (B) Arresto celular.

Características Generales de Rb

pRB es un polipéptido de 928aa con un peso de ~106KDa, se encuentra codificada por el gen *RB1* que se encuentra en el *locus* 13q14.1-14.2 y que produce un mRNA de 4772bp (Figura 7).

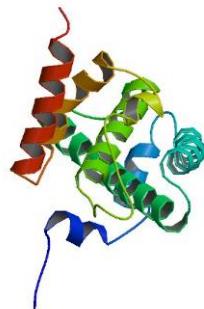


Figura 7. Proteína Supresora de Tumores pRb.

La proteína Retinoblastoma es un importante supresor de tumores ya que la presencia de mutaciones que interfieren con su función provocan la aparición de diferentes tipos de cáncer (Korenjak, 2005). La función normal de Rb es la de prevenir que la célula se divida o progrese a través del ciclo celular. Por tanto, cuando Rb es ineficiente en su papel, las células mutadas pueden continuar dividiéndose y posiblemente volverse cancerosas.

pRb previene que la célula replique el DNA dañado evitando que entre en la fase de síntesis (Fase S) o que progrese a través de la fase G1 del ciclo celular (Das *et al.*, 2005). pRb se une e inhibe un factor de transcripción llamada E2F-DP, el cual es necesario para promover a la célula a la Fase S (Funk *et al.*, 1997; De Veylder *et al.*, 2003; de Jager *et al.*, 2005; Greenblatt, 2005; Sinal, 2005). En tanto E2F-DP se encuentre inactivado, la célula permanece atrapada en la Fase G1. El complejo pRb-E2F/DP también atrae a la histona desacetilasa a la cromatina aumentando así la supresión de la síntesis del DNA.

Cuando es tiempo de que la célula entre en la Fase S, los complejos de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), y otras ciclinas diferentes, fosforilan a pRB, inhibiendo así su actividad (Münger, 2002; Bartkova *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2005; Korenjak, 2005). La fosforilación inicial es realizada por la ciclina D/CDK4,6 y posteriormente por la ciclina E/CDK2. pRb permanece fosforilada a través de las Fases S, G2 y M del ciclo celular (Münger, 2002).

La inhibición de pRb permite que E2F-DP se disocie del complejo y se vuelva activo (Münger, 2002; De Veylder *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2005). Cuando E2F es liberado activa factores como las ciclinas A y E, que promueven la entrada al ciclo de replicación celular activando a las CDK y a una molécula llamada antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) que apresura la replicación celular y la reparación aumentando la afinidad de la DNA polimerasa por el DNA (Funk *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2005; Greenblatt, 2005); figura 8.

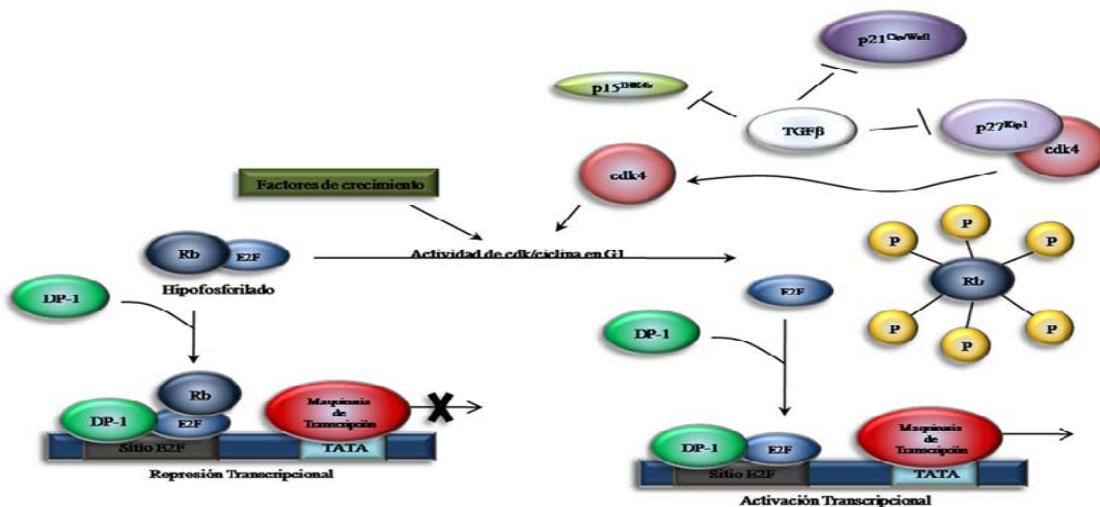


Figura 8. Mecanismo de acción de pRb.

Características Generales de Mdm2

El gen *mdm2* se encuentra localizado en el *locus* 12q13-14 que se transcribe en un mRNA de ~2.35Kbp que a su vez es traducido en un polipéptido de 497aa con un peso molecular aproximado de 56KDa (Figura 9).

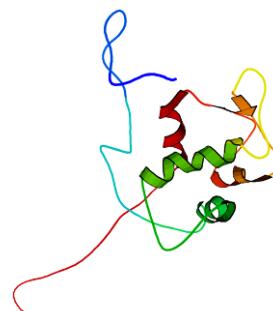


Figura 9. Mdm2

La proteína del gen *mdm2* tiene la habilidad de unirse a la región amino terminal de la proteína del gen *TP53* e inhibir sus funciones, de aquí que Mdm2 sea considerado un regulador negativo de P53 (Momand *et al.*, 1992). De hecho, la sobre-expresión de Mdm2 en células en cultivo traen como consecuencia la inhibición de tales propiedades de P53 como: Transcripción, arresto celular en G1 y apoptosis (Finlay *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996; Haupt *et al.*, 1996). Puesto que Mdm2 inhibe las funciones de P53 es lógico pensar que *mdm2* se pueda comportar como un oncogén mediante la inactivación de una proteína supresora de tumores como lo es P53. De hecho, la sobre-expresión de *mdm2* en células NIH-3T3 las vuelve tumorogénicas (Fakharzadeh *et al.*, 1991) y en combinación con el gen *ras* puede transformar fibroblastos de embriones de rata (Finlay *et al.*, 1993). En el humano se ha encontrado que el gen *mdm2* está amplificado en su expresión en un 30 a 40% de los casos de sarcoma y en baja cantidad en carcinomas de mama (Oliner *et al.*, 1992; Sheikh *et al.*, 1996). En la mayoría de estos tumores que sobre-expresan *mdm2*, *TP53* no está mutado, es decir, apoya la evidencia de que Mdm2 actúa como un oncogén al unirse e inactivar a P53. Sin embargo, Mdm2 podría tener otras funciones in vivo ya que posee un dominio de unión al DNA (tipo RING) el cual no es necesario para su unión a P53.

Con el propósito de demostrar que Mdm2 es un regulador negativo de P53 y de obtener evidencias de otra posible función del gen *mdm2*, se decidió inactivar el gen al introducir una delección (*knock-out*) mediante recombinación homóloga en células embrionarias. De esta manera se desarrolló un ratón carente de *mdm2* (Montes de Oca-Luna *et al.*, 1995). En este estudio se encontró que los ratones *knock-out* heterocigotos del gen *mdm2* eran normales en contraste con los homocigotos en los cuales, la falta de *mdm2*, ocasionó la muerte de los embriones entre los 3 y 6 días de desarrollo.

Puesto que los estudios *in Vitro* indicaban que Mdm2 pudiera ser un regulador negativo de P53, se planteó la hipótesis de que los embriones *knock-out* de *mdm2* (homocigotos para la mutación) morían por efecto de la falta de la regulación negativa de P53. En este sistema al no estar presente Mdm2, P53 podría estar activo ocasionando los procesos de arresto celular o apoptosis, y por consecuencia P53 sería el responsable de la muerte embrionaria a través de uno de estos procesos. Esta hipótesis se demostró cruzando ratones carentes de ambos genes: *mdm2* y *TP53*. Los resultados fueron contrastantes, mientras que los ratones

mdm2 knock-out morían durante el desarrollo embrionario, los ratones *knock-out* de *mdm2* y *TP53* nacieron vivos, fenotípicamente normales y fértiles (Montes de Oca-Luna *et al.*, 1995).

Por otro lado, también se obtuvieron resultados preliminares que indican que el gen *bax*, el cual es también un gen blanco de P53, revierte parcialmente el fenotipo de los ratones *mdm2 knock-out*, es decir, que *bax* es parte de la vía de apoptosis, pero que debe de existir otro gen que en conjunto inducen la muerte del embrión por apoptosis. El hecho de que la carencia de *mdm2* ocasiona la muerte embrionaria, la cual es dependiente de P53, indica que ambos genes se expresan desde una fase muy temprana el desarrollo embrionario.

Una posible explicación de su expresión a este nivel embrionario es que la combinación P53-Mdm2 forma parte de un sistema global de protección contra daños al DNA (mutaciones) para preservar la integridad del genoma a nivel celular, individual y de especie. Esta hipótesis es en base al siguiente razonamiento: si una célula sufre una mutación en una fase muy temprana del desarrollo embrionario (como lo sería en la fase de blastocisto cuando las células aún no se han diferenciado) todas las células que se generaría a partir de ella tendrán la mutación y es muy probable que se presente en un gran número de tejidos; esto implica que las células germinales podrían haber heredado dicha mutación y por lo tanto de que se pueda transmitir a la descendencia y finalmente de fijarse en la población. Aquí radica la importancia del sistema P53-Mdm2 el cual responde a estos daños en el genoma ocasionando ya sea un arresto en la fase G1 del ciclo celular dando tiempo a que la mutación se repare o que ocurra apoptosis.

Se ha pensado que la inhibición de la expresión de *mdm2* y la sobre-expresión de *TP53wt* podría, en gran parte, revertir el proceso de transformación y/o provocar la eliminación de las células cancerosas.

Se han implementado varios acercamientos a esto, pero uno de particular interés por su éxito fue logrado por Chao y colaboradores en 1998 quienes sintetizaron y transfecaron *mdm2* anti-sentido además de *TP53wt* a células cancerosas logrando que una gran parte de estas sufrieran de apoptosis acelerada.

En la figura 10 se muestra un esquema general de las actividades de Mdm2.

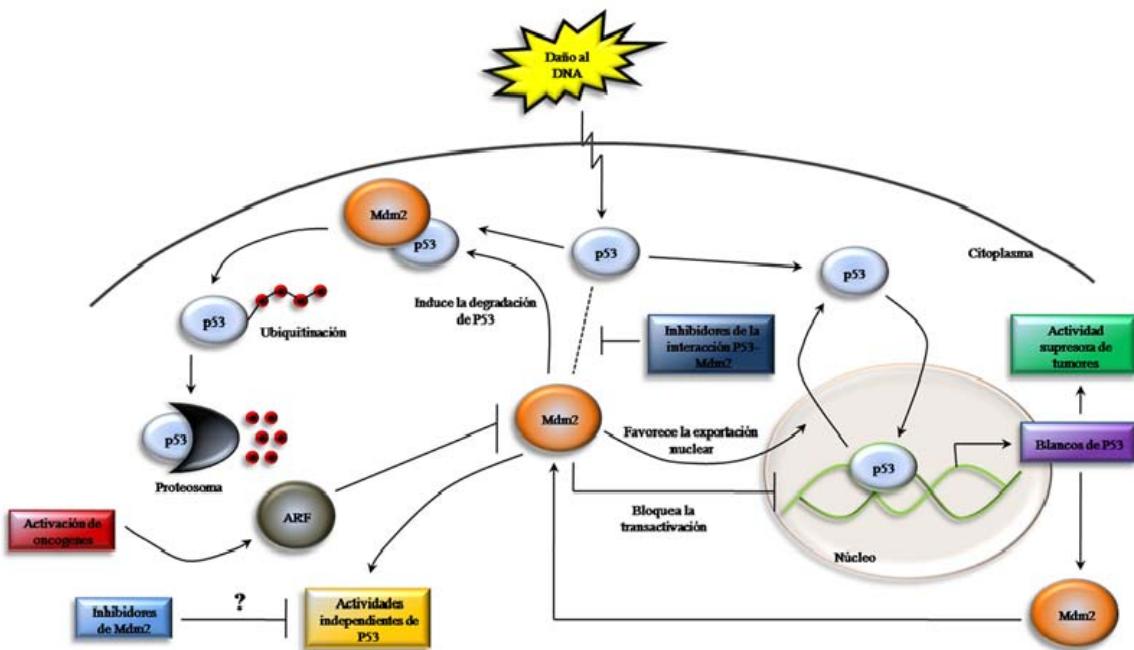


Figura 10. Actividades de Mdm2

Generalidades del RNA de Interferencia (RNAi)

El fenómeno de silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS) mediado por RNAi fue descrito por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en el cual la introducción de RNA de doble cadena (dsRNA) resulta en la efectiva y específica inactivación del gen correspondiente a través de la degradación del mRNA endógeno (Fire *et al.*, 1998; Bass, 2000). Esta técnica genera rápidamente la pérdida de función gen-específica o de fenotipos hipomórficos y la potencia de la interferencia es heredada a la descendencia (*C. elegans*) (Kamath *et al.*, 2001).

El descubrimiento de este fenómeno vino de experimentos con RNA antisentido, donde se observó que los RNA's sentido y antisentido eran efectivos para producir fenocopias de mutaciones de pérdida de función genética (Fire *et al.*, 1998; Montgomery and Fire, 1998; Guo, 1995).

El mecanismo por el cual el dsRNA evita la expresión del gen objetivo aún no está completamente definido. Estudios recientes sugieren que sondas de dsRNA derivadas de secuencias que están presentes en la unidad de transcripción primaria pero no de aquellas

en el promotor o regiones intergénicas, pueden interferir con la expresión del gen objetivo (Fire *et al.*, 1998). Solo unas pocas copias del dsRNA por célula son necesarias para eliminar la producción de proteínas ya que el mecanismo es de naturaleza catalítica y no funciona titulando el mRNA endógeno como fue propuesto para las técnicas tradicionales de RNA antisentido. El gen objetivo no parece estar mutado, ni la transcripción del gen cesa en la presencia del dsRNA, sin embargo el mRNA objetivo del RNAi está ausente en el citoplasma y reducido en el núcleo. Estos resultados indican que el dsRNA ejerce su efecto durante o posterior al proceso del RNA, pero antes de la traducción a proteína (Montgomery and Fire, 1998; Montgomery *et al.*, 1998).

El silenciamiento de genes endógenos mediado por la introducción de RNA de doble cadena (dsRNA) ha sido demostrado en muchos organismos, incluyendo gusanos, moscas y mamíferos (Bass, 2000; Fire, 1999). Para desencadenar RNAi, el dsRNA debe ser proveído exógenamente (Fire *et al.*, 1998) o transcripto de transgenes que cargan una secuencia antisentido interna (Tavernarakis *et al.*, 2000).

Cuando el dsRNA no es directamente producido por un transgén con una repetida invertida interna o suplementada exógenamente, la transcripción no intencional de RNA anti-sentido de un promotor vecino o leído a través de transgenes adyacentes arregladas como repetidas (Fire *et al.*, 1998) podría explicar la producción de dsRNA. Además, la síntesis de RNA complementario (cRNA) por una enzima llamada RNA polimerasa-RNA dependiente (RdRP) (Kooter *et al.*, 1999) podría también participar en la producción de dsRNA.

RdRP podría participar también, no solo en la síntesis de cRNA sino que también en la amplificación de la señal de dsRNA, permitiendo que el silenciamiento se disperse por todo el organismo en *C. elegans* (Fire, 1999). El cómo el dsRNA conlleva a la degradación de su RNA homólogo permanece incierto. Se ha propuesto que el dsRNA es objetivo de una dsRNA endonucleasa llamada Dicer que genera pequeñas piezas de dsRNA, de 21 a 25 nucleótidos de longitud (Bass, 2000). Dicer, en conjunto con otra proteína llamada R2D2 se asocian a los extremos 5' de cada cadena y solo aquella que posea la menor estabilidad termodinámica es montada en el complejo de silenciamiento (RISC) (Tomari *et al.*, 2004). Entonces, el alineamiento de estos fragmentos de dsRNA con el mRNA, seguido por un intercambio de cadenas, generaría nuevos substratos que son fracturados en los mismos

sitos por la proteína Argonauta (Fagard *et al.*, 2000; Tomari *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004) produciendo, así, un efectivo silenciamiento del gen objetivo (Figura 11).

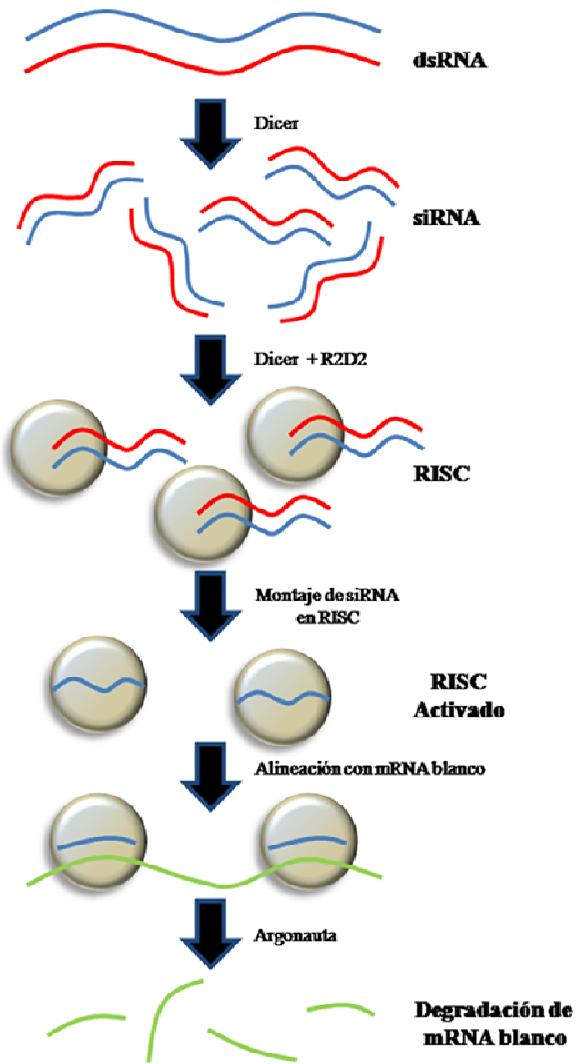


Figura 11. RNA de interferencia (RNAi)

Se ha encontrado que, mientras que en *C. elegans* y *D. melanogaster* los dsRNA pueden ser de longitud considerable, en las células de mamíferos, sin embargo, el tamaño de estos RNA de doble cadena está restringido a menos de 30bp (Elbashir *et al.*, 2001), ya que si la longitud de estos dsRNA es mayor, se desencadena una respuesta citotóxica dentro de la célula mediada por la proteína PKR, que inhibe la síntesis de proteínas y activa las

vías de apoptosis de la célula, se piensa que esta respuesta PKR es una medida antiviral (revisado en Gil, 2000).

El proceso de RNAi ha cobrado gran importancia en los últimos años, por ejemplo, el premio Nobel fue recientemente otorgado a los Doctores Craig Mello y Andrew Fire por haber descrito este proceso por primera vez.

Nuevas e importantes innovaciones se han realizado con el fin de mejorar los efectos de RNAi en un sistema dado, ejemplo de esto es la reciente aportación de Diederichs *et al.*, 2008, en la cual la co-expresión exógena de Argonauta 2 con RNAi aumenta en gran manera el índice de silenciamiento en comparación con solo el RNAi.

El futuro del RNAi como herramienta para la investigación en la expresión de diversos genes o como terapia génica es bastante prometedor.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Escherichia coli, DH5 α [F-, φ 80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1]

SiHa, línea celular adherente con morfología epitelial. Tumor: Carcinoma de célula escamosa, nivel de bio-seguridad 2, obtenida a partir de una biopsia de un sujeto femenino de etnia asiática con 55 años de edad. Posee integrado el genoma de Virus de Papiloma Humano (HPV-16), 1 a 2 copias por célula.

PLÁSMIDOS

pSilencer 1.0 (AMBION)

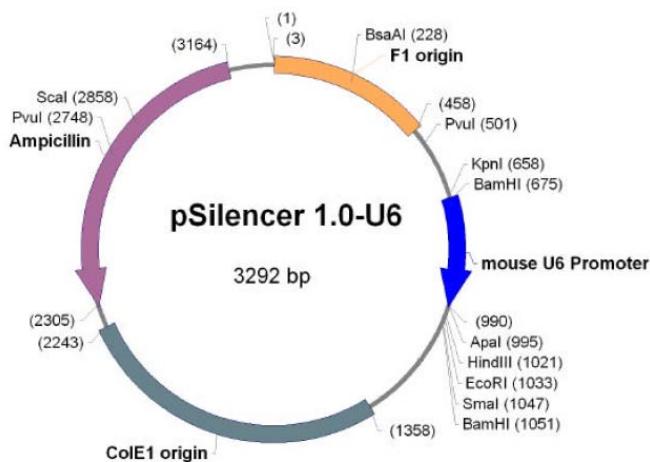


Figura 12

pcDNA6/TR (INVITROGEN)

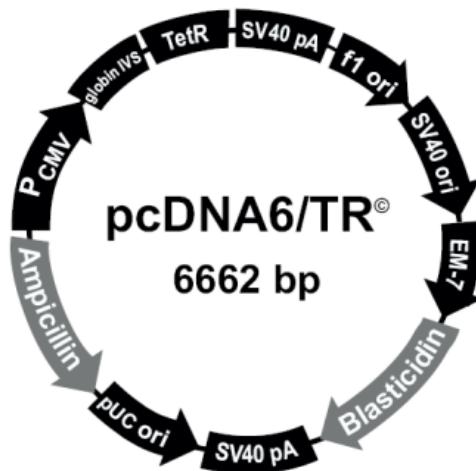


Figura 13

pcDNA4/TO/*LacZ* (INVITROGEN)



Figura 14

pEGFP-N3 (CLONETECH)

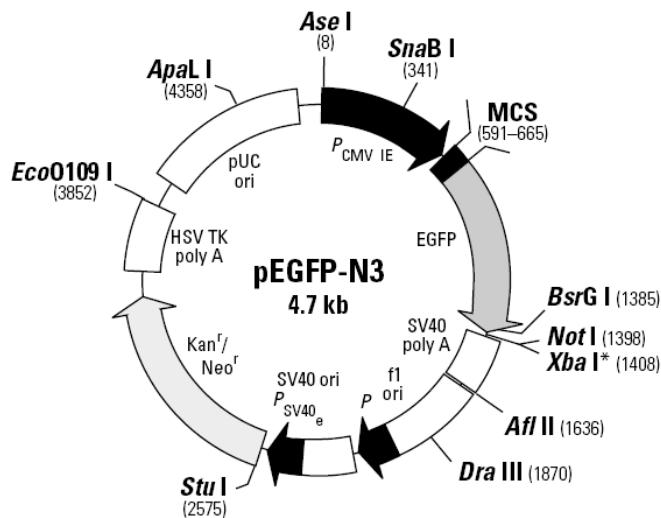


Figura 15

ENZIMAS

AMV RT polimerasa	PROMEGA, NEW ENGLAND BIOLABS
DNAse I	PROMEGA
RNAse	SIGMA
T4 DNA Ligasa	PROMEGA
<i>taq</i> polimerasa	PROMEGA, GENESCRIP
<i>ApaI</i> (5'-GGGCC C-3')	PROMEGA
<i>DdeI</i> (5'-C TNAG-3')	NEW ENGLAND BIOLABS
<i>EcoRV</i> (5'-GAT ATC-3')	PROMEGA, FERMENTAS
<i>KpnI</i> (5'-GGTAC C-3')	PROMEGA, FERMENTAS
<i>XmaI</i> (5'-C CCGGG-3')	PROMEGA

CULTIVO CELULAR

Cajas de cultivo, 60 mm.	CORNING
DMSO	SIGMA
Frascos de cultivo, 25 cm ² .	CORNING, NUNC

Lipofectamin 2000	INVITROGEN
PBS 1x pH 7.4	
Pipetas serológicas 10 y 5 ml	CORNING
Placas de 24 y 12 pozos	CORNING
Suero Fetal Bovino	GIBCO
TRIPSINA-EDTA 1x	GIBCO

MEDIOS DE CULTIVO

DMEM	GIBCO
Medio LB (Luria-Bertani) Agar	USBiological
Medio LB (Luria-Bertani) Caldo	USBiological

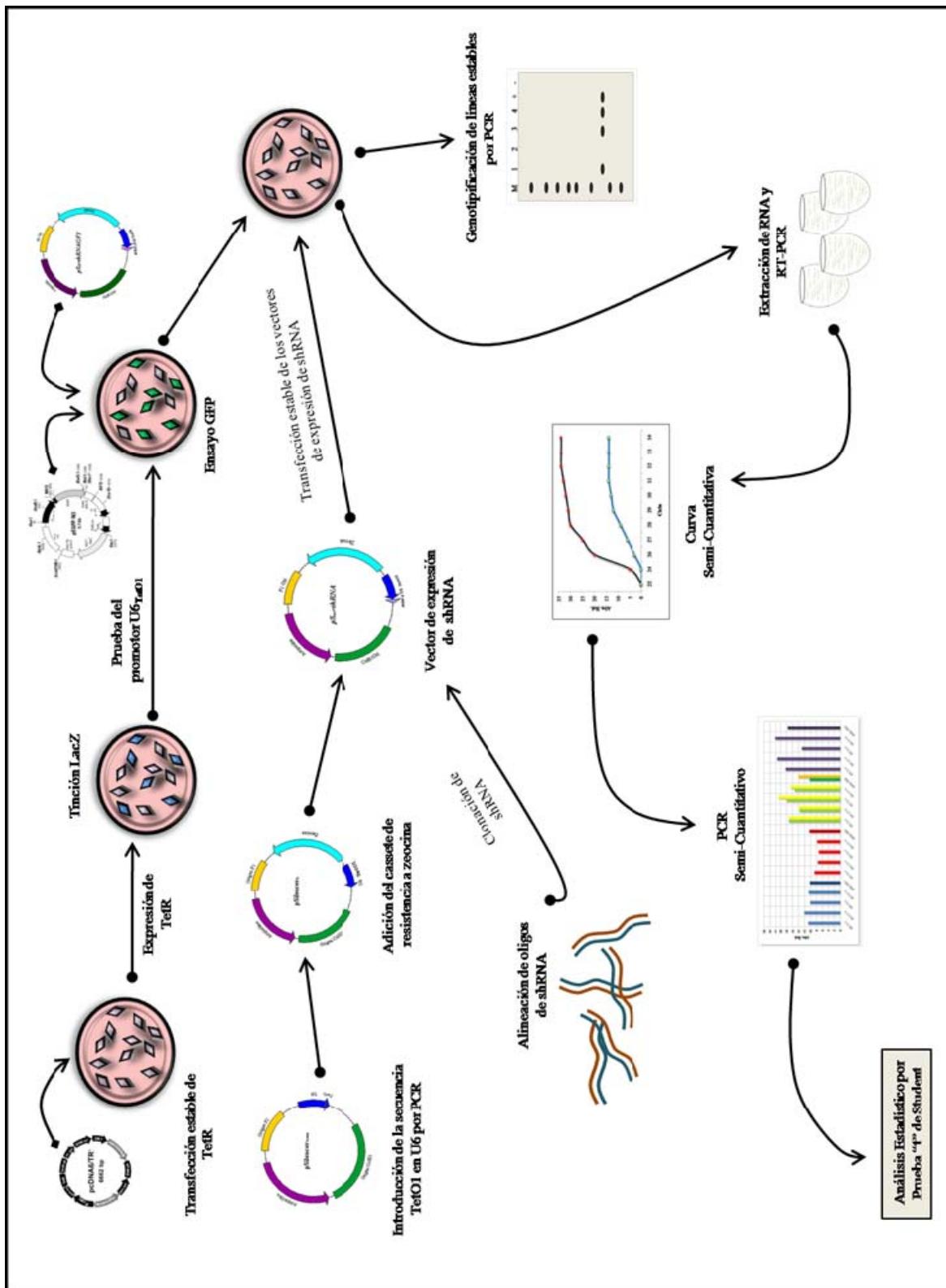
ANTIBIÓTICOS

Ampicilina, stock 100mg/ml	USBiological
Antibiótico-Antimicótico 100x	GIBCO
Blasticidina, stock 2 mg/ml	INVITROGEN
Tetraciclina, stock 10 mg/ml	USBiological
Zeocina, stock 100 mg/ml	INVITROGEN

EQUIPO

Autoclave, Balanza analítica, Cámara de electroforesis horizontal, Cámara fotográfica digital, Campana de flujo laminar, Centrífuga refrigerada, Espectrofotómetro, Fuente de poder, Hematocitómetro, Incubadora con agitación, Incubadora de CO₂, Microcentrífuga, Micropipetas, Microscopio de Fluorescencia, Microscopio invertido, Pipet Aid, Termociclador, Transiluminador de luz UV, Vortex.

DISEÑO EXPERIMENTAL



ACTIVIDADES A REALIZAR

1. Crear un Vector para la Expresión Inducible de shRNA.
 - 1.1. Elección de un Promotor para la Expresión de RNAi.
 - 1.2. Introducir la Secuencia Operadora TetO1 dentro del Promotor de RNAPolIII U6.
 - 1.3. Clonar un Cassette de Selección en el Vector *pSilencer-U6_{TetO1}*.
2. Clonar las Secuencias de shRNA en el Vector Inducible *pSilencer_{tz}*.
 - 2.1. Alinear y Clonar las Secuencias de shRNA en *pSilencer_{tz}*.
3. Crear una Línea Celular de Cáncer Cervical que Exprese de Manera Estable la Proteína de Represión *TetR*.
 - 3.1. Transfectar el Plásmido *pcDNA6/TR* en la Línea Celular SiHa.
 - 3.2. Detectar el Gen *TetR* por PCR en las Líneas Establemente Transfectadas con *pcDNA6/TR*.
 - 3.3. Detectar la Expresión de *TetR* por RT-PCR en las Líneas Establemente Transfectadas con *pcDNA6/TR*.
 - 3.4. Ensayo de Tinción *LacZ* en las Líneas Establemente Transfectadas con *pcDNA6/TR*.
4. Crear Líneas Celulares de Cáncer Cervical Establemente Transfектadas con los Vectores de Expresión de shRNA.
 - 4.1. Determinar el Funcionamiento del Promotor U6_{TetO1}.
 - 4.2. Transfectar en SiHa/TR los Plásmidos que Expresan RNA de interferencia para los genes *E6* y *E7* (HPV-16).
 - 4.3. Genotipificar las Líneas Celulares Establemente Transfectadas por PCR.
5. Determinar si Existe un Cambio en la Expresión de *mdm2* Provocado por la Inhibición de *E6* y *E7* en las Células de Cáncer Cervical.
 - 5.1. Estandarizar las Reacciones de PCR Semi-Cuantitativo.

- 5.2. Analizar el Efecto del Silenciamiento Post-Transcripcional de *E6* y *E7* (HPV-16) por medio de RNAi en la Expresión de *mdm2* por medio de PCR Semi-Cuantitativo.

METODOLOGÍA

1. Crear un Vector para la Expresión Inducible de shRNA.

1.1. Elección de un Promotor para la Expresión de RNAi. Entre los promotores de RNA polimerasa III comercialmente disponibles se encuentran H1 y U6. En nuestro caso, la elección se inclinó hacia U6 y el plásmido utilizado fue *pSilencer 1.0* (AMBION).

1.2. Introducir la Secuencia Operadora TetO1 dentro del Promotor de RNAPol III U6. Se introdujo, mediante PCR, la secuencia operadora TetO1 en el promotor U6 del plásmido *pSilencer 1.0*, los oligonucleótidos utilizados fueron: 5'- GGT ACC CGC TCT AGA ACT AGT GG -3' y 5'- GGG CCC AAA CAA GGC TTT TCT CCA AGG GAT ATT TAT AAC **TCT ATC AAT GAT AGA GTG** TCT CAA AAC ACA CAA TTA CTT TAC AGT TAG GGT GAG TTT CCT TTT GTG CTG -3'.

La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: 1x PCR buffer (GENESCRIP), 0.25mM dNTP mix (FERMENTAS), 2.5mM MgCl₂, 0.10μM de primers y 0.3u *taq* polimerasa (GENSCRIPT). El programa utilizado fue: 95°C/5'|94°C/1'-58°C/1'-72°C/1'(35 Ciclos)|72°C/7'.

El vector *pSilencer 1.0* fue cortado con las enzimas *KpnI* y *ApaI* (PROMEGA) agregando: 1x buffer de reacción (PROMEGA, NEW ENGLAND BIOLABS, FERMENTAS), 1X BSA, 5-10μg de DNA y 2u de enzima en un volumen final de 20μl, incubando a 37°C por media hora. El plásmido, sin promotor, fue purificado de un gel de agarosa TAE 0.8%. El producto de PCR anterior fue también digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *ApaI*. El amplicón fue ligado al vector con T4 DNA polimerasa (NEW ENGLAND BIOLABS) en una relación 1:1, la ligación se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos después de lo cual se transformó en *E. coli* DH5α calcio competente.

Para preparar las células calcio competentes, la cepa DH5 α (*E. coli*) fue sembrada en 3ml de medio LB caldo y se incubó a 37°C/150 rpm toda la noche, de este pre-inoculo 100-500 μ l se cultivaron en un matraz de 500ml con 100ml de medio LB caldo y se incubó a 37°C/150 rpm/3-5 hrs u OD 600nm 0.2-0.4 (en delante todos los pasos se realizaron en frío), las células se centrifugaron en tubos de 50ml a 3000 rpm/4°C/7 min, el medio se decantó y se resuspendieron en 20ml de buffer frío (60mM CaCl₂, 10mM PIPES, 15% Glicerol, ajustado a pH 7.0 con NaOH), las células se centrifugaron una vez más a 2500 rpm/4°C/5 min, fueron resuspendidas nuevamente en 20ml de buffer y se incubaron en hielo por 30 min o toda la noche a 4°C, se volvió a centrifugar a 2500 rpm/4°C/5 min y se resuspendieron en 2ml de buffer, las células se alicuotaron en tubos de 1.5ml (50-200 μ l por tubo) y se almacenaron a -80°C.

Al día siguiente de la transformación, se tomaron 10 colonias y se cultivaron en 3ml de medio LB caldo (ampicilina 100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C/150 rpm/toda la noche. Al día siguiente se vaciaron 1.2ml del cultivo en un tubo de 1.5ml y se centrifugaron a 12 000 rpm/30 segundos, se decantó el medio y se resuspendieron las bacterias en 150 μ l de Solución I (50mM glucosa, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl), se agregaron 300 μ l de Solución II (0.2N NaOH, 1% SDS) mezclando delicadamente por inversión de tres a cinco veces y se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos (no excediendo el tiempo de incubación mas allá de cinco minutos), se añadieron 250 μ l de Solución III (3M KOAc, 5.75ml ácido acético glacial, aforado a 50ml con DDH₂O) se mezclaron por inversión 5 veces y se incubaron en hielo por 5 minutos, se centrifugaron a 14 000 rpm/10 minutos y se decantó el sobrenadante en un tubo nuevo, se agregaron 350 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se dio vortex por 30 segundos, se centrifugaron a 12 000 rpm/5 minutos y se extrajo la fase acuosa para colocarla en un tubo nuevo, se añadieron 500 μ l de isopropanol, se mezclaron por inversión y se incubaron a -20°C/20 minutos, la muestra se centrifuga a 14 000 rpm/15 min/4°C, se decantó el alcohol con cuidado de no tirar la pastilla (DNA plásmidico y RNA) y se agregaron 500 μ l de alcohol etílico 70%, se mezclaron brevemente por inversión (el uso de un vortex es opcional) y se centrifugaron a 14 000 rpm/5

minutos, se decantó el alcohol con cuidado y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 10-15 minutos, la pastilla se resuspendió en 50 μ l TE 1x con RNAsa (10 μ g/ml) y se incubó a 37°C/10 minutos.

El DNA extraído de cada clona fue entonces cortado nuevamente con las enzimas *KpnI* y *Apal* para confirmar la presencia del promotor U6_{TetO1} en el vector *pSilencer 1.0*.

1.3. Clonar un Cassette de Selección en el Vector pSilencer-U6_{TetO1}. Para añadir un marcador de selección, se diseñaron los primers 5'- AAC GGG GTA CCG GAA CAA CAC TCA ACC CTA TCT -3' y 5'- GCG GCG GGT ACC CCA GAC ATG ATA AGA TA CAT TGA TG -3' para amplificar el gen de resistencia a zeocina encontrado en el plásmido *pcDNA4/TO/LacZ* (INVITROGEN), estos primers también insertan el sitio de restricción *KpnI* (negrita) en los extremos del amplicón; la reacción de PCR se realizó siguiendo el programa: 95°C/5'|94°C/30"-60°C/30"-72°C/2'(35 Ciclos)|72°C/7'.

El producto de PCR resultante fue digerido con la enzima *KpnI* y clonado en el mismo sitio de restricción del vector *pSilencer-U6_{TetO1}*, la ligación se transformó en *E. coli* DH5 α calcio competente. El DNA obtenido de las clonas transformadas fue cortado con la enzima de restricción *KpnI* para confirmar la inserción del gen zeocina en el vector *pSilencer_{TetO1}*.

Se determinó la orientación en la cual el gen de resistencia (*Zeo*) se integró al vector usando las enzimas *DdeI* y *XmaI*.

2. Clonar las Secuencias de shRNA en el Vector Inducible *pSilencer_{tz}*.

2.1. Alinear y Clonar las Secuencias de shRNA en pSilencer_{tz}. El diseño de las secuencias de RNAi se realizó con ayuda del programa proporcionado por AMBION. La secuencia de los oligos es: 5'-GTC CTG AAG AAA AGC AAA G-3' para E6 y 5'-ACT GAT CTC TAC TGT TAT G-3' para E7. Se agregó la secuencia 5'-GAT-3' en el extremo 3', además de la secuencia 5'-CCGG-3' en el extremo 5'.

Los oligos se mezclaron de manera equimolar (10 μ M) en un volumen final de 200 μ l de buffer de alineación (PBS 1x pH 6.8, 2mM MgCl₂) y se expusieron al

programa de temperaturas siguiente: 95°C/5 min, 70°C/5 min disminuyendo de manera gradual a temperatura ambiente. Las construcciones de shRNA (short hairpin RNA) se clonaron en el vector *pSilencer_{TZ}* en los sitios *Apal/EcoRV*. Para identificar las clonas positivas los DNA se cortaron con las enzimas de restricción *KpnI/EcoRV* y las muestras se corrieron en un gel de agarosa TAE 2%.

3. Crear una Línea Celular de Cáncer Cervical que Exprese de Manera Estable la Proteína de Represión *TetR*.

- 3.1. Transfectar el Plásmido pcDNA6/TR en la Línea Celular SiHa. Para el ensayo de transfección, se sembraron 2×10^5 células (SiHa) en medio completo DMEM (10% suero fetal bovino, 100u penicilina:100μg estreptomicina:0.25μg amfotericina B/ml) en una placa de 12 pozos, al día siguiente, se extrajo el medio y se combinaron 1.6μg de plásmido *pcDNA6/TR* con 4μl de Lipofectamin 2000 (INVITROGEN) en 200μl de medio DMEM por pozo y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. La mezcla fue entonces agregada a las células añadiendo, además, 800μl de medio. Las células se incubaron a 37°C/5% CO₂ toda la noche. Al día siguiente se sustituyó el medio por DMEM/10% FBS y a las 48 hrs se aplicó blasticidina (2μg/ml) por un periodo de 7-10 días, después de este periodo, se realizaron cultivos monoclonales de las células sobrevivientes.

- 3.2. Detectar el gen TetR por PCR en las Líneas Establemente Transfectadas con pcDNA6/TR. Se recolectaron las células del frasco de cultivo usando Tripsina-EDTA 1x (GIBCO) y se resuspendieron en 1.5ml de PBS 1x (2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, 136.89mM NaCl, 8.10mM Na₂HPO₄, pH 7.4), se centrifugaron a 12 000 rpm/1 min y se lavó la pastilla dos veces con PBS 1x; se decantó el PBS 1x y se resuspendieron las células en 1ml de buffer de lisis nuclear (10mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 2mM EDTA), se centrifugaron a 12 000 rpm/5 min, se decantó el buffer y las células se resuspendieron en 300μl de buffer de lisis más 10μl de proteínasa K (10mg/ml) y 40μl de SDS 10%, se mezcló de manera suave y se incubó a 45°C toda la noche. Al siguiente día se agregaron 100μl de 6M NaCl al

lisado, se mezcló vigorosamente por inversión por 15 segundos y se centrifugó a 14 000 rpm/10 min, se decantó el sobrenadante en un tubo nuevo y se repitió el proceso hasta que no hubo más precipitación de sales, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 1/10 del volumen total de Acetato de Sodio 3M (pH 5.2), se mezcló y se añadió 2-3 volúmenes de isopropanol frío, se mezcló hasta que el DNA empezó a precipitar, se centrifugó a 14 000 rpm/5 min, se decantó el alcohol y se lavó la pastilla con 500μl de etanol 70%, se centrifugó una vez más a 14 000 rpm/5 min, se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla por 10-15 minutos a temperatura ambiente, el DNA se resuspendió en 200μl de TE 1x (10mM Tris, 1mM EDTA) con RNAsa.

A partir de las muestras de DNA obtenidas de las diferentes clonas, se realizó una reacción de PCR utilizando los primers 5'-AGA GCT GCT TAA TGA GGT CGG -3' y 5'-AGC GAC TTG ATG CTC TTG ATC -3' para detectar la secuencia codificante de *TetR* (~400 bp), el programa utilizado fue como sigue: 95°C/5'|94°C/30"-60°C/30"-72°C/1'(35 Ciclos)|72°C/7'.

3.3. Detectar la Expresión de TetR por RT-PCR en las Líneas Establemente Transfectadas con pcDNA6/TR. Para extraer el RNA total, se tomaron las placas dónde se sembraron las células, se decantó el medio y se lavó dos veces con PBS 1x, se decantó el PBS 1x y se utilizó Trizol (INVITROGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para observar la calidad del RNA, las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro, se mezclaron con el buffer de muestra [50μl buffer MOPS 10x (0.2M MOPS, 10mM EDTA, 50mM NaOAc), 250μl formamida de-ionizada, 90μl formaldehido 35%, 108μl DDH₂O DEPC (di-etil pirocarbonato 0.1%), 2μl bromuro de etidio (stock 10mg/ml)] y se incubaron a 65°C por 10 minutos, se agregaron 3μl de buffer de carga (0.25% bromofenol, 0.25% xylen cyanol, 20% FICOLL/ DDH₂O DEPC) y se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa MOPS (1.7% formaldehido) usando buffer MOPS 1x.

La reacción de RT-PCR se realizó utilizando 4μg de RNA total más 0.5μg de oligo dT por cada μg de RNA utilizado en un volumen de 11μl, ésta mezcla se incubó a

70°C/10 minutos y luego se enfrió en hielo por 5 minutos. Pasado dicho tiempo, se agregaron 2.5μl de AMV RT 10x buffer, dNTP's (0.5mM final), 10u de inhibidor de RNAsas y 3u de AMV RT polimerasa en un volumen final de 25μl, se incubó la reacción a 42°C/1 hr. El PCR se realizó utilizando los primers y las condiciones descritas en el punto 3.2.

3.4. Ensayo de Tinción LacZ en las Líneas Establemente Transfectadas con pcDNA6/TR. Se sembraron 2×10^5 células en una placa de doce pozos y se transfeció el plásmido *pcDNA4/TO/LacZ* (INVITROGEN) usando Lipofectamin 2000 (INVITROGEN), el ensayo se realizó por triplicado.

Para inducir la expresión de *LacZ* se agregó tetraciclina al medio completo DMEM a una concentración final de 10 μg/ml y se incubó a 37°C/5% CO₂.

Al transcurrir 72 horas de la transfección, se retiró el medio y se dieron dos lavados con PBS 1x, las células se fijaron con glutaraldehído (0.5% en PBS) por 10 minutos, se lavó dos veces con PBS 1x y se agregó la solución de tinción (5mM ferricianuro de potasio, 5mM ferrocianuro de potasio, 2mM MgCl₂, 1 mg/ml X-gal). La tinción fue incubada en la oscuridad a 37°C toda la noche.

4. Crear líneas celulares de cáncer cervical establemente transfectadas con los vectores de expresión de shRNA.

4.1. Determinar el Funcionamiento del Promotor U6_{TetO1}. Se diseñó y construyó el vector RNAi contra GFP usando la secuencia 5'-GAA GCA GCA CGA CTT CTT C-3' en la manera descrita en el objetivo 2.1. Se prepararon 2.1×10^6 células y se mezclaron con los complejos Lipofectamin 2000-*pSilencer_{Tz}/pEGFP-N3* y Lipofectamin 2000-*pS_{Tz}-shRNAGFP/pEGFP-N3* (la proporción entre los vectores fue de 2:1). Posteriormente se sembraron ~350,000 de estas células (por pozo) en placas de 12 pozos (Figura 16).

Las células fueron incubadas por doce horas después de las cuales se reemplazó el medio con 2ml de medio completo DMEM y agregando 2μl de tetraciclina (stock 10mg/ml) a los ensayos positivos.

Al transcurrir 48 horas más, se recolectaron las células lavando dos veces con PBS 1x y aplicando tripsina. Estas células fueron resuspendidas en PBS 1x y recolectadas en tubos de 1.5ml donde se lavaron dos veces más con PBS 1X. Las células se precipitaron por centrifugación, se resuspendieron en 20μl de PBS 1x y se montaron en portaobjetos para su análisis en un microscopio confocal (Leica DB1000).

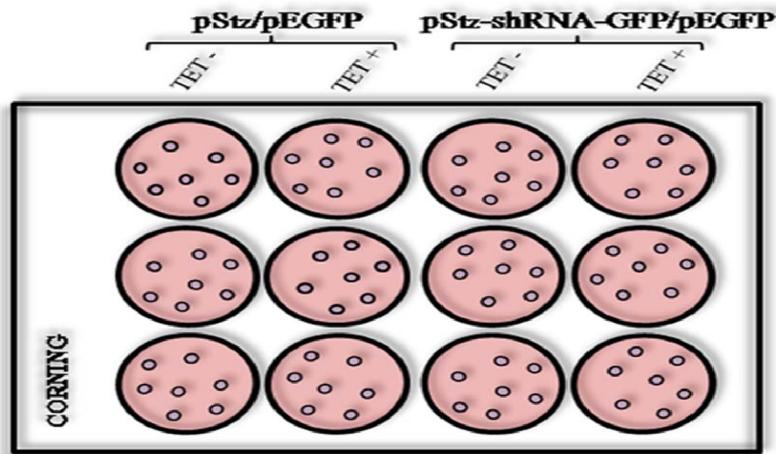


Figura 16. Co-transfección de *pSilencer_{LZ}-pEGFP-N3* (control) y *pS_E-shRNA/GFP-pEGFP-N3* en SiHa/TR3. En la serie marcada TET + se agregó tetraciclina a una concentración de 10μg/ml mientras que la serie marcada TET – se utilizó como un control negativo.

4.2. Transfectar en SiHa/TR los Plásmidos que Expresan RNA de interferencia para los genes E6 y E7 (HPV-16). Se cultivaron dos placas de 24 pozos con 1×10^5 células y se incubaron toda la noche a 37°C/5% CO₂. Al día siguiente, se mezclaron 0.8μg de *pSilencer_{LZ}*, *pS_{LZ}-shRNA/E6363* ó *pS_{LZ}-shRNA/E757* con 2μl de Lipofectamin 2000 en 100μl de medio DMEM por pozo y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el medio de las células y se agregó 400μl de medio DMEM por pozo para luego añadirse la mezcla DNA/Lipofectamin 2000, las células se incubaron nuevamente toda la noche y al siguiente día se retiró la mezcla de transfección y se agregaron 500μl de medio DMEM (10% FBS). Al cabo de 24 horas las células se pasaron a placas de 12 pozos y al término de 24 horas más se inició la selección de células establemente transfectadas utilizando Zeocina (100μg/ml) por 15 días.

4.3. Genotipificar las Líneas Celulares Establemente Transfectadas por PCR. Se tomaron las clonas que pasaron el proceso de selección con zeocina y se extrajo el DNA genómico usando una alta concentración de sales.

Los oligos utilizados en la reacción de PCR fueron: U6tet fwd (5' - GGT ACC CGC TCT AGA ACT AGT GG - 3'), U6 rvs (5' - AAA CAA GGC TTT TCT CCA AGG G - 3'), U6tetO1 rvs (5' - T TAT ACT CTA TCA ATG ATA GAG - 3') y pSU6 rvs (5' - TTA CGC CAA GCG CGC AAT TAA C - 3'). Cada uno de los oligos reversos está diseñado para detectar la integridad de las construcciones dentro de las células (Figura 17). El programa de amplificación fue 95°C/5'|94°C/30"-57°C/30"-72°C/1'(30 Ciclos)|72°C/6' para U6 rvs y U6TetO1 rvs, para pSU6 rvs, el programa fue 95°C/5'|94°C/30"-59°C/30"-72°C/1'(35 Ciclos)|72°C/7'.

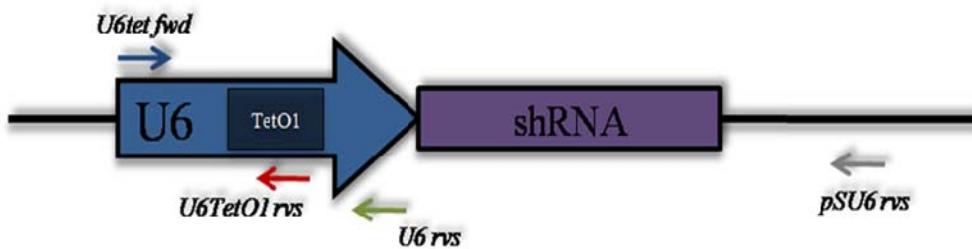


Figura 17. Esquematización de las regiones de unión de los diferentes primers para la genotipificación de las clonas SiHa/TR3 establemente transfectadas con las construcciones de shRNA para E6 y E7 (HPV-16).

5. Determinar si Existe un Cambio en la Expresión de *mdm2* Provocado por la Inhibición de *E6* y *E7* en las Células de Cáncer Cervical.

5.1. Estandarizar las Reacciones de PCR Semi-Cuantitativo. Los oligos utilizados en las reacciones de PCR fueron: *hgapdh5* 5'-AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3', *hgapdh3* 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3', *Mdm2RTF* 5'-GCG CGA AAA CCC CGG ATG GTG AGG-3', *Mdm2RTR* 5'-CCT GTG CTC TTT CAC AGA GAA GC-3', *P3* 5'-GGT TCA CTG AAG ACC CAG GTC C-3', *GE5R* 5'-ACC ATC GCT ATC TGA GCA GCG C-3', *E6RTF* 5'-CAG GAC CCA CAG GAG CGA CCC-3', *E6RTR* 5'-GGA CAC AGT GGC TTT TGA CAG-3', *E7RTF* 5'-CCC AGC TGT AAT CAT GCA TG-3', *E7RTR* 5'-CCC ATT AAC AGG TCT TCC AAA GTA CG-3'.

Se preparó el experimento de PCR multiplex de la siguiente manera: 1x buffer de PCR, 2.5mM MgCl₂, 0.25mM dNTP's, 100nM primer *hgapdh5*, 100nM primer *hgapdh3*, 100nM primer *Mdm2RTF/P3/E6RTF/E7RTF*, 100nM primer *Mdm2RTR/GE5R/E6RTR/ E7RTR*, 0.3u *taq* polimerasa, 250ng cDNA, aforado a 25μl con DDH₂O estéril, 95°C/5'|94°C/45"-59°C/45"-72°C/1'(34 Ciclos)|72°C/7' siguiendo una curva que comprende 22, 24, 26, 27-34 ciclos. Se realizaron de tres a 4 repeticiones de este experimento, los productos de PCR se analizaron por electroforesis, los geles se capturaron en forma digital y se analizaron los valores densitométricos obtenidos, se calculó el valor de la media de cada punto y se graficaron para obtener la curva de crecimiento de cada uno de los genes analizados.

5.2. Analizar el Efecto de Silenciamiento Post-Transcripcional de E6 y E7 (HPV-16) por medio de RNAi en la Expresión de mdm2 por medio de PCR Semi-Cuantitativo. Se sembraron 8x10⁵ células de las diferentes clonas (*pSilencer_{Tz}*, *pS_{Tz}-shRNA/E6363* y *pS_{Tz}-shRNA/E757*) en cajas petri de 60 mm por duplicado; se indujo la expresión de RNAi, en los ensayos positivos, agregando tetraciclina a una concentración final de 10μg/ml. Estos experimentos se realizaron por lo menos en seis ocasiones diferentes para cada clona (Figura 18).

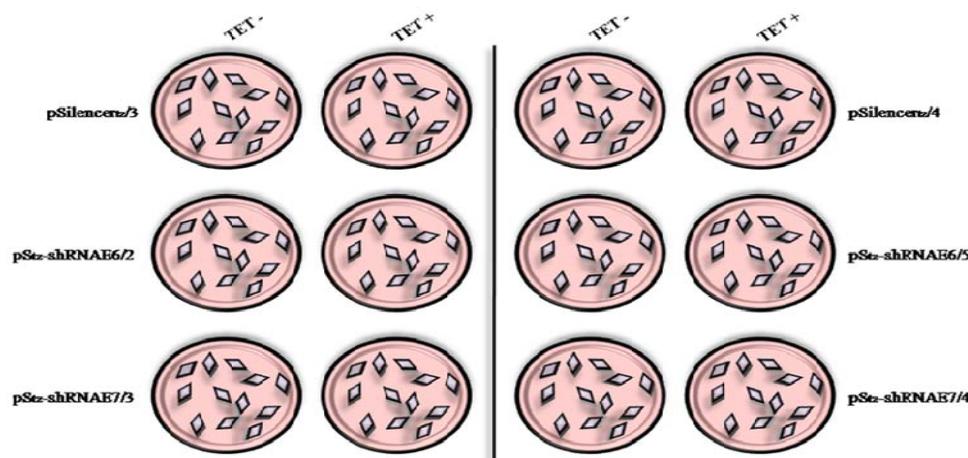


Figura 18. Esquema gráfico del montaje de los experimentos de inducción de la expresión de RNAi en las diferentes clonas de TR3. Estos experimentos se realizaron en por lo menos seis eventos con su respectiva repetición.

Al pasar 48 hrs, se extrajo el RNA total usando TRIZOL (INVITROGEN), se tomaron 4 μ g RNA de cada muestra y se trataron con RQ1 DNase (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El experimento de RT-PCR se llevo a cabo de la siguiente manera: 2 μ g oligo dT, 1x AMV RT buffer (NEW ENGLAND BIOLABS), 10u RNAsin (inhibidor de RNAsas, PROMEGA), 0.5mM dNTP mix, 3u AMV RT polimerasa (NEW ENGLAND BIOLABS), DEPC DDH₂O a 30 μ l. La reacción se incubó a 42°C por 1 hora.

El cDNA obtenido de cada muestra se cuantificó y se diluyó a una concentración final de ~100ng/ μ l. Las reacciones de PCR Semi-Cuantitativo se realizaron usando 27 ciclos para *mdm2*, 28 ciclos para *p53* y 25 ciclos para *E6* y *E7*. Al finalizar las reacciones de PCR, las muestras se cargaron en un gel de agarosa TAE 0.8%, se tiñeron utilizando bromuro de etidio y se documentaron en forma digital para hacer el análisis densitométrico usando el programa *Gel Pro Analyzer 4.0TM*.

El análisis estadístico se realizó mediante una Prueba “t” de Student, este tipo de análisis es aplicado cuando se quiere estimar el valor de la media de una población con distribución normal cuyo tamaño de muestra es pequeño y dónde la desviación estándar debe ser determinada a partir de los datos obtenidos. Con esta prueba se puede establecer la significancia estadística de la diferencia entre la media de dos poblaciones sí ***p≤0.05***.

RESULTADOS.

1. Crear un Vector para la Expresión Inducible de shRNA.

- 1.1. *Elección de un Promotor para la Expresión de RNAi.* La elección del promotor adecuado siempre está en función de aquello que se desea expresar. En el caso de una construcción de shRNA, lo ideal sería un promotor de fuerte expresión además de que sea sencillo en su funcionamiento y que no altere la estructura secundaria de dicha construcción añadiendo secuencias no deseadas, en este caso, secuencias como podrían ser 5' y 3' UTR.

Dentro de estos requerimientos, se encuentran los promotores de RNA polimerasa III que dirigen la expresión de RNA's nucleares pequeños (snRNA's). Existen varias ventajas al usar sistemas bajo la regulación de promotores de RNAPolIII, por ejemplo, estos promotores son activos en un gran número de líneas celulares, la transcripción de shRNA es alta, ya que estos son promotores constitutivos y el hecho de que sean activados por elementos en *cis* encontrados exclusivamente en la región 5' flanqueante resulta en moléculas de RNA uniformes que contienen términos 5' y 3' bien definidos.

El plásmido utilizado en este trabajo fue *pSilencer 1.0* (AMBION), que fue amablemente donado por Tomoo Iwakuma, MD, PhD (Department of Molecular Genetics, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center).

- 1.2. *Introducir la Secuencia Operadora TetO1 dentro del Promotor de RNAPol III U6.*

Al crear un vector con shRNA's (short hairpin RNA) se obtiene la ventaja de que se puede expresar estos RNAi (interference RNA) dentro de la célula objetivo de una manera sencilla y mucho más barata que transfectar con siRNA (short interference RNA) sintéticos, pero al mismo tiempo se tiene la limitante que representa la eficiencia de transfección inherente a cada línea celular.

En este trabajo se eligió trabajar con la línea celular de cáncer cervical SiHa, estas células han sido transformadas por el serotipo de interés, el Virus de Papiloma Humano Tipo 16 (HPV-16), pero esta línea celular no posee una buena eficiencia de transfección ($\leq 5\%$), por tanto, al realizar los ensayos para introducir los vectores-shRNA en las células y analizar los datos, obtendríamos una imagen sesgada de los resultados causado por el fondo que representaría una buena cantidad de células no transfectadas.

Para lograr una expresión uniforme de las construcciones de RNAi dentro de la línea celular de cáncer cervical, se propuso crear líneas establemente transfectadas con los vectores-shRNA, pero el problema surgió al considerar que las células transformadas por HPV requieren de la expresión continua de E6 y E7 para permanecer viables y al intentar introducir en las células, de manera estable, los shRNA para los genes anteriores la probabilidad de éxito sería considerablemente baja, por tanto, un método para controlar la expresión de los RNAi era esencial. A la fecha, existen varios vectores cuya expresión de RNAi puede ser regulada y los métodos por los cuales ha sido hecho se enumeran en Henriksen *et al.*, 2007.

En el momento en que esta decisión fue hecha, el desarrollo de vectores y la expresión de RNA de interferencia de manera regulable se encontraba, técnicamente, en vías de desarrollo, así que, usando como guía la estrategia realizada por Ohkawa y Taira, 2000 (esquematizada en la figura 19), se introdujo la secuencia de represión TetO₁ (5'-AC TCT ATC AAT GAT AGA GT-3') dentro del promotor U6 del plásmido *pSilencer 1.0*, haciéndolo regulable por la proteína de represión TetR (Figura 20).

El promotor U6 del vector *pSilencer 1.0* fue reemplazado por nuestro promotor modificado, denominado en adelante como U6_{TetO1}. El DNA obtenido de las bacterias transformadas fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI/EcoRV* para confirmar la inserción del promotor U6_{TetO1} en el vector, qué en adelante será referido como *pSilencer_{TetO1}* (Figura 21).

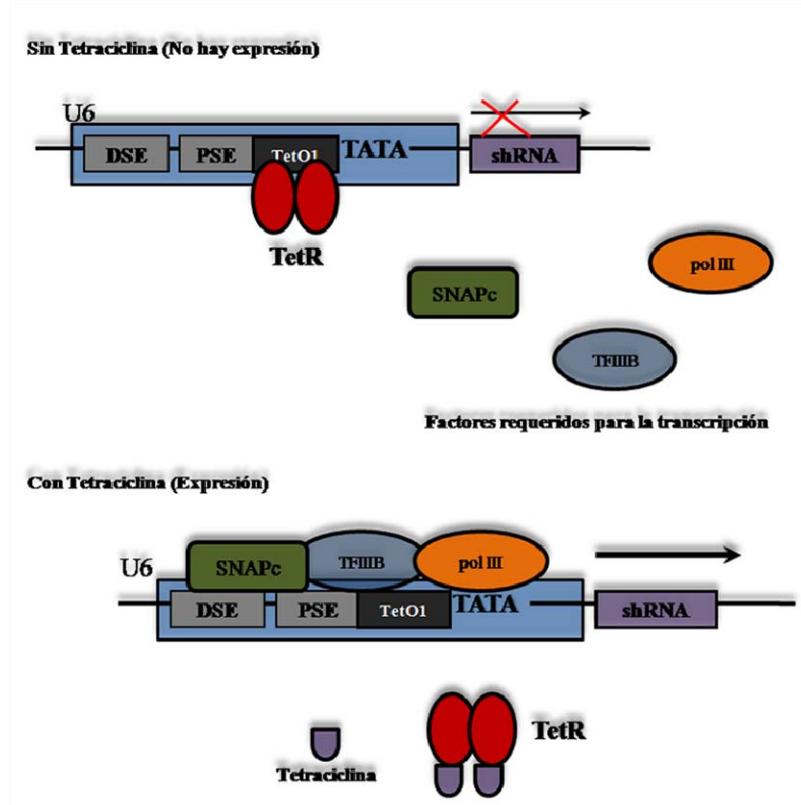


Figura 19. Esquema del sistema *tet on/tet off*.

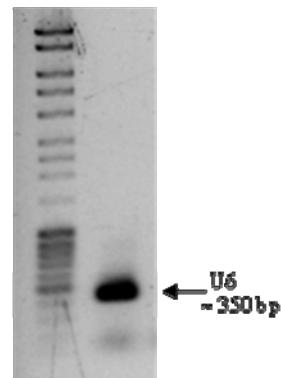


Figura 20. PCR de U6. En el gel se muestra el amplicón obtenido del PCR, proceso durante el cual se introdujo la secuencia operadora TetO1 que servirá para regular la expresión de los shRNA. Gel de agarosa TAE 0.8%.

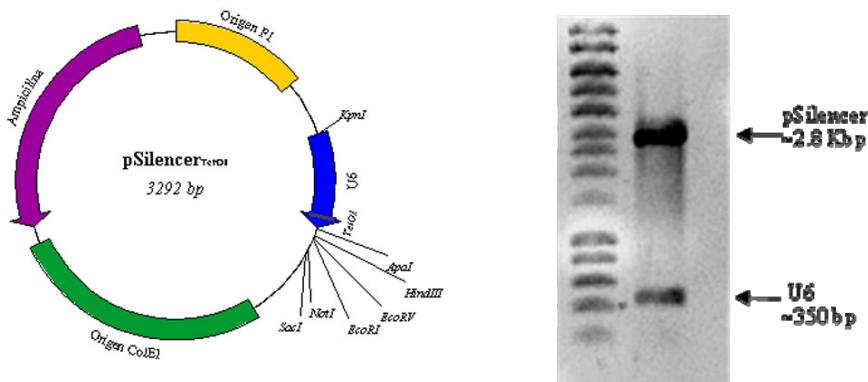


Figura 21. Digestión de pSilencer_{TetO1} con *Kpn*I/*Eco*RV, en esta imagen se puede apreciar al promotor U6_{TetO1} que fue clonado en lugar del promotor original. Gel de agarosa TAE 0.8%

- 1.3. *Clonar un Cassette de Selección en el Vector pSilencer-U6_{TetO1}.* Con el promotor inducible en nuestro vector, era posible expresar los shRNA de manera uniforme en las células establemente transfectadas, pero, para lograr obtener las líneas estables, era necesario un marcador de selección para separar aquellas células en las que el vector se integró de manera estable al genoma de la célula.

Como se hizo notar anteriormente, ya existen varios vectores que, además de poseer promotores inducibles, tienen marcadores de selección para diferentes drogas, como pueden ser higromicina, neomicina y puromicina (*pSilencer 3.1 y 5.1 retro* de AMBION, por ejemplo), pero, nuestro vector es de primera generación y no cuenta con tales ventajas, es importante notar que incluso no se contaba con el mapa del vector y que fue necesario hacerlo en el laboratorio para poder trabajar con él.

Para añadir un marcador de selección, se amplificó el gen de resistencia a zeocina por PCR a partir del plásmido *pcDNA4/TO/LacZ* (Figura 22).

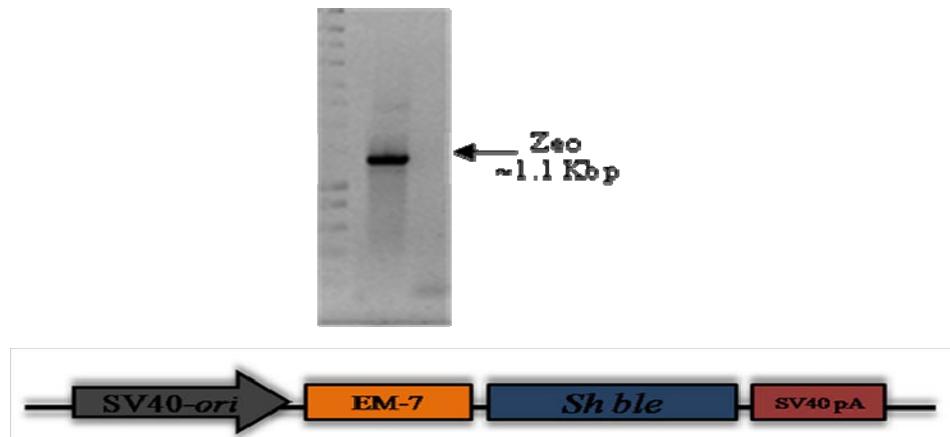


Figura 22. El plásmido *pcDNA4/TO/LacZ* (INVITROGEN), fue utilizado como molde para amplificar el gen de resistencia a Zeocina, el gen encompasa el promotor *SV40 ori*, el promotor sintético para bacterias *EM-7*, la secuencia codificante del gen bleomicina (*Sh ble*) y la secuencia de terminación *SV40 pA*, se agregaron, además, 100bp en el extremo 5' para separarlo de la secuencia promotora U6. Gel de agarosa TAE 0.8%.

El producto de PCR resultante fue digerido con *KpnI* y clonado en el vector *pSilencer-U6_{TetO1}*. El DNA de las clonas obtenidas posteriormente, fue digerido, una vez más, con la enzima *KpnI* para confirmar la inserción del gen zeocina en el vector *pSilencer_{TetO1}*, que en delante será referido como *pSilencer_{Tz}* (Figura 23).

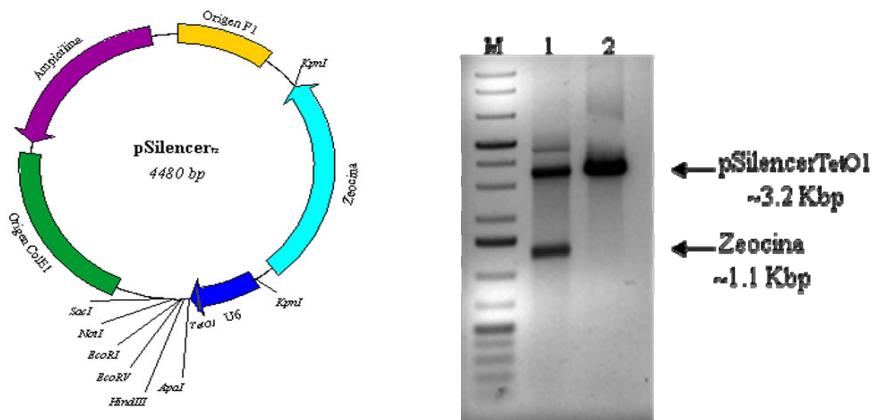


Figura 23. Digestión de pS_{Tz} (1) y pSilencer_{TetO1} (2) con *KpnI*. (M) Marcador de peso molecular. Gel de agarosa TAE 0.8%

Al tener las clonas positivas, se determinó la orientación en la cual el gen de resistencia (*Zeo*) se integró al vector, pues era necesario que el marcador se transcribiera hacia el lado opuesto del promotor *U6_{TetO1}*, de lo contrario, podría inhibir la expresión de los shRNA. Para determinar esto, se tomó el DNA de las clonas positivas y se cortó con las enzimas *DdeI* y *XmaI*, lo cual resultó en un

patrón de bandas definido mediante el cual se pudo determinar la orientación antisentido del gen de zeocina dentro del vector *pSilencer_{tz}* (Figura 24).

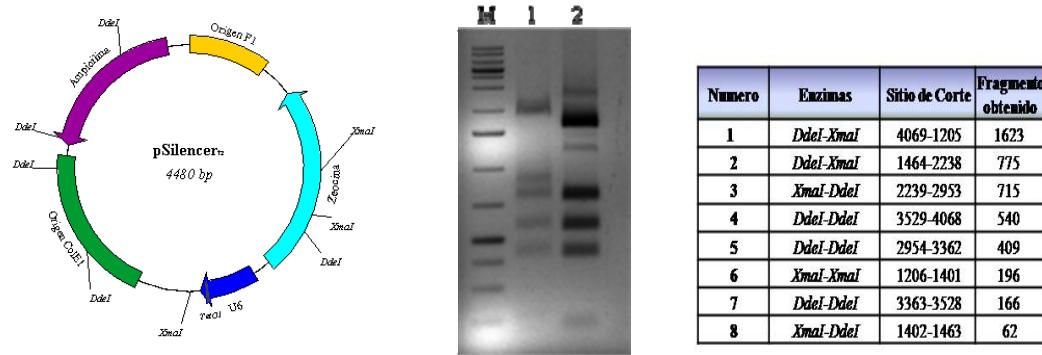


Figura 24. Digestión de *pS_{tz}* (1) y *pSilencer_{TetO1}* (2) con *DdeI* y *XmaI*. (M) Marcador de peso molecular. Gel de agarosa TAE 2%

2. Clonar las Secuencias de shRNA en el Vector Inducible *pSilencer_{tz}*.

2.1. Alinear y Clonar las Secuencias de shRNA en *pSilencer_{tz}*. Para lograr la expresión de siRNA a partir de un plásmido, se diseñaron oligonucleótidos de 55 bases de largo complementarios a la secuencia de los genes objetivo [E6 y E7 (HPV-16)]. El diseño de los oligos permitirá que al ser transcritos por la RNA polimerasa III formen estructuras de RNA de doble cadena de 19bp de longitud (Figura 25).

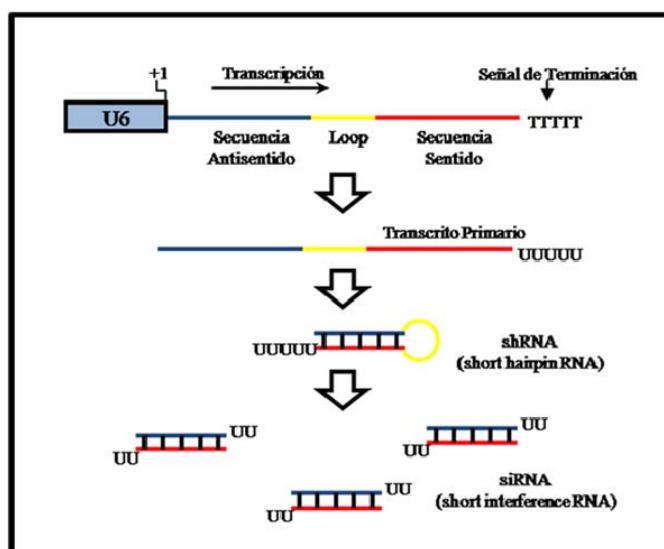


Figura 25. Vista gráfica y general sobre el proceso de un RNAi expresado a partir de un plásmido

El diseño de las secuencias de RNAi correspondientes a los genes objetivo sigue reglas básicas de diseño en las cuales se establece que las secuencias candidato deben empezar por AA, el porcentaje de GC debe ser entre 30-50% y debe evitarse secuencias de T de más de cuatro bases en tandem (la señal de terminación de la RNA polimerasa III es una serie de cinco timinas). Las secuencias fueron posteriormente seleccionadas en base a la baja estabilidad termodinámica del extremo 5' de la secuencia antisentido, causando así, que sea la única cadena que se incorpore en el complejo de silenciamiento y pueda unirse al mRNA objetivo (Khvorova *et al.*, 2003).

Actualmente, existen herramientas más eficaces para el diseño de los RNAi, como pudiera ser la página de internet *siDirect*, este motor de búsqueda sigue algunas otras reglas además de las utilizadas por AMBION y que son más eficientes, estas reglas pueden ser revisadas en Ui-Tei *et al.*, 2004 y Reynolds *et al.*, 2004, otra vez, esta herramienta no se encontraba a la mano al diseñar los oligos, pero es importante notar que el diseño realizado y escogido se encuentra dentro de los candidatos fuertes al utilizar esta herramienta (*siDirect*) para diseñar secuencias de RNAi contra *E6* y *E7*.

Los oligos contienen la secuencia antisentido seguida por una secuencia de 15 bases no homólogas y la secuencia sentido a continuación sumando en total ~55bp. Al tener alineados los oligos, las construcciones de shRNA (short hairpin RNA) se clonaron en el vector *pSilencer_{Iz}* en los sitios *Apal/EcoRV*. Para identificar las clonas positivas, los DNA se cortaron con las enzimas de restricción *KpnI/EcoRV* (Figura 26), en las clonas positivas, el promotor unido a la construcción de shRNA mide ~50bp más que el promotor del plásmido control, para poder ver tal diferencia, las muestras se corrieron en un gel de 2%. Los vectores obtenidos fueron denominados *pS_{Iz}-shRNA/E6363* para E6 y *pS_{Iz}-shRNA/E757* para E7. Los números en los nombres de los plásmidos representan la posición en el mRNA a la cual son complementarios.

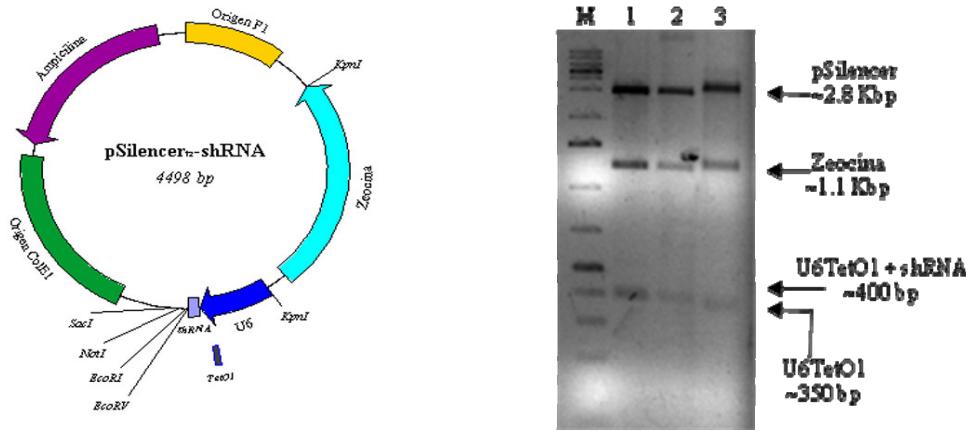


Figura 26. Digestión de *pS_c-shRNA/E6363* (1), *pS_c-shRNA/E757* (2) y *pS_c* (3) con *KpnI* y *EcoRV*. (M) Marcador de peso molecular. Gel de agarosa TAE 2%

3. Crear una Línea Celular de Cáncer Cervical que Exprese de Manera Estable la Proteína de Represión *TetR*.

- 3.1. Transfectar el Plásmido *pcDNA6/TR* en la Línea Celular *SiHa*. Para que el sistema de inducción por tetraciclina diseñado funcionara, era necesario que la proteína de represión *TetR* se expresara dentro de las células, para ello, se transfeció, de manera estable, el vector *pcDNA6/TR* (INVITROGEN) en las células *SiHa*. De este experimento, se obtuvieron un total de seis clonas estables, de las cuales, la clona 5 presentaba una morfología extraña y crecía de manera muy lenta hasta que, finalmente, dejó de crecer.

- 3.2. Detectar el gen *TetR* por PCR en las Líneas Establemente Transfectadas con *pcDNA6/TR*. Para las cinco clonas restantes, transfectadas con el plásmido *pcDNA6/TR*, era necesario confirmar que habían integrado también el gen *TetR*, pues es común que las células solo integren los genes de resistencia. Para averiguarlo, se extrajo el DNA genómico de cada clona y a partir de las muestras de DNA obtenidas de las diferentes clonas se realizó una reacción de PCR para detectar la secuencia codificante de *TetR* (~400 bp), figura 27.

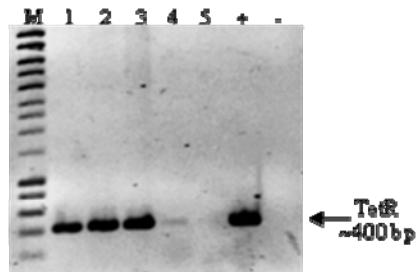


Figura 27. PCR para detectar el gen *TetR* en las clonas establemente transfectadas de la línea celular SiHa: SiHa/TR 1 (1), SiHa/TR 2 (2), SiHa/TR 3 (3), SiHa/TR 4 (4), SiHa/TR 6 (5), *pcDNA6/TR* (+), Negativo (-). Gel de agarosa, TAE, 0.8%.

De las clonas obtenidas, solo las clonas 1, 2 y 3 resultaron positivas, se repitió el PCR de la clona 4 pero resultó negativo, probablemente la banda ahí observada provenga del carril número 3.

3.3. Detectar la Expresión de *TetR* por RT-PCR en las Líneas Establemente Transfectadas con *pcDNA6/TR*. Una vez con las clonas transgénicas identificadas era esencial definir si el gen *TetR* estaba siendo expresado, para esto, se realizó la extracción del RNA total de las clonas seleccionadas (1, 2 y 3) y se realizó una reacción de RT-PCR. Con el cDNA listo, se realizó el PCR para amplificar el mRNA de *TetR* (Figura 28).

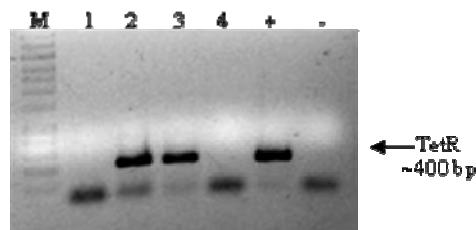


Figura 28. PCR para detectar el cDNA de *TetR* en las clonas establemente transfectadas con *pcDNA6/TR*: SiHa/TR 1 (1), SiHa/TR 2 (2), SiHa/TR 3 (3), RNA total (4), *pcDNA6/TR* (+), Negativo (-). Gel de agarosa, TAE, 0.8%.

Como se puede apreciar en el gel, a pesar de que la clona 1 posee el gen, no lo expresa, mientras que 2 y 3 sí. Con dos clonas identificadas, se debía establecer el grado y función de la proteína TetR.

3.4. Ensayo de Tinción LacZ en las Líneas Establemente Transfectadas con pcDNA6/TR. Las secuencias de operación TetO son reconocidas por la proteína de represión TetR y se une a ellas evitando la transcripción de cualquier secuencia que se encuentre río abajo de ellas. La tetraciclina tiene gran afinidad por la proteína de represión y al unirse a ella evita, a su vez, que TetR cierre el operador.

Para establecer el grado de expresión, así como la funcionalidad, de la proteína de represión TetR en la línea celular, se utilizó el gen reportero *LacZ*, este gen se encuentra en el plásmido *pcDNA4/TO/LacZ* (INVITROGEN), dicho vector posee dos operadores TetO2.

El vector arriba mencionado, fue transfectado en las clonas estables SiHa/TR2 y 3 usando Lipofectamin 2000 (INVITROGEN). Al día siguiente de la transfección, se agregó medio fresco (DMEM/10% FBS) adicionando tetraciclina, a una concentración de 10 μ g/ml, en los ensayos positivos.

Al transcurrir 72 horas de la transfección, se hizo el ensayo de tinción de *LacZ*, que determinó la funcionalidad de TetR en base al número de células azules presentes tanto en los tratamientos Tet (-) como Tet (+), figura 29.

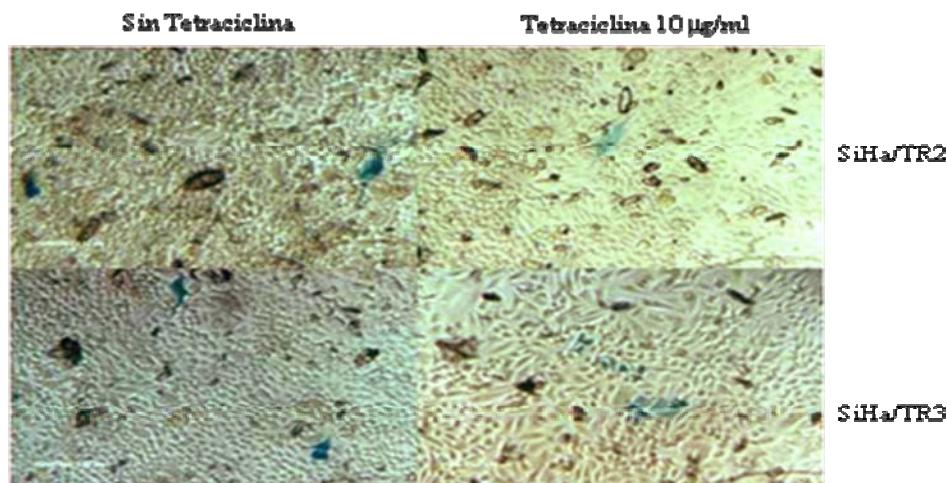


Figura 29. Tinción de *LacZ*, las clonas SiHa/TR2 y 3 fueron transfectadas con el vector *pcDNA4/TO/LacZ* y posteriormente teñidas para observar el nivel de expresión de la enzima. Foto: HP Photosmart 927, 40x.

Al observar los resultados de la tinción, se puede observar que el nivel de represión en SiHa/TR2 es mucho mayor que en SiHa/TR3, pero al agregar tetraciclina el nivel

de inducción es muy bajo en comparación, el por qué de este fenómeno queda poco claro, más sin embargo, los niveles de represión e inducción en la clona TR3 son bastante buenos, por ende, esta fue la clona que se utilizó en adelante.

4. Crear líneas celulares de cáncer cervical establemente transfectadas con los vectores de expresión de shRNA.

4.1. Determinar el Funcionamiento del Promotor U6_{TetO1}. Antes de crear las clonas estables con las construcciones de shRNA era necesario saber si nuestro promotor modificado, U6_{TetO1}, era funcional y podía ser operado correctamente por la proteína de represión TetR. Una manera sencilla de averiguarlo fue mediante el uso de un gen reportero, en este caso, GFP.

La proteína verde fluorescente (GFP) está compuesta por 238 aminoácidos y tiene un peso de 26.9KDa, fue originalmente aislada de *Aequorea victoria* y tiene un espectro de excitación con luz UV de 395nm (mayor emisión) a 475nm (menor emisión) con una emisión máxima de 509nm (color verde). Existen varios plásmidos que poseen este gen reportero y el vector utilizado en este experimento fue *pEGFP-N3* (CLONTECH), este vector posee dos mutaciones (Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr) que le proporcionan un mejor rango de fluorescencia (max. excitación 488nm, max. emisión 507nm), este plásmido fue amablemente proporcionado por el Dr. Pablo Zapata Benavides, F.C.B., U.A.N.L.

Además, se diseñó y construyó el vector RNAi contra GFP. Este vector, denominado *pS_{tz}-shRNA/GFP*, fue co-transfектado con el plásmido reportero *pEGFP-N3* en SiHa/TR3 agregando 2μl de tetraciclina (stock 10mg/ml) a los ensayos positivos.

Al transcurrir 72 horas, se recolectaron las células y fueron resuspendidas en PBS en tubos de 1.5ml. Las células se montaron en portaobjetos para su análisis en el microscopio de fluorescencia (Figura 30).

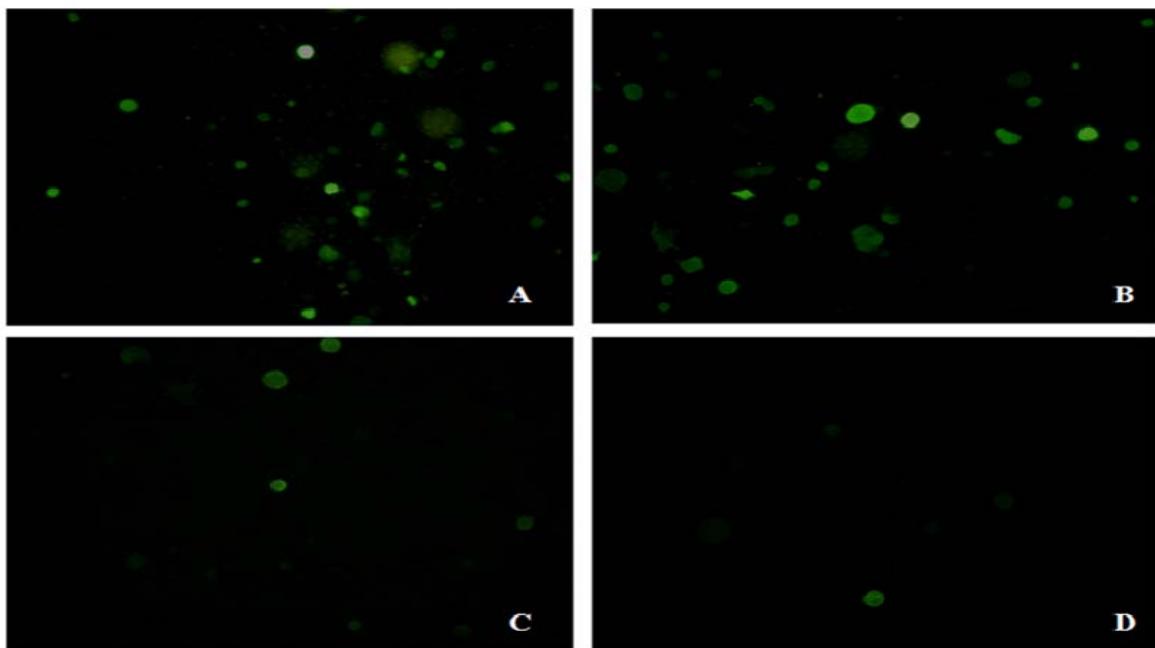


Figura 30. Análisis de la co-transfección de *pSilencer_{tz}-pEGFP-N3* (A y B) y *pS_{tz}-shRNA/GFP-pEGFP-N3* (C y D) en SiHa/TR3. A las 12 horas de la transfección se agregó tetraciclina a una concentración final de 10 µg/ml en los ensayos positivos (B y D), los negativos (A y C) se utilizaron como punto de comparación entre los tratamientos.

Al seguir el análisis de la figura 30, se puede observar que en las células transfectadas con el vector control *pSilencer_{tz}* (A y B), éstas presentaron una fluorescencia más intensa y un número relativamente mayor de células fluorescentes, mientras que en aquellas transfectadas con el vector *pS_{tz}-shRNA/GFP*, el número de células fluorescentes, así como la intensidad de éstas, se vio afectado en el control negativo (C) y bastante reducida en el tratamiento con tetraciclina (D).

Por tanto, de este experimento podemos concluir que el promotor U6_{TetO1} puede ser operado de manera satisfactoria por el sistema *Tet-On/Tet-Off* y que, además, puede expresar construcciones de shRNA. Habiendo determinado lo anterior, se prosiguió a la transfección de las secuencias de shRNA para *E6* y *E7* en SiHa/TR3.

4.2. *Transfectar en SiHa/TR los Plásmidos que Expresan RNA de interferencia para los genes E6 y E7 (HPV-16)*. Una vez que se obtuvo la línea celular que sería utilizada (SiHa/TR3) y se determinó la funcionalidad del promotor U6_{TetO1}, se transfecaron los plásmidos *pSilencer_{tz}*, *pS_{tz}-shRNA/E6363* y *pS_{tz}-shRNA/E757* usando Lipofectamin 2000 (INVITROGEN) y la selección de células establemente

transfектadas se realizó utilizando el antibiótico Zeocina. Al término de 15 días, se propagaron las clonas sobrevivientes para su genotipificación.

- 4.3. Genotipificar las Líneas Celulares Establemente Transfectadas por PCR. Para identificar las células establemente transfectadas con las construcciones de shRNA, se tomaron las clonas que pasaron el proceso de selección con zeocina y se extrajo el DNA genómico para su análisis por PCR.

Al tratar de amplificar la secuencia del promotor U6 (la secuencia de este promotor es murina y los oligos utilizados no detectan el promotor endógeno), todas las clonas se mostraron negativas, lo cual resultó inesperado, pues la detección de zeocina fue positiva en todos los casos (Figura 31) y la probabilidad de que las 21+ clonas obtenidas hubieran expulsado la secuencia promotora junto con la construcción de shRNA resultó poco creíble, por tanto, fue necesario crear las condiciones adecuadas para la detección de dichas secuencias en el genoma de las clonas obtenidas.

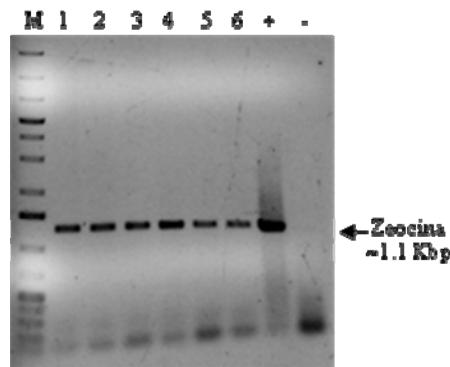


Figura 31. PCR para la detección del gen *Zeo* en las clonas estables de shRNA: pS_{iz}-3 (1), pS_{iz}-4 (2), E6363-2 (3), E6363-5 (4), E757-3 (5), E757-4 (6), *pSilencer_{iz}* (+), negativo (-). Las condiciones para la detección de este gen son las mismas descritas en el punto 1.3, gel de agarosa, TAE, 0.8%.

Cuando se busca detectar secuencias difíciles por medio de PCR, es necesario tomar algunas cosas en mente, como puede ser:

- a. El contenido de G/C dentro de la secuencia (>50% dificulta mucho su amplificación, existen varios métodos para lograrlo, la adición de DMSO 5% v/v es uno de ellos),

- b. La formación de estructuras secundarias por parte de los oligos o el molde
- c. La concentración de iones catiónicos en la reacción, no es claro aún el rol de estos cationes en el proceso de replicación del DNA, solo se sabe que la concentración adecuada de ellos en la reacción es necesaria para que la polimerasa amplifique el producto deseado, usualmente 1.5-2.5mM de MgCl₂ son suficientes en la mayoría de los ensayos.

El contenido de G/C de la secuencia promotora U6 es de ~42%, es alta pero no lo suficiente, así que se decidió probar con diferentes concentraciones de iones de magnesio. Para establecer las condiciones apropiadas para la detección del promotor U6_{TetO1} mediante PCR, fue necesario, primero hacer una curva que usó concentraciones de 1.5-5mM MgCl₂. El buffer de reacción se encuentra a 15mM de MgCl₂ y a partir de esta concentración inicial se ajusto la molaridad final de iones de magnesio en la reacción.

Como se puede apreciar en la figura 32, el amplicón resultado de los oligos *U6tet fwd-U6 rvs*, no presenta gran problema para obtenerse, aunque es necesario notar que se obtienen mejores resultados a una concentración de 4-5mM MgCl₂.

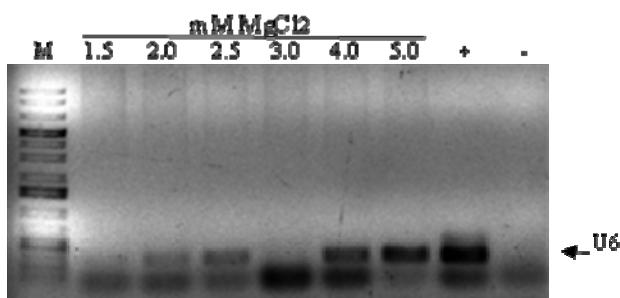


Figura 32. PCR de estandarización de la concentración de MgCl₂ usando los oligos *U6tet fwd-U6 rvs*. Gel de agarosa, TAE, 0.8%

En el caso del juego de oligos *U6tet fwd-pSU6 rvs*, la reacción se vio restringida a la concentración de 4mM MgCl₂ (Figura 33).

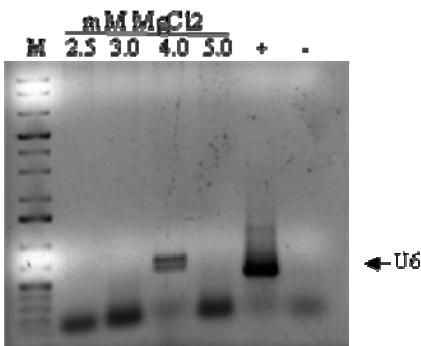


Figura 33. PCR de estandarización de la concentración de MgCl₂ usando los oligos *U6tet fwd-pSU6 rvs*. Gel de agarosa, TAE, 0.8%

Finalmente, en el caso del par de oligos *U6tet fwd-U6TetO1 rvs*, La detección fue un poco más complicada, ya que no se obtuvo resultado bajo ninguna condición de la curva descrita anteriormente, se intentó, además, realizar gradientes de temperatura y concentración de MgCl₂ sin éxito. Se resolvió realizar nuevamente el experimento utilizando el amplicón *U6tet fwd-U6 rvs* como molde en lugar de DNA genómico, así que se repitieron las condiciones de la curva ya establecida, pero usando, esta vez, 5ng del producto de PCR antes obtenido. El resultado de este experimento fue positivo y se encontró que, a excepción de los anteriores ensayos, este es bastante más laxo en cuanto a la concentración de MgCl₂ obteniendo mejores resultados a 2.5mM (Figura 34).

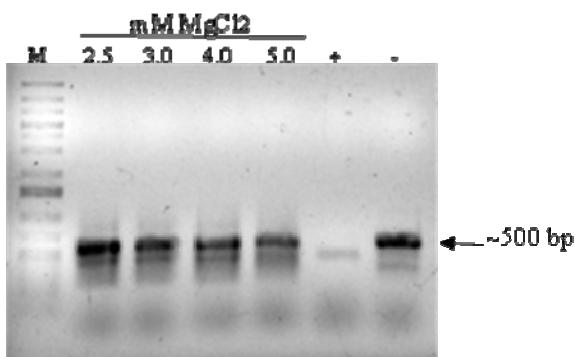


Figura 34. PCR de estandarización de la concentración de MgCl₂ usando los oligos *U6tet fwd-U6TetO1 rvs*. (+) 20ng pSilencer, (-) PCR U6, 1.5mM MgCl₂. Gel de agarosa, TAE, 0.8%

Una vez estandarizadas las condiciones de detección por PCR del promotor U6_{tetO1} en el genoma de las clonas SiHa/TR3 establemente transfectadas con los vectores

de shRNA, se dispuso el primer experimento usando los oligos *U6tet fwd-U6 rvs*, El resultado del experimento puede apreciarse en la figura 35, en donde se puede observar que las clonas utilizadas: pStz/3 y 4, pStz-E6363/2 y 5 y pStz-E757/3 y 4 son positivas.

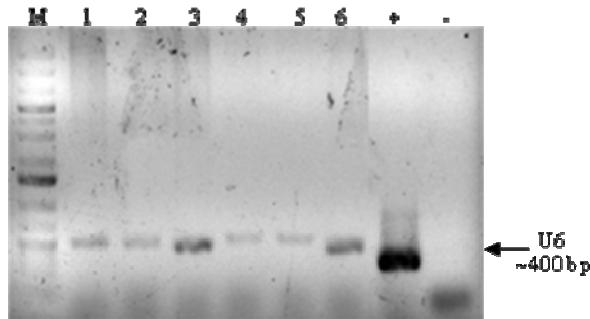


Figura 35. Genotipificación de las clonas estables para las construcciones de shRNA usando los oligos *U6tet fwd-U6 rvs*: pStz-3 (1), pStz-4 (2), E6363-2 (3), E6363-5 (4), E757-3 (5), E757-4 (6), Positivo (pSilencer_{tz}, 10ng), Negativo (-). Gel de agarosa, TAE, 0.8%.

Para verificar que se tratara del promotor U6_{TetO1}, se tomaron 5ng de los amplicones anteriores y se realizó una nueva reacción de PCR usando los primers *U6tet fwd-U6tetO1 rvs* (Figura 36).

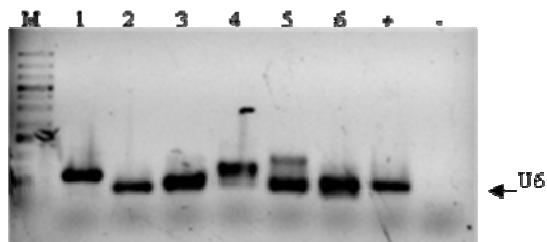


Figura 36. Detección de la secuencia TetO1 en las clonas estables para las construcciones de shRNA usando los oligos *U6tet fwd-U6TetO1 rvs*. El orden de las muestras es el mismo que en la figura 35. Gel de agarosa, TAE, 0.8%

Todas las clonas amplificaron lo cual indica que se encuentra presente la secuencia operadora TetO1, existe alguna disparidad en el tamaño de las bandas, posiblemente debido a un artificio creado por el gel en que se corrieron las muestras, además de que en algunos carriles se pueden observar bandas adicionales debidas, probablemente, a la presencia de amplicones no terminados o dimerizados de la reacción anterior.

Con dos pruebas positivas, solo restaba comprobar que se hubiera integrado el resto de la construcción, para ello, se utilizó el primer *pSU6 rvs* que se une a una región plásmidica río debajo de la construcción de shRNA (Figura 37).

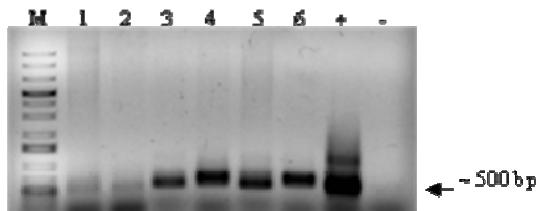


Figura 37. Genotipificación de las clonas estables para las construcciones de shRNA usando los oligos *U6tet fwd-pSU6 rvs*. El orden de las muestras es el mismo que en la figura 35. Gel de agarosa, TAE, 0.8%

El resultado es bastante bueno, pues todas las clonas elegidas resultaron positivas, aunque las muestras de los carriles uno y dos se ven débiles esto es muy probablemente debido a que hubo un error en la cuantificación del DNA.

Con las clonas listas, se procedió a hacer los análisis de expresión de *mdm2*, *p53*, *E6* y *E7* mediante PCR Semi-Cuantitativo.

5. Determinar si Existe un Cambio en la Expresión de *mdm2* Provocado por la Inhibición de *E6* y *E7* en las Células de Cáncer Cervical.

5.1. *Estandarizar las Reacciones de PCR Semi-Cuantitativo.* Una vez que clonas establemente transfectadas con los shRNA fueron genotipificadas, se procedió a la estandarización de las reacciones de PCR Semi-Cuantitativo (PCR-SQ), en este tipo de experimento se busca la cuantificación relativa de la expresión de un gen en comparación a otro de expresión constante, como puede ser un gen de *housekeeping*, es importante notar que en este tipo de experimentos las reacciones de PCR *no* deben estar saturadas, pues de lo contrario el análisis ya no será cuantitativo, pero al mismo tiempo, se debe elegir un punto en que la variación en la cantidad del problema analizado pueda ser apreciable en el gel. De manera usual, se busca amplificar los dos genes en la misma reacción, es decir una reacción de PCR multiplex, pero estas reacciones presentan sus propios problemas, como puede ser la competencia entre los amplicones dando como resultado que uno de

ellos se presente en menor cantidad o se encuentre ausente del todo, por tal razón es necesario estandarizar la reacción multiplex antes de estandarizar la curva de amplificación (Figura 38).

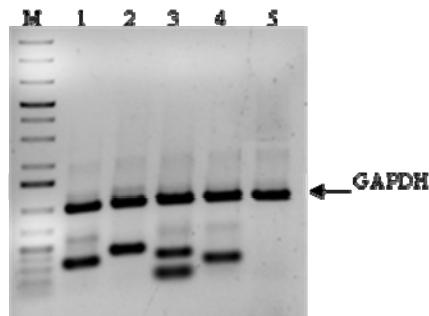


Figura 38. Prueba de PCR multiplex, Mdm2 (1), p53 (2), E6 (3) y E7 (4). En el carril 3 (E6), se pueden notar las dos variantes de E6, Tipo I (~400 bp) y Tipo II (~200 bp). Gel de agarosa, TAE, 0.8%

Una vez resuelto que la amplificación conjunta del gen *housekeeping* y los problemas (Mdm2, p53, E6 y E7) no presentaba mayor reto, se dispuso a estandarizar la curva de amplificación para cada uno de los genes; las gráficas representan el valor de la media obtenida de tres a cuatro experimentos (Figuras 39-42).



Figura 39. Curva de estandarización para determinar el ciclo en que se hará el ensayo de semi-cuantificación de la expresión de Mdm2. En la gráfica, la línea de color negro representa la curva de amplificación de GAPDH, mientras que la línea de color azul representa la de mdm2.

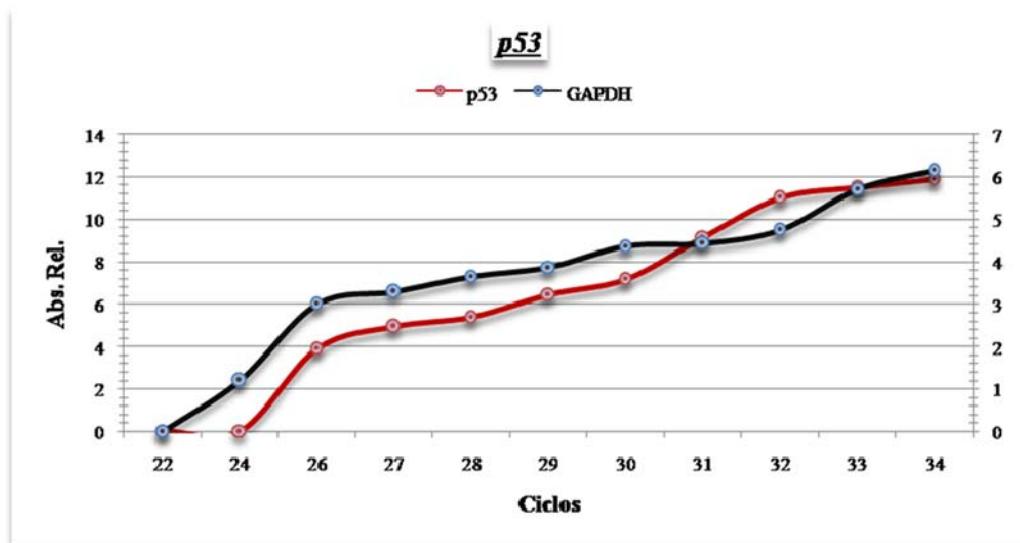


Figura 40. Curva de estandarización para determinar el ciclo en que se hará el ensayo de semi-cuantificación de la expresión de p53. En la gráfica, la línea de color negro representa la curva de amplificación de GAPDH, mientras que la línea de color rojo representa la de p53.

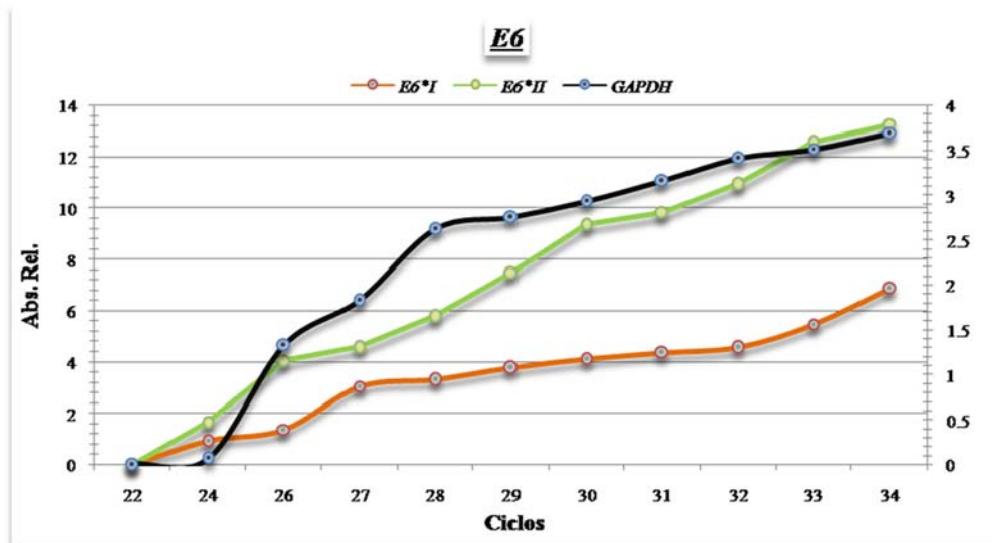


Figura 41. Curva de estandarización para determinar el ciclo en que se hará el ensayo de semi-cuantificación de la expresión de E6. En la gráfica, la línea de color negro representa la curva de amplificación de GAPDH, la línea de color naranja representa la de E6*I y la linea de color verde representa la curva de E6*II.

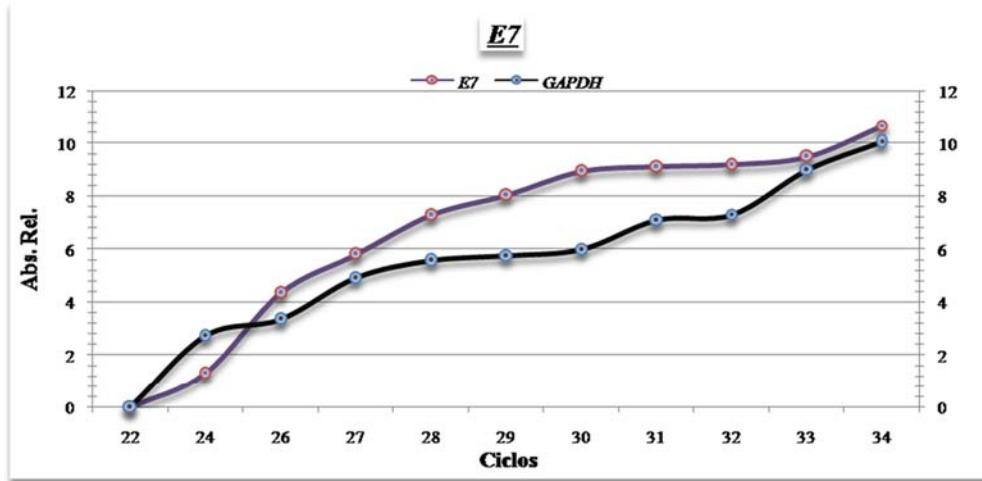


Figura 42. Curva de estandarización para determinar el ciclo en que se hará el ensayo de semi-cuantificación de la expresión de E7. En la gráfica, la línea de color negro representa la curva de amplificación de GAPDH, mientras que la línea de color púrpura representa la de E7.

Según los resultados de las curvas obtenidas, los ciclos utilizados para semi-cuantificación fueron: ciclo 27 para Mdm2, ciclo 28 para p53, y ciclo 25 para E6 y E7. Con los ciclos de amplificación determinados, el siguiente paso era analizar los resultados obtenidos de las clonas establemente transfectadas con los vectores de RNA de interferencia.

5.2. Analizar el Efecto de Silenciamiento Post-Transcripcional de E6 y E7 (HPV-16) por medio de RNAi en la Expresión de mdm2 por medio de PCR Semi-Cuantitativo. Una vez que se estandarizaron los ciclos en los cuales se haría el análisis semi-cuantitativo para cada uno de los genes, se preparó el experimento de inducción y de manera subsecuente, se extrajo el RNA total usando TRIZOL (INVITROGEN), este RNA se cuantificó usando un espectrofotómetro (EPPENDORF). Se tomaron 4 μ g de cada RNA y se corrieron en un gel de agarosa MOPS 1x para observar la calidad del RNA en base al estado de las sub-unidades ribosomales 28 y 18s (Figura 43).

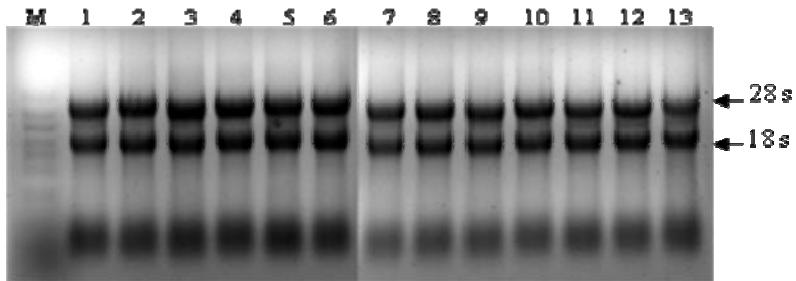


Figura 43. Las diferentes clonas de TR3/shRNA fueron sembradas y se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10 μ g/ml) e incubando por 48 hrs. 4 μ g del RNA total extraido se corrieron en un gel para observar su calidad en base al estado de las bandas de las sub-unidades ribosomales 28 y 18s. (M) Marcador de peso molecular. *pSilencer_{IZ}/3* - (1), *pSilencer_{IZ}/3* + (2), *pSilencer_{IZ}/4* - (3), *pSilencer_{IZ}/4* + (4), *pS_{IZ}-E6/2* - (5), *pS_{IZ}-E6/2* + (6), *pS_{IZ}-E6/5* - (7), *pS_{IZ}-E6/5* + (8), *pS_{IZ}-E7/3* - (9), *pS_{IZ}-E7/3* + (10), *pS_{IZ}-E7/4* - (11), *pS_{IZ}-E7/4* + (12), *SiHa/TR3* (13). Gel de agarosa, MOPS 1x, 0.8%

Después de haber verificado que el RNA se encontrara en buenas condiciones se dispuso la reacción de RT-PCR para obtener cDNA de cada una de las muestras, pero antes de proseguir con el RT-PCR se debía estar seguro de que no había DNA genómico que contaminara las muestras de RNA, por tanto, cada muestra de RNA fue tratada con DNAsaI.

Una vez realizado lo anterior, el experimento de RT-PCR se llevo a cabo y el cDNA obtenido se cuantificó y se realizaron las reacciones de PCR Semi-Cuantitativo usando 27 ciclos para *mdm2*, 28 ciclos para *p53* y 25 ciclos para *E6* y *E7*. Los ensayos se documentaron en forma digital y el análisis densitométrico se realizó usando el programa *Gel Pro Analyzer 4.0TM*.

La densitometría consiste en la medición de la densidad óptica de un material dado, en este caso, de las bandas obtenidas de los PCR-SQ. Los resultados numéricos, obtenidos en forma de **Absorbancia Relativa**, se capturaron, se normalizó la expresión de los genes analizados contra GAPDH y se calculó la media para cada uno de los tratamientos.

El análisis estadístico se realizó mediante una Prueba “t” de Student, en este tipo de análisis se establece que, sí $p \leq 0.05$, existe entonces una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos que están siendo comparados.

En las gráficas y tablas siguientes se muestran los resultados de la expresión de los genes *mdm2*, *p53*, *E6* y *E7*. Las líneas celulares definen con que vector fue establemente transfectada la línea SiHa/TR3, considerada como el control (C): Mock V. (mock vector) representa las líneas con la construcción *pSilencer_{IZ}*, RNAi-

E6 representa la construcción *pS_{tz}-shRNA/E6363* y RNAi-E7 a la construcción *pS_{tz}-shRNA/E757*. Por otro lado, la abreviación (-) indica que no se aplicó la inducción con tetraciclina mientras que en (+) se aplicó una dosis de tetraciclina (10µg/ml) para inducir la expresión de shRNA. En las gráficas, los valores de las medias obtenidas están representados por colores oscuros mientras que los colores más claros representan el valor de la desviación estándar.

El resultado de cada media graficada fue obtenida de dos clonas diferentes por vector realizando de tres a seis repeticiones (Figuras 44-48 y Tablas 1-5).

Tabla 1. Mdm2

	Mock V. (-)	Mock V. (+)	RNAi-E6 (-)	RNAi-E6 (+)	RNAi-E7 (-)	RNAi-E7 (+)	SiHa/TR3 (C)
media	8.069	8.110	8.728	8.563	8.360	8.219	8.541
σ	1.535	3.048	2.623	2.464	1.476	0.949	0.670
var	1.768	6.971	5.161	4.554	1.633	0.676	0.337
Prueba “t”							
(-)/(C)	0.601			0.898		0.833	
(+)/C)	0.798			0.987		0.601	
(-)/(+)	0.981			0.930		0.879	

Tabla 1. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de Mdm2, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/C] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

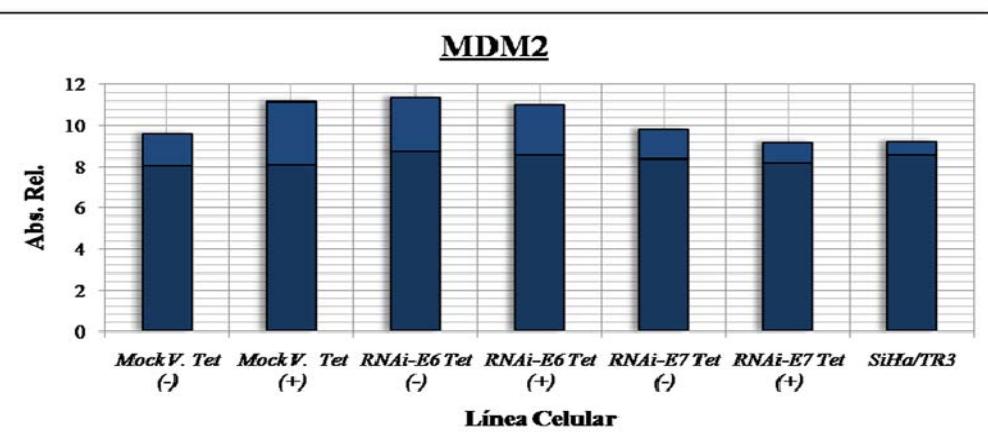


Figura 44. Análisis estadístico de la expresión de MDM2. En la gráfica se presentan los diferentes vectores que fueron transfectados en SiHa/TR3: Mock V. (*pSilencer_{tz}*), RNAi-E6 (*pS_{tz}-shRNA/E6363*) y RNAi-E7 (*pS_{tz}-shRNA/E757*). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10µg/ml).

Tabla 2. p53							
	Mock V. (-)	Mock V. (+)	RNAi-E6 (-)	RNAi-E6 (+)	RNAi-E7 (-)	RNAi-E7 (+)	SiHa/TR3 (C)
media	8.959	9.103	11.227	10.866	7.860	8.045	10.015
σ	2.922	1.587	3.167	3.083	3.658	4.006	4.163
var	7.473	2.205	8.779	8.319	11.714	14.043	15.168
Prueba "t"							
	Mock V.		RNAi-E6		RNAi-E7		
(-)/(C)	0.567		0.523		0.290		
(+)/(C)	0.576		0.649		0.351		
(-)/(+)	0.904		0.820		0.924		

Tabla 2. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de p53, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/(C)] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

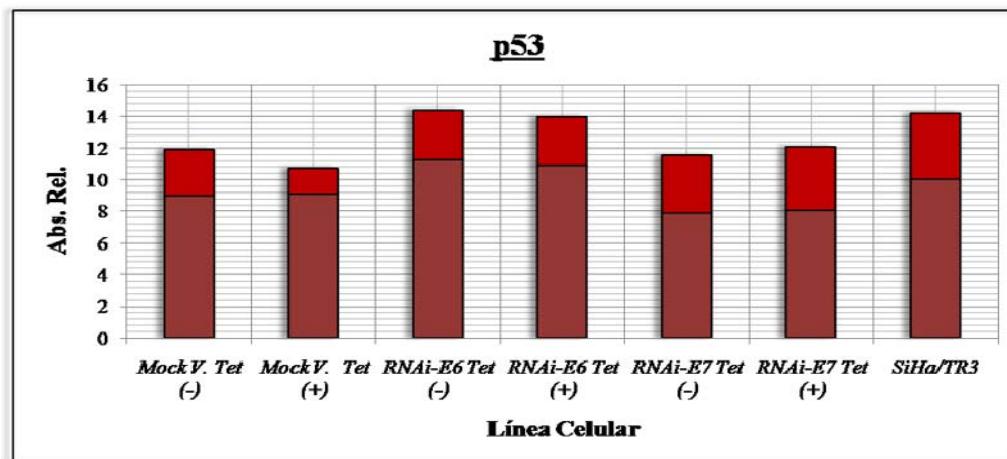


Figura 45. Análisis estadístico de la expresión de p53. En la gráfica se presentan los diferentes vectores que fueron transfectados en SiHa/TR3: Mock V. (*pSilencer*_{Tet}), RNAi-E6 (*pSilencer-shRNA/E6363*) y RNAi-E7 (*pSilencer-shRNA/E757*). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10μg/ml).

Tabla 3. E6*I							
	Mock V. (-)	Mock V. (+)	RNAi-E6 (-)	RNAi-E6 (+)	RNAi-E7 (-)	RNAi-E7 (+)	SiHa/TR3 (C)
media	11.113	9.763	16.035	12.224	12.407	9.515	11.343
σ	2.266	2.573	2.419	2.960	2.920	1.948	1.789
var	4.402	5.678	4.877	7.305	5.685	2.531	2.745
Prueba "t"							
	Mock V.		RNAi-E6		RNAi-E7		
(-)/(C)	0.837		0.003		0.603		
(+)/C)	0.210		0.542		0.244		
(-)/(+)	0.318		0.035		0.236		

Tabla 3. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de E6*I, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/C)] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

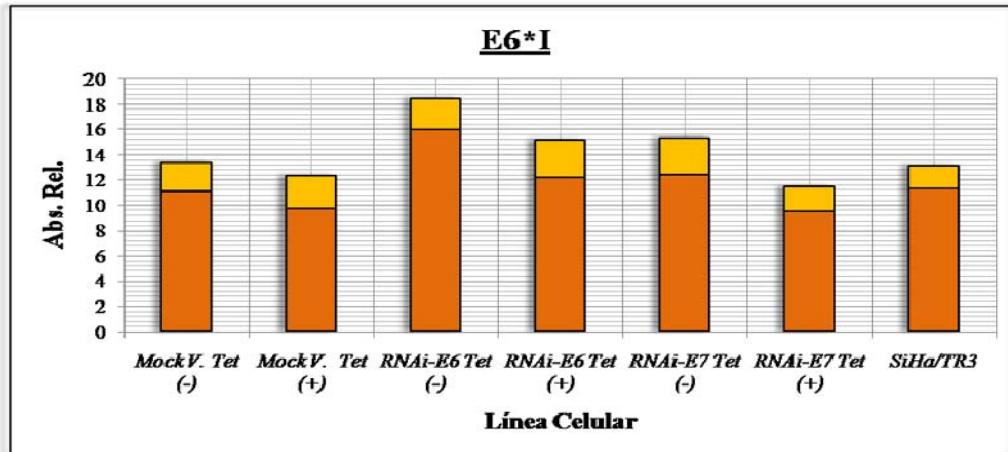


Figura 46. Análisis estadístico de la expresión de E6*I. En la gráfica se presentan los diferentes vectores que fueron transfecados en SiHa/TR3: Mock V. (*pSilencer*_E), RNAi-E6 (*pS*_E-shRNA/E6363) y RNAi-E7 (*pS*_E-shRNA/E757). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10μg/ml).

Tabla 4. E6*II							
	Mock V. (-)	Mock V. (+)	RNAi-E6 (-)	RNAi-E6 (+)	RNAi-E7 (-)	RNAi-E7 (+)	SiHa/TR3 (C)
media	13.517	13.505	17.726	14.692	12.253	12.040	15.398
σ	2.449	3.164	1.519	1.855	4.267	0.822	1.384
var	4.499	7.509	1.845	2.754	13.656	0.507	1.532
Prueba "t"							
(-)/(C)	0.234		RNAi-E6		RNAi-E7		
(+)/C)	0.328		0.035		0.239		
(-)/(+)	0.995		0.516		0.003		
			0.023		0.927		

Tabla 4. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de E6*II, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/C)] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

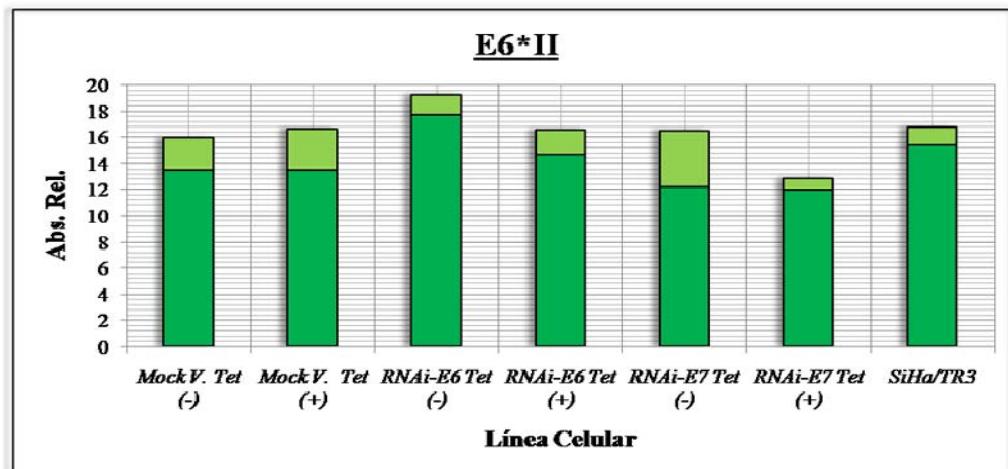


Figura 47. Análisis estadístico de la expresión de E6*II. En la gráfica se presentan los diferentes vectores que fueron transfecados en SiHa/TR3: Mock V. (*pSilencer*_E), RNAi-E6 (*pS*_E-shRNA/E6363) y RNAi-E7 (*pS*_E-shRNA/E757). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10μg/ml).

Tabla 5. E7							
	Mock V. (-)	Mock V. (+)	RNAi-E6 (-)	RNAi-E6 (+)	RNAi-E7 (-)	RNAi-E7 (+)	SiHa/TR3 (C)
media	20.983	19.210	23.853	25.027	20.527	17.986	26.306
σ	6.377	6.970	6.277	6.325	4.729	4.081	2.358
var	32.535	38.864	31.524	32.014	17.898	13.324	4.449
Prueba “t”							
(-)/(C)	0.139			0.449		0.051	
(+)/(-)	0.084			0.689		0.006	
(-)/(+)	0.685			0.775		0.390	

Tabla 5. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de E7, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/(-)] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

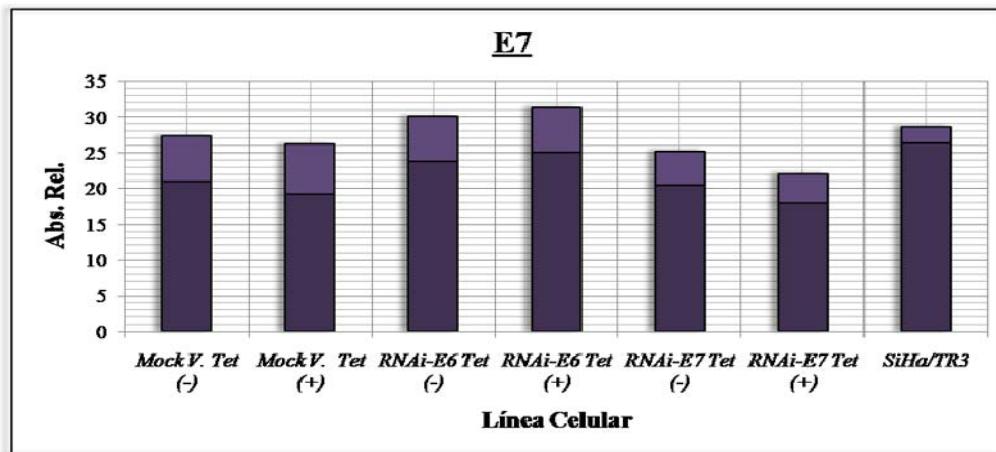


Figura 48. Análisis estadístico de la expresión de E7. En la gráfica se presentan los diferentes vectores que fueron transfectados en SiHa/TR3: Mock V. (*pSilencer_L*), RNAi-E6 (*pS_L-shRNA/E6363*) y RNAi-E7 (*pS_L-shRNA/E757*). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10 µg/ml).

El efecto de silenciamiento por RNAi es altamente específico y se pudo observar que el silenciamiento de cualquiera de los oncogenes no afecta la expresión de los demás genes analizados a excepción de *E7*, cuyo silenciamiento altera los niveles de expresión de *E6*, por otro lado, se decidió analizar el patrón de expresión de los genes ya analizados silenciando, ahora, a *mdm2*.

Para lograr esto, se diseño la secuencia de RNAi 5'-CGCCACAAATCTGATAGTA-3'. Esta secuencia es complementaria al mRNA de *mdm2* en la posición 856 y se clonó en el vector *pSilencer_L* en la manera descrita en el punto 2.1 obteniendo así el vector *pS_L-shRNA/MDM2856*. Se crearon las líneas establemente transfectadas (punto 4.1) y se genotipificaron (punto 4.2).

Una vez con las clonas estables se realizó el ensayo de inducción, extracción de RNA total, RT-PCR y PCR-SQ. Los resultados obtenidos fueron analizados por densitometría, se graficaron las medias de cada tratamiento y se sometieron al análisis estadístico utilizando la Prueba “t” de Student (Figuras 49-53 y Tablas 6-10).

Tabla 6. Mdm2			
	RNAi-Mdm2 (-)	RNAi-Mdm2 (+)	SiHa/Tr3 (C)
media	3.671	3.324	9.952
σ	0.429	0.754	0.392
var	0.138	0.426	0.115
Prueba “t”			
	RNAi-Mdm2		
(-)/(C)	7.050E-07		
(+)/C)	4.233E-05		
(-)/(+)	0.461		

Tabla 6. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de Mdm2 en las clonas tratadas con RNAi-Mdm2, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/C] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

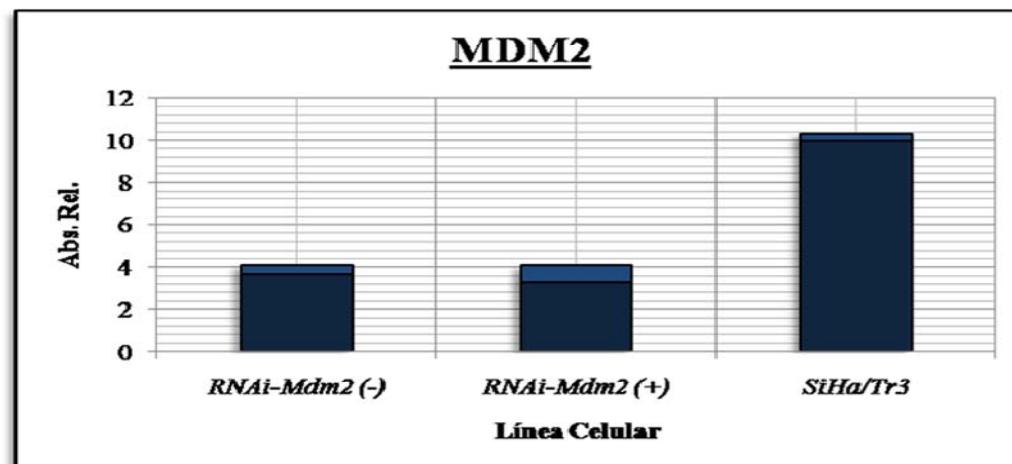


Figura 49. Análisis estadístico de la expresión de MDM2. En la gráfica se presenta el vector que fue transfectado en SiHa/TR3: RNAi-Mdm2 (pS_e -shRNA/MDM2856). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10 μ g/ml).

Tabla 7. p53			
	RNAi-Mdm2 (-)	RNAi-Mdm2 (+)	SiHa/Tr3 (C)
media	6.421	6.216	2.771
σ	0.596	1.115	0.565
var	0.284	1.021	0.255
Prueba “t”			
	<i>RNAi-Mdm2</i>		
(-)/(C)	9.088E-06		
(+)/(C)	0.0004		
(-)/(+)	0.704		

Tabla 7. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de p53 en las clonas tratadas con RNAi-Mdm2, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/C)] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

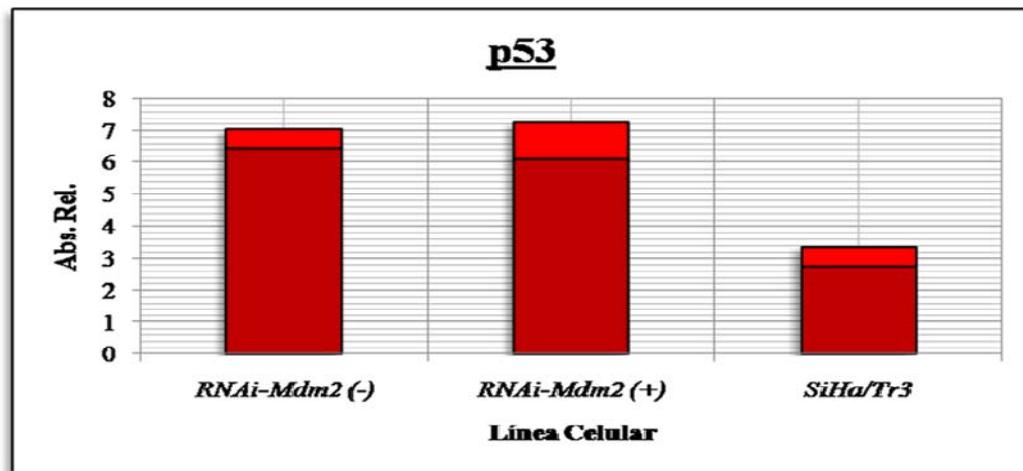


Figura 50. Análisis estadístico de la expresión de p53. En la gráfica se presenta el vector que fue transfectado en SiHa/TR3: RNAi-Mdm2 (*pS_c-shRNA/MDM2856*). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10 μ g/ml).

Tabla 8. E6*I			
	RNAi-Mdm2 (-)	RNAi-Mdm2 (+)	SiHa/Tr3 (C)
media	10.923	11.145	18.444
σ	0.709	0.693	1.204
var	0.402	0.384	1.159
Prueba “t”			
	<i>RNAi-Mdm2</i>		
(-)/(C)	1.134E-05		
(+)/C)	1.458E-05		
(-)/(+)	0.630		

Tabla 8. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de E6*I en las clonas tratadas con RNAi-Mdm2, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/C)] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

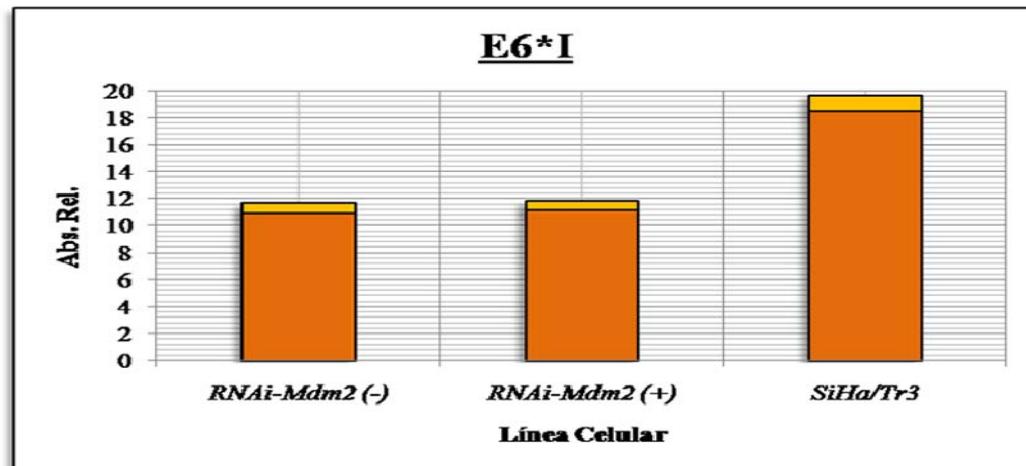


Figura 51. Análisis estadístico de la expresión de E6*I. En la gráfica se presenta el vector que fue transfectado en SiHa/TR3: RNAi-Mdm2 (pS_z -shRNA/MDM2856). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10 μ g/ml).

Tabla 9. E6*II			
	RNAi-Mdm2 (-)	RNAi-Mdm2 (+)	SiHa/Tr3 (C)
media	16.670	17.928	25.548
σ	2.651	3.057	3.110
var	5.272	7.012	7.257
Prueba "t"			
	RNAi-Mdm2		
(-)/(C)	0.001		
(+)/C)	0.012		
(-)/(+)	0.080		

Tabla 9. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba "t" obtenidos de E6*II en las clonas tratadas con RNAi-Mdm2, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/C)] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

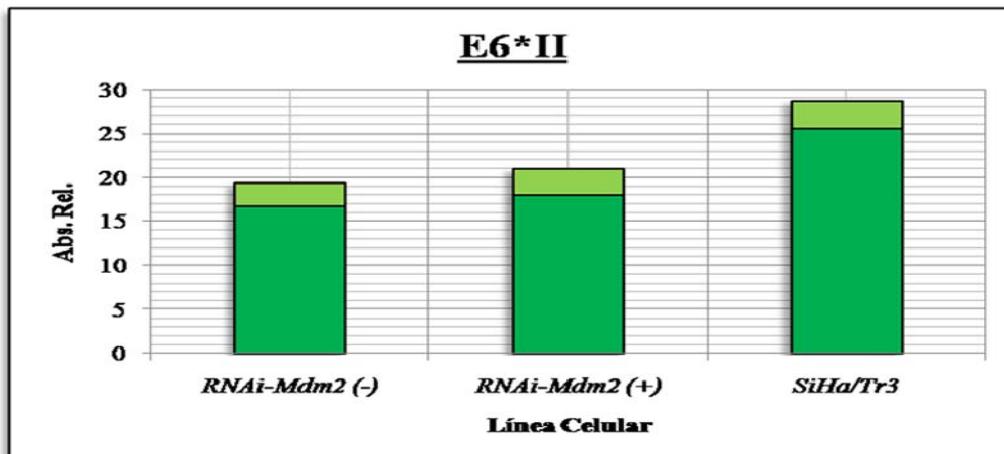


Figura 52. Análisis estadístico de la expresión de E6*II. En la gráfica se presenta el vector que fue transfectado en SiHa/TR3: RNAi-Mdm2 (pS_z -shRNA/MDM2856). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10 μ g/ml).

Tabla 10. E7			
	RNAi-Mdm2 (-)	RNAi-Mdm2 (+)	SiHa/Tr3 (C)
media	8.958	6.566	14.475
σ	1.309	2.024	1.324
var	15.637	2.732	1.168
Prueba "t"			
	RNAi-Mdm2		
(-)/(C)	0.006		
(+)/(C)	0.007		
(-)/(+)	0.172		

Tabla 10. Se presentan los valores de la media, desviación estándar, varianza y análisis de la Prueba “t” obtenidos de E7 en las clonas tratadas con RNAi-Mdm2, los símbolos en la tabla representan: negativo vs. control [(-)/(C)], positivo vs. control [(+)/(C)] y negativo vs. positivo [(-)/(+)]. Los valores se consideran significativamente diferentes si $p \leq 0.05$.

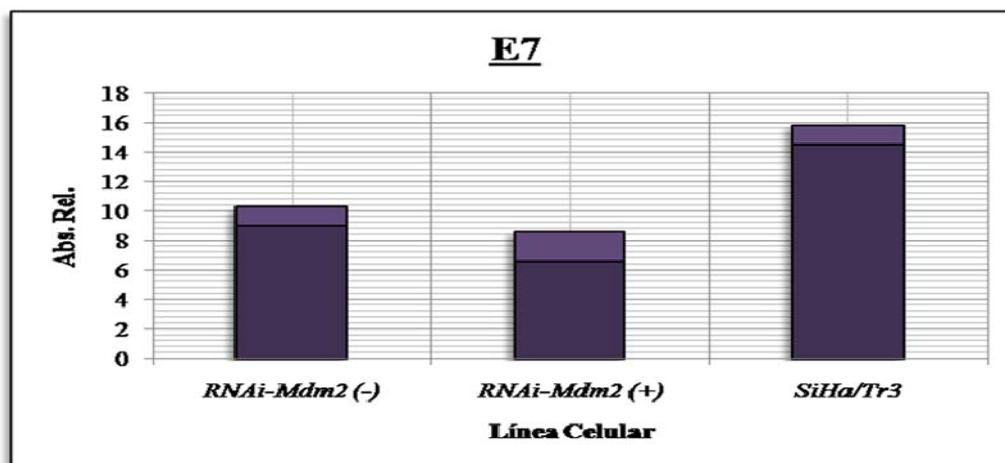


Figura 53. Análisis estadístico de la expresión de E7. En la gráfica se presenta el vector que fue transfectado en SiHa/TR3: RNAi-Mdm2 (pS_e -shRNA/MDM2856). (-) representa los ensayos negativos y (+) representa los ensayos donde se indujo la expresión de shRNA aplicando tetraciclina (10 μ g/ml).

Obtenidos los resultados de los PCR-SQ de las clonas de *shRNA-mdm2*, resultó inesperado que los niveles de todos los genes se vieran afectados comparados con el control, aún cuando no se había inducido la expresión de RNAi aplicando tetraciclina, para tratar de explicar este fenómeno se buscó observar el nivel de expresión de la proteína TetR en las líneas celulares con shRNA.

Se preparó el experimento de RT-PCR para detectar TetR usando el cDNA de cada uno de los tratamientos, este experimento se realizó en forma similar al descrito en el punto 3.3 (Figura 54).

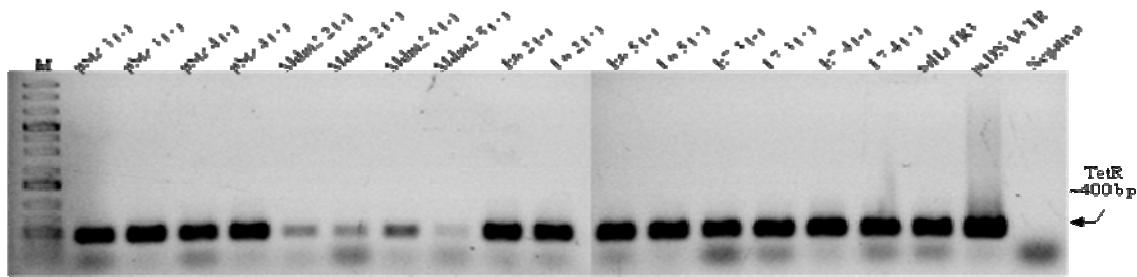


Figura 54. RT-PCR para el análisis de la expresión de la proteína de represión TetR en las clonas estables de RNAi. Gel de agarosa TAE 1.0%.

En la figura anterior se puede apreciar que la expresión de TetR se encuentra notablemente disminuida en las clonas de *shRNA-mdm2*, el por qué de esto puede solo ser especulado, ya que puede deberse a alguna mutación del gen TetR ó a algún efecto de la expresión del *shRNA-mdm2*. En todo caso, en base a este resultado podemos definir que el patrón de la expresión de los genes analizados tanto en los ensayos de inducción, como en los negativos para ésta, es debido a la baja expresión de la proteína de represión TetR y por tanto, la expresión constitutiva del *shRNA-mdm2*.

DISCUSIÓN

En el análisis estadístico de la expresión de *mdm2* podemos observar que durante la inhibición de los oncogenes *E6* y *E7* los niveles de *mdm2* permanecen sin diferencia significativa entre los tratamientos y comparados con el control (SiHa/TR3) al igual que en todos los casos de *p53*.

Sin embargo, al realizar los análisis sobre la expresión de *E6*, se observa un cambio en la expresión de éste en las muestras tratadas y sin tratar. En el caso de *E6 Tet (-)*, la expresión, tanto de *E6*I* como *E6*II* se vio aumentada de forma significativa, ***p=0.003*** (*E6*I*) y ***p=0.035*** (*E6*II*) en comparación al control, este aumento es de ~41% (*E6*I*) y ~15% (*E6*II*). Por otro lado, en el caso de *E6 Tet (+)*, no existe una diferencia significativa en comparación al control [***p=0.542*** (*E6*I*) y ***p=0.516*** (*E6*II*)], sin embargo, si existe una diferencia significativa entre los tratamientos [*E6 Tet (-)* vs. *E6 Tet (+)*], donde ***p=0.035*** (*E6*I*) y ***p=0.023*** (*E6*II*), lo que representa una reducción de la expresión de ~24% (*E6*I*) y de ~18% (*E6*II*). El por qué la expresión de *E6* aumentó en manera significativa respecto al control en los casos no tratados podría explicarse en el hecho de que el sistema *tet-on/tet-off* no exhibe una represión total del gen controlado por el operador *TetO*, lo cual pudo ocasionar que al expresarse los shRNA-E6 de manera basal y amenazara la preservación del estado maligno de la célula, la expresión de *E6* aumentó para conservar su estado cancerígeno, pues de lo contrario, acorde a la literatura, la disminución en la expresión de cualquiera de los oncogenes precede a un arresto en el crecimiento ó a la apoptosis (Van Knebel-Doeberitz *et al.*, 1992; Hietanen *et al.*, 2000).

En el caso de *E7 Tet (-)*, la expresión de *E6* no cambió de forma significativa en comparación al control ni entre los tratamientos, pero, en el caso de *E7 Tet (+)*, aunque ***p=0.24***, existe una disminución de ~16% (*E6*I*) y de ~22% (*E6*II*) donde ***p=0.003*** representa una diferencia significativa con respecto al control. El hecho de que la expresión de *E6* se vea afectada en las células donde se inhibe la expresión de *E7* no es

completamente inesperado, pues, después de todo, la expresión de ambos oncogenes se encuentra estrechamente relacionada ya que, incluso, se puede dar en forma bi-cistrónica.

En el análisis de la expresión de *E7*, no se observan cambios significativos entre los tratamientos ni comparados con el control más que en los casos donde se inhibe directamente a *E7*. En el caso de *E7 Tet (-)* no existe una diferencia significativa comparado contra *E7 Tet (+)* ($p= 0.390$), sin embargo, si existe una diferencia significativa entre *E7 Tet (-)* y el control, donde $p=0.051$ representa una disminución de la expresión de *E7* de ~22%. En el caso de *E7 Tet (+)*, $p=0.006$, lo cual presenta una diferencia en la expresión de ~32% comparado con el control.

En base a estos resultados podemos afirmar que la inhibición de los oncogenes *E6* y *E7* no afecta en ninguna manera la expresión de *mdm2* y *p53*. Además, es necesario notar, que es posible que el bajo índice de silenciamiento de los oncogenes *E6* y *E7* pueda ser debido a una falla en la inducción de la expresión de los shRNA al aplicar la tetraciclina, ya sea porque no se aplicó la suficiente cantidad del inductor ó por sobre-expresión del represor.

Por el contrario, al realizar los análisis de los genes estudiados en este proyecto en las células donde se inhibe la expresión de *mdm2*, se puede observar un claro cambio en la expresión de todos los genes comparando los tratamientos contra el control (Tabla 11).

	<i>RNAi-mdm2</i>	<i>RNAi-mdm2</i>
	<i>Tet (-)</i>	<i>Tet (+)</i>
<i>mdm2</i>	-63.1%	-66.6%
<i>p53</i>	+131.7%	+124.3%
<i>E6*I</i>	-40.8%	-39.6%
<i>E6*II</i>	-34.7%	-29.8%
<i>E7</i>	-38.1%	-54.7%

Tabla 11. Diferencia en la expresión de los genes analizados en *shRNA-mdm2* comparados con el control, representada en porcentaje.

La clara diferencia en el valor de las medias de los tratamientos comparados con el control, son respaldados con diferencias estadísticamente significativas. El cambio en el patrón de expresión en todos los casos de inhibición de *mdm2*, provocado principalmente

por la falla en la expresión de TetR, lo que ocasionó la expresión constitutiva del *shRNA-mdm2*, resultó en algo que no se esperaba en lo absoluto, pues los niveles de *p53* solo se ven incrementados cuando se inhibe la expresión de *mdm2* en células HPV negativas y no en células HPV positivas (Traidej *et al.*, 2000), cabe mencionar que en dicho trabajo se buscó el silenciamiento, por RNA antisentido, de *E6AP* y *mdm2*, lo cual puede ser realmente importante, pues quien tiene afinidad por P53 es E6, E6AP sirve como una ubiquitin E3 ligasa, es decir, el sustrato que será directamente degradado en la vía de ubiquitinación, mientras que MDM2 tiene afinidad por P53 y sirve, al mismo tiempo, como E3 ubiquitin ligasa, sin mencionar que los métodos de silenciamiento por RNA antisentido y RNAi son completamente diferentes; donde un RNA-AS impide solo la entrada de su mRNA complementario en el ribosoma ó la producción de proteínas truncadas, el RNAi promueve su completa degradación.

El cambio en la expresión de *E6* y *E7* también fue sorpresivo, pues al estar sustituido MDM2 por E6 en la vía de degradación de P53 (Hengstermann *et al.*, 2001), se esperaría que los niveles de *mdm2* se modificaran al inhibir la expresión de *E6*, es decir, que aumentara en respuesta a la estabilización y acumulación de P53 en el núcleo ó que disminuyera en respuesta al mismo estímulo y por consiguiente condujera, más fácilmente, a la célula a un estado de arresto en el crecimiento ó de apoptosis, no lo contrario.

No obstante, es un efecto que debe estudiarse a fondo para tratar de dilucidar, en su entereza, la relación entre la expresión de *mdm2* con la de los oncogenes *E6* y *E7*.

CONCLUSIONES

Ha sido reportado que la inhibición de E6 provoca un aumento en la expresión de *mdm2* en células de cáncer de pulmón infectadas con HPV (Cheng *et al.*, 2007); pero en el presente trabajo se encontró que la inhibición de la expresión, por RNAi, de los oncogenes *E6* y *E7* (HPV-16) en una línea celular de cáncer cervical no tiene efecto alguno sobre el patrón de expresión de *mdm2* ni de *p53*.

Por otro lado, al haber obtenido líneas celulares establemente transfectadas con RNAi-Mdm2, se puede concluir que, a pesar de que la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* se vio disminuida y se pudo apreciar un aumento en la expresión de *p53*, esto no es suficiente para inducir un efecto de apoptosis o arresto celular en las células tratadas con RNAi-Mdm2.

Si bien el papel de Mdm2 en una célula infectada por HPV no ha sido determinado por completo, sí se ha encontrado que el silenciamiento conjunto de *E6* y *mdm2*, incluyendo algunos otros antagonistas de *p53*, puede potenciar el efecto de apoptosis en éstas células (Koivusalo *et al.*, 2006), pero el por qué de ello no queda suficientemente claro.

En este trabajo se encontró que el silenciamiento de *mdm2* por RNAi en una línea celular de cáncer cervical provoca una disminución en los niveles de mRNA de los genes *E6* y *E7* (HPV-16), al mismo tiempo, se muestra un aumento en la expresión de *p53*, si este incremento es debido a la disminución de E6 o un resultado directo del silenciamiento de *mdm2* queda, aún, por ser determinado. Más aún, los cambios observados en la expresión de *E6* y *E7* sugieren una probable relación entre la expresión de estos oncogenes y Mdm2 que aun debe ser esclarecida.

LITERATURA CITADA

- Barak, Y, Juvent, L, Laffiner, R. Oren, M. 1993. *mdm2 expression is induced by wild type p53 activity.* Embo J. 12(2):461-468.
- Bartkova J, Gron B, Dabelsteen E, Bartek J. 2003. *Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing.* Archives of Oral Biology, 48(2): 125-132.
- Baseman JG, Koutsy LA. 2005. *The epidemiology of human papillomavirus infections.* Journal of Clinical Virology, 32(1): 16-24.
- Bass B.L. 2000. *Double-stranded RNA as a template for gene silencing.* Cell 101(3):235-238.
- Beer-Romero P, Glass S, Rolfe M. 1997. *Antisense targeting of E6AP elevates p53 in HPV-infected cells but not in normal cells.* Oncogene, 14(5):595-602.
- Berezutskaya E, Yu B, Morozov A, Raychaudhuri P, Bagchi S. 1997. *Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein.* Cell Growth Differ. 8(12):1277-1286.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. 1995. *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group.* J. Natl.Cancer Inst. 87(11):796-802.
- Butz K, Whitaker N, Denk C, Ullmann A, Geisen C, Hoppe-Seyler F. 1999. *Induction of the p53-target gene GADD45 in HPV-positive cancer cells.* Oncogene, 18(14):2381-2386.
- Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. 1995. *Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA.* Nature, 374(6520): 386-388.
- Chen J, Wu X, Lin J, Levin AJ. 1996. *mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein.* Mol. Cell. Biol. 16(5):2445-2452.
- Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J. 1998. *Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage.* Proc. Natl Acad. Sci. 95(1):195-200.
- Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, Chen CY, Lee H. 2007. *Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation.* Cancer Res, 67(22):10686-93.

- Das SK, Hashimoto T, Shimizu K, Yoshida T, Sakai T, Sowa Y, Komoto A, Kanazawa K. *Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1.* 2005. *Biochim Biophys Acta*, 1726(3):328-35.
- de Jager SM, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Murray JA. 2005. *The developmental context of cell-cycle control in plants.* *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(3): 385-396.
- De Veylder L, Joubes J, Inze D. 2003. *Plant cell cycle transitions.* *Current Opinion in Plant Biology*, 6(6): 536-543.
- Diederichs S, Jung S, Rothenberg SM, Smolen GA, Mlody BG, Haber DA. 2008. *Coexpression of Argonaute-2 enhances RNA interference toward perfect match binding sites.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(27): 9284-9.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. 1992. *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours.* *Nature*, 356(6366):215-221.
- Dowhanick JJ, McBride, AA, Howley PM. 1995. *Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein.* *J. Virol.* 69(12):7791-7799.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. 1989. *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.* *Science*, 243(4893):934-7.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. *Duplexes of 21±nucleotide RNAs mediate RNA Interference in cultured mammalian cells.* *Nature*, 411(6836):494-8.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. 1993. *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.* *Cell*, 75(4):817-825.
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. 2000. *AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(21):11650-11654.
- Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL. 1991. *Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line.* *EMBO J.* 10(6):1565-1569.
- Fields S, Jang SK. 1990. *Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein.* *Science*, 249(4972):1046-1049.
- Finlay CA. 1993. *The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth.* *Mol Cell Biol.*, 13(1):301-306.

- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. 1989. *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation.* Cell, 57(7):1083-1093.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Nature, 391(6669):806-811.
- Fire, A. 1999. *RNA-triggered gene silencing.* Trends Genet. 15(9):358-363.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. 1997. *Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein.* Genes Dev. 11(16):2090-100.
- Gil J, Esteban M. *Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action.* Apoptosis. 5(2):107-14.
- Goodwin EC, DiMaio D. 2000. *Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(23):12513-12518.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. 1994. *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis.* Cancer Res. 54(18):4855-4878.
- Greenblatt RJ. 2005. *Human papillomaviruses: Diseases, diagnosis, and a possible vaccine.* Clinical Microbiology Newsletter, 27(18), 139-145.
- Greenstone HL, Nieland JD, de Visser KE, De Bruijn ML, Kirnbauer R, Roden RB, Lowy DR, Kast WM, Schiller JT. 1998. *Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(4):1800-1805.
- Guo S, Kemphues KJ. 1995. *par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed.* Cell, 81(4):611-620.
- Hall AH, Alexander KA. 2003. *RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells.* Journal of Virology, 77(10):6066–6069.
- Harper JW, Adamo GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. 1993. *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.* Cell, 75(4): 805-816.
- Haupt Y, Barak Y, Oren M. 1996. *Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2.* EMBO J. 15(7):1596-1606.

- Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. 2001. *Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells.* Proc Natl Acad Sci USA 98(3):1218-23.
- Henriksen JR, Løkke C, Hammerø M, Geerts D, Versteeg R, Flaegstad T, Einvik C. 2007. Comparison of RNAi efficiency mediated by tetracycline-responsive H1 and U6 promoter variants in mammalian cell lines. Nucleic Acids Res. 35(9):e67
- Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP. 2000. *Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules.* Proc. Natl. Acad. Sci USA, 97(15):8501-8506.
- Hwang ES, Naeger LK, DiMaio D. 1996. *Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expression of the bovine papillomavirus E2 gene.* Oncogene, 12(4):795-803.
- Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA. 1994. *Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice.* Current Biol. 4(1):1-7.
- Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J. 2001. *Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Genome Biology, 2(1):0002.1-0002.10.
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr. 1992. *A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia.* Cell, 71(4):587-597.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. 2003. *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias.* Cell. 115(2):209-16. Erratum in: Cell. 115(4):505.
- Koivusalo R, Mialon A, Pitkänen H, Westermarck J, Hietanen S. 2006. *Activation of p53 in cervical cancer cells by human papillomavirus E6 RNA interference is transient, but can be sustained by inhibiting endogenous nuclear export-dependent p53 antagonists.* Cancer Res, 66(24):11817-24.
- Kooter JM, Matzke MA, Meyer P. 1999. *Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control.* Trends Plant Sci. 4(9):340-347.
- Korenjak M, Brehm A. 2005. *E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development.* Curr Opin Genet Dev. 15(5): 520-527.
- Kubbutat MH, Vousden KH. 1998. *New HPV E6 binding proteins: dangerous liaisons?* Trends Microbiol. 6(5):173-175.
- LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D, Ashkenazi A. 2002. *Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax.* Nature Medicine, 3(8): 274-281.

- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG. 1993. *Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance.* Plant Cell 5(12):1749-1759.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. 2004. *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.* Science, 305(5689):1437-41.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. 1993. *p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes.* Nature, 362(6423):847-849.
- Luo Y, Hurwitz J, Massague J. 1995. *Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1.* Nature, 375(6527):159-161.
- Miyashita L, Reed JC. 1995. *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.* Cell, 80(2):293-299.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. 1992. *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.* Cell, 69(7): 1237 -1245.
- Montes de Oca-Luna R, Wagner DS, Lozano G. 1995. *Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53.* Nature, 378(6553):203-206.
- Montgomery MK, Fire A. 1998. *Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression.* Trends Genet. 14(7):255-258.
- Montgomery MK, Xu S, Fire A. 1998. *RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*.* Proc Natl Acad Sci USA, 95(26):15502-15507.
- Münger K, Howley PM. 2002. *Human papillomavirus immortalization and transformation functions.* Virus Research, 89(2):213–228.
- Noel J.C., Lespagnard L., Fayt I., Verhest A., and Dargent J.L. 2001. *Evidence of human papilloma virus infection but lack of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of uterine cervix: Report of two cases and review of the literature.* Human Pathology, 32(1): 135-138.
- Ohkawa J, Taira K. 2000. *Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter.* Human Gene Therapy, 11(4):577-585.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. 1992. *Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas.* Nature, 358(6381):80-83.

Organización Mundial de la Salud (WHO). <http://www.who.int/en/>

Park DJ, Wilczynski SP, Paquette RL, Miller CW, Koeffler HP. 1994. *p53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma*. Oncogene, 9(1):205-210.

Pim D, Massimi P, Banks L. 1997. *Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth*. Oncogene, 15(3):257-264.

Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. 1993. *Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden*. Int. J Cancer 55(6):891-903.

Rapp L, Chen JJ. 1998. *The papillomavirus E6 proteins*. Biochim Biophys Acta, 1378(1):F1-F19.

Raycroft L, Wu H, Lozano G. 1990. *Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene*. Science, 249(4972):1049-1051.

Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. 2004. *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol. 22(3):326-30.

Sheikh MS, Shao ZM, Hussain A, Fontana JA. 1993. *The p53-binding protein MDM2 gene is differentially expressed in human breast carcinoma*. Cancer Res. 53(14):3226-3228.

Sinal SH, Woods CR. 2005. *Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children*. Seminars in Pediatric Infectious Diseases, 16(4): 306-316.

Smith-McCune K, Kalman D, Robbins C, Shivakumar S, Yuschenkoff L, Bishop JM. 1999. *Intranuclear localization of human papillomavirus 16 E7 during transformation and preferential binding of E7 to the Rb family member p130*. Proc Nat Acad Sci USA, 96(12):6999-7004.

Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M. 2000. *Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes*. Nat Genet. 24(2):180-183.

Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD. 2004. *A protein sensor for siRNA asymmetry*. Science, 306(5700):1377-80.

Traidej M, Chen L, Yu D, Agrawal S, Chen J. 2000. *The roles of E6-AP and MDM2 in p53 regulation in human papillomavirus-positive cervical cancer cells*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10(1):17-27.

Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. 2004. *Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference*. Nucleic Acids Res. 32(3):936-48.

von Knebel Doeberitz M, Rittmuller C, zur Hausen H, Durst M. 1992. *Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA*. Int J Cancer. 51(5):831-834.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M. 2001. *p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development*. Cancer Res. 61(2):608-11.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Vi la luz, por primera vez, un día domingo 18 de septiembre de 1977 a las 6:00 pm, en la Región Lagunera, más propiamente dicho, en la Ciudad de Lerdo de Tejada, Durango. En esta ciudad residí hasta los tres años de edad, cuando mis padres se mudaron a la ciudad vecina de Torreón, Coahuila. Ingresé a la Escuela Primaria Federal Lucio Blanco a los cinco años de edad, graduándome en el año de 1989 mismo en el que ingresé a la Escuela Secundaria Federal #2, terminando mi secundaria en el año de 1992, en este mismo año, en el cual debía cursar mi bachillerato, mi madre observó en mi cierta tendencia al caos por lo cual decidió apartarme de la educación proporcionada por el gobierno e inscribirme en la Preparatoria LUZAC, una escuela privada, en la cual, reprobé el curso de Métodos de Investigación. Mi avidez, desde pequeño, por la lectura y el ambiente proporcionado en mi bachiller, debido en su mayor parte a los maestros tan excelentes que tuve, modificaron mi actitud y me encaminaron hacia el estudio, en particular, de la biología. En el año de 1995 me gradué de la preparatoria y decidí estudiar en la Escuela Superior de Biología, U.J.E.D., de la cual, después de haber reprobado, en 6 ocasiones, el examen final de Genética Avanzada, egresé en el año 2000. Fue durante este mismo año que me inscribí en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, en el programa de Maestría en Ciencias con Especialidad en Genética, al año siguiente obtuve mi título de Licenciatura en Biología y ese mismo año cambié al programa de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología, en este año, 2008, después de mucho tiempo y una cantidad innumerable de contratiempos, aprendizaje, conocimiento, experiencia y aventuras, presento mi examen profesional y continuo mi viaje para encontrar mi destino.