

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE POLIMORFISMOS EN FACTORES
DE TRANSCRIPCION QUE AFECTAN LA EXPRESION
DE GENES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

POR:

LUIS MIGUEL CANSECO AVILA

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO
EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular
e Ingeniería Genética

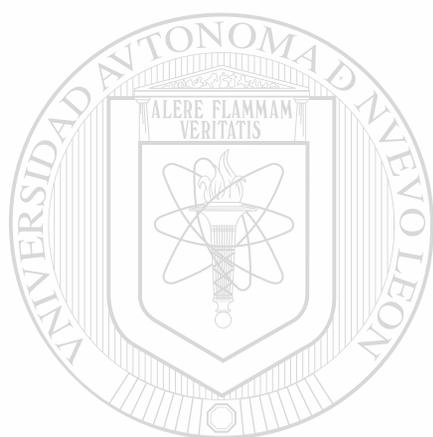
Octubre, 2002

Q.F.B. LUIS MIGUEL CANSILLO AVILLA

Q. 338

R. 280

F. 280

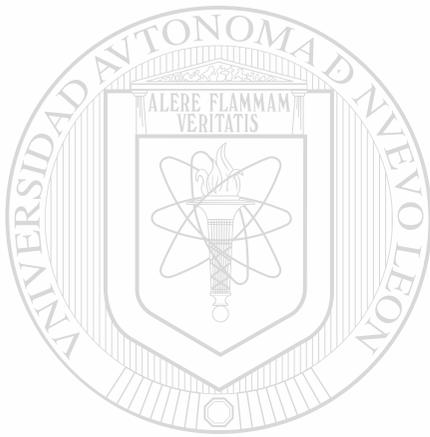


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

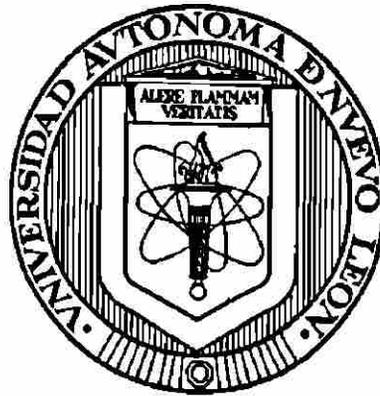
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN FACTORES
DE TRANSCRIPCIÓN QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN DE
GENES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POR:

**DIRECTOR DE INVESTIGACIONES
LUIS MIGUEL CANSECO AVILA**

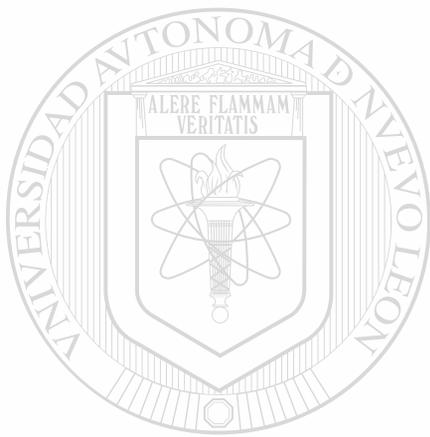
Como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO
EN CIENCIAS** con Especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética

Octubre, 2002

JM
RC280

.U8

C36



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

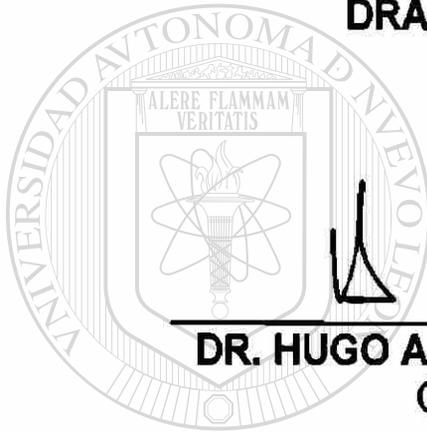


**DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN DE GENES DEL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

Aprobación de la Tesis:



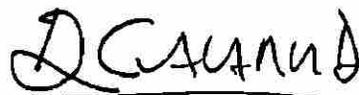
DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

**Y si tuviese profecía, y entendiese
todos los misterios y toda ciencia, y
si tuviese tanta fe como para tras-
ladar montañas, pero no tengo amor,
nada soy.**

1ª Cor: 2

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme fe y esperanza.

A mi madre:

Hermila Avila salgado

Con todo mi amor e infinito agradecimiento.

A mireya:

El amor de mi vida.

A mi familia

En especial a Quique, Freddito, Freddi, tía mari, tío milo, fabi, milo, monse, tío bruno, tía chata, tía jovita, tía nena, marisol, rodrigo y su familia y mis primos.

A mi nueva familia especialmente, Doña Magda, Don Alfredo, Doña nori, Doña marbe, Doña margarita, Don manuel, mis compadres Ever y Pati, Everin, manuelito, alfredo, betito y paquito.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ortiz López mi directora de tesis, por su confianza y apoyo incondicional.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña por su ejemplo de gran capacidad de trabajo y darme la oportunidad de formar parte de la ULIEG.

A los Doctores Herminia Martínez, Agnés Revol y Augusto Rojas por sus consejos y enseñanzas.

A todo el personal de la ULIEG que siempre me ayudaron y su disposición para contribuir al término de este trabajo.

A los Doctores Oscar Vidal Gutiérrez, Ricardo Cerda Flores, Oralia Barbosa, M. en C. Dolores Esquivel Escobedo y T.L.C. Iram Pablo Rodríguez Sánchez por su disposición a colaborar con este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por hacer tan grato el trabajo y su paciencia.

A todas las pacientes que desinteresadamente contribuyeron con su material biológico, para que esta investigación se realizara.

Al programa PAICYT por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y al CONACYT por haberme permitido realizar la maestría en las mejores condiciones

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Página
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
NOMENCLATURA	IV
RESUMEN	VI

CAPITULO	Página
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 El Cáncer de Cervix	1
1.2 Factores Relacionados al CaCU	2
1.2.1 Factores Intrínsecos Asociados al CaCU.	3
1.2.2 Factores Extrínsecos Asociados al CaCU.	3
1.3 El genoma del VPH	5
1.3.1 Región de Control Larga (LCR)	9
1.3 Factores de Transcripción	11
1.3.1 Hélice-Giro-Hélice	11 [®]
1.3.2 Dedos de Zinc	12
1.3.3 Cremalleras de Leucina	13
1.3.4 FT involucrados en CaCU	14
1.3.4.1 Bm-3a y Bm-3b	15
1.3.4.2 Oct1	15
1.3.4.3 YY1	16
1.4 Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP en inglés)	17
1.4.1 SNPs en FT involucrados en enfermedades	19
II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	20
2.1 Justificación	20

2.2	Objetivo General	21
2.3	Objetivos Específicos	21
III.-	ESTRATEGIA GENERAL	22
IV.-	MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1	Área de trabajo, reactivos y equipo	24
4.1.1	Área de trabajo	24
4.1.2	Material Biológico	24
4.1.3	Reactivos químicos	25
4.1.4	Material consumible	26
4.1.5	Equipo	27
4.1.6	Apoyo computacional	28
4.2	Métodos	28
4.2.1	Características de la población de estudio	28
4.2.2	Extracción de RNA	29
4.2.3	Análisis electroforético del RNA	30
4.2.4	Diseño de los oligonucleótidos	30
4.2.5	Reacción de RT	31
4.2.6	PCR	31
4.2.7	Electroforesis en gel de agarosa	33
4.2.8	Purificación de los PA	34
4.2.9	Secuenciación de los PA	34
4.2.10	Análisis de las secuencias nucleotídicas	36
4.2.11	Cambios producidos por SNP en las proteínas	37
4.2.12	Búsqueda de RFLPs para los SNPs encontrados	38
V.-	RESULTADOS	39
5.1	Extracción de RNA	39
5.2	Diseño de Oligonucleótidos	39
5.3	Estandarización de la Reacción de RT-PCR	40
5.4	Amplificación de los dominios de unión de los FT Brm-3a y Brm-3b	46
5.5	Secuenciación de los PA de los FT Brm-3a y Brm-3b	46
5.6	Cambios bioquímicos generados por los SNPs en las proteínas	51
5.7	Análisis por RFLPs de los SNPs encontrados en los FT	51

VI.- DISCUSIÓN	53
VII.- CONCLUSIONES	59
VIII.- PERSPECTIVAS	60
IX.- BIBLOGRAFÍA	61

ANEXOS

Anexo 1.- Cuestionario

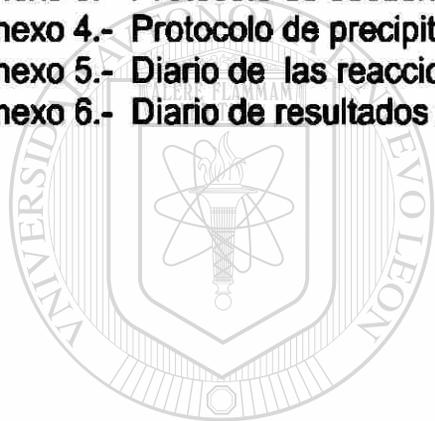
Anexo 2.- Carta de consentimiento

Anexo 3.- Protocolo de secuenciación

Anexo 4.- Protocolo de precipitación con vivid violet

Anexo 5.- Diario de las reacciones de secuenciación

Anexo 6.- Diario de resultados de secuenciación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

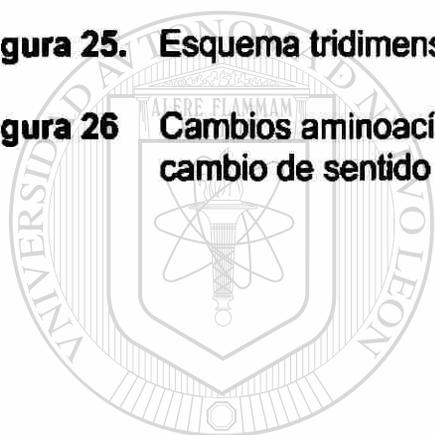


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
Figura 1.	Evolución del cáncer cervicouterino	2
Figura 2.	Modelo del genoma del VPH	7
Figura 3.	Ciclo del VPH	8
Figura 4.	Representación esquemática del LCR del VPH	9
Figura 5.	Esquema de un FT con estructura Hélice-Giro-Hélice	12
Figura 6.	Esquema de un FT con estructura Dedos de Zinc	13
Figura 7.	Esquema de un FT con estructura Cremallera de Leucina	14
Figura 8.	Esquema de la estrategia general del trabajo experimental	23
Figura 9.	Esquema para la purificación de los PA	35
Figura 10.	Esquema del protocolo de secuenciación	36
Figura 11.	Ejemplo de alineamiento de una secuencia problema con la reportada en el GenBank	37
Figura 12.	RNA de sangre periférica en gel de agarosa al 1%	39 ®
Figura 13.	Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para YY1 y Oct1	41
Figura 14.	Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para Brn-3a y Brn-3b	41
Figura 15.	Geles de agarosa al 2% de los PA de YY1, Oct1, Brn-3a y Brn-3b	44
Figura 16.	Geles de agarosa al 2% de los PA de FT Brn-3a y Brn-3b	45
Figura 17.	Amplificación del FT Brn-3a en las muestras	46
Figura 18.	Amplificación del FT Brn-3b en las muestras	47
Figura 19.	Ejemplo de un gel de secuenciación de los FT	48

Figura 20.	Gel de secuenciación del FT Brn-3a donde se muestran polimorfismos	49
Figura 21.	Geles de secuenciación del FT Brn-3b donde se muestran polimorfismos	50
Figura 22.	Análisis por enzimas de restricción para el polimorfismo A858T	52
Figura 23.	Cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones con cambio de sentido en Brn-3a	55
Figura 24.	Esquema tridimensional del FT Brn-3a	56
Figura 25.	Esquema tridimensional del FT Brn-3b	57
Figura 26	Cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones con cambio de sentido en Brn-3b	58



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
Tabla 1. Factores de transcripción celulares que regulan la expresión de genes del VPH	10
Tabla 2. Condiciones iniciales para la RT de los FT	32
Tabla 3. Condiciones iniciales de la PCR para los FT	33
Tabla 4. Condiciones finales para la RT de los FT	42
Tabla 5. Condiciones de amplificación de la PCR para YY1 y Oct1	43
Tabla 6. Condiciones de amplificación de la PCR para Brn-3a y Brn-3b	43
Tabla 7. Polimorfismos encontrados en el FT Brn-3a	48
Tabla 8. Polimorfismos encontrados en el FT Brn-3b	50

NOMENCLATURA

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
RNA _t	Ácido ribonucleico total
VPH	Virus del Papiloma Humano
CaCU	Cáncer Cervico Uterino
LCR	Región Larga de Control
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
URR	Región reguladora río arriba
NCR	Región no codificante
HLA	Antígenos de leucocitos humanos
IFN	Interferón
HTH	Hélice-Giro-Hélice
FT	Factor de Transcripción
PA	Producto amplificado o productos amplificados
a.a.	aminoácido
g	Gramos
h	Hora
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
V	Voltios

Vol	Volumen
X	Veces la concentración
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Buffer compuesto de Trisma base, ácido bórico y EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tretametilenediamina
DEPC	Dietilpirocarbonato
Taq	DNA polimerasa de <u>Thermophylus aquaticus</u>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Retro transcriptasa reversa y PCR
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
ULIEG	Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Presenta: **Luis Miguel Canseco Avila**

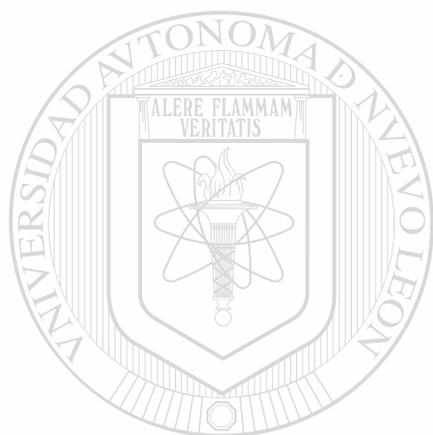
Título del estudio:

DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN DE GENES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

Introducción: La LCR de VPHs que han sido estudiados hasta la fecha contienen elementos potenciadores constitutivos de la transcripción. Estos elementos son esenciales para la expresión inicial de los genes virales inmediatamente después de la infección del virus y podrían ser importantes en una infección inicial viral, en la replicación del virus, en la lisis y transformación celular o para mantener una infección latente. Se han identificado sitios de unión a factores de transcripción (FT) del huésped (Oct1, AP1, Sp1, YY1, NF1, GRE, Brn-3a, Brn-3b, AP2, KRF-1, TFIID y TEF-1) en la región LCR de varios VPHs de alto riesgo, los cuales se han visto que regulan la expresión de los genes virales. En algunos tumores estudiados, la expresión de dichos factores se ve aumentada, como es el caso del factor Brn-3a que está sobre expresado hasta 300 veces en casos de neoplasia intraepitelial III. A la fecha no existen antecedentes sobre estudios de la caracterización de los FT que sugieran cambios en sus secuencias (polimorfismos o mutaciones) que puedan ayudar al desarrollo de neoplasias. **Objetivo:** Determinar polimorfismos en los RNAm de algunos factores de transcripción celulares que afectan la expresión de genes del VPH, en un grupo de mujeres sin CaCU. **Material y Método:** La población de estudio fueron 100 mujeres sanas atendidas en el Hospital Universitario, de Monterrey, N.L., con citología vaginal normal. A estas mujeres se les aisló RNA a partir de una muestra de sangre periférica. Posteriormente, se realizó la RT-PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar los segmentos codificantes de los dominios de unión al DNA de los FT YY1, Oct1, Brn-3a y Brn-3b. Se estandarizaron las condiciones de amplificación para la RT-PCR. Se purificaron los productos amplificados (PA) y se trataron con exonucleasa y fosfatasa alcalina para someterlos a secuenciación. Se compararon las secuencias obtenidas con las reportadas en el GenBak, en busca de polimorfismos. **Resultados:** Cuatro muestras presentaron cambios nucleotídicos para Brn-3a, los cuales dan como resultado mutaciones con cambio de sentido. Dos de las muestras presentan el mismo cambio a.a. (N296Y), una muestra presenta el cambio a.a. C260S y la cuarta muestra presentó tres cambios, uno es silencioso (V285V) y los otros dos son mutaciones con cambio de sentido (V285V, T286A, Q287R). Para Brn-3b se encontraron siete muestras con cambios nucleotídicos. Cinco de ellas presentan el cambio C929G sin alteración el la proteína (S309S). Una muestra presenta la mutación con cambio de sentido N286Y, la cual también se presenta en dos muestras de Brn-3a (N296Y). La última

muestra presenta el cambio de sentido A254G. **Conclusiones:** Polimorfismos en los FT Brn-3a y Brn-3b hasta este trabajo no habían sido descritos, por lo que este estudio se presenta como el inicio de una serie de investigaciones encaminadas a encontrar una posible relación entre estos polimorfismos y patologías como el CaCU, cáncer de mama y tumores neuroendocrinos.

La frecuencia polimorfica encontrada en Brn-3a fue del 5.7% y para Brn-3b fue del 7%. Todos los polimorfismos encontrados en los dos FT se localizaron en la región POU del factor, región muy importante para la unión FT-DNA y además de que la mayoría de estos cambios de sentido son no sinónimos lo cual probablemente cambie las propiedades físico-químicas, la estructura y función de la proteína, por lo que éstos podrían generar un cambio en la afinidad del FT en sus sitios de unión al DNA, provocando una mayor expresión o represión de los genes que están regulando, alterándose así las vías metabólicas y la diferenciación celular, lo cual podría degenerar en neoplasia.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un importante problema de salud, ya que en la población mundial ocupa el segundo lugar como causa de muerte por cáncer, el cuál solo es superado por el cáncer de seno (1,2). Aproximadamente el 2 ó 3% de todas las mujeres mayores de 40 años desarrollarán CaCU, con una incidencia global de 400,000 casos nuevos diagnosticados cada año (3). En México la incidencia de este cáncer es muy alta, constituye el tercer motivo de defunción por tumores malignos en la población general y el primero en el sexo femenino (4, 5).

1.1. El Cáncer de Cérvix.

El CaCU es un proceso que se desarrolla en etapas y la evolución de la carcinogénesis se puede ilustrar con claridad (Figura 1). El cáncer invasivo es precedido por distintas lesiones intra-epiteliales histológica y citológicamente distinguibles. Las neoplasias intraepiteliales cervicales (NICs) forman un espectro de atipias del epitelio caracterizadas por alteraciones de la diferenciación de severidad creciente (5) .

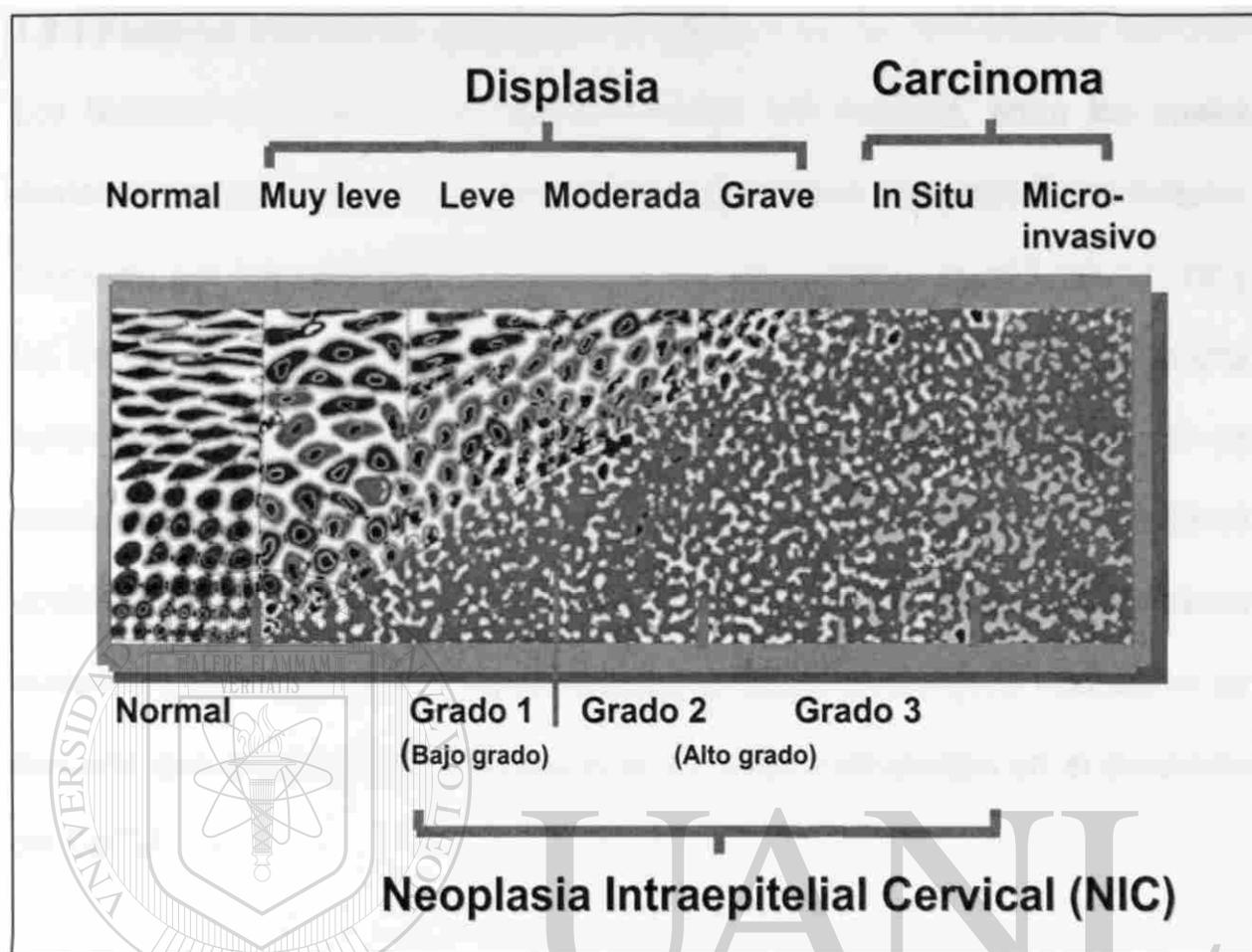


Figura 1. Evolución del cáncer cervicouterino. Se muestra la relación entre tejido normal, displasia cervical (NIC), carcinoma y lesión intraepitelial escamosa. También en la parte de abajo se muestra el equivalente citológico de acuerdo a la clasificación del Papanicolaou.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2 Factores relacionados al CaCU.

Se ha tratado de identificar a los factores epidemiológicos asociados a CaCU, los cuales se pueden clasificar en dos tipos: factores intrínsecos, los cuales están determinados por el componente genético de cada una de las mujeres y los factores extrínsecos, encabezados por los hábitos y el medio ambiente (5, 6, 7).

1.2.1 Factores Intrínsecos Asociados al CaCU.

Los factores intrínsecos son aquellos propios del huésped, entre los cuales destacan los genes HLA (del inglés, Human Leukocyte Antigens) (8), la inmunotolerancia a la infección crónica viral (6, 9), los polimorfismos en p53 (10, 11, 12) y las mutaciones en los genes H-ras y K-ras (13, 14, 15, 16). Existe mucha controversia sobre si estos factores están asociados a la enfermedad. En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio por Martínez Garza y cols. fueron analizados estos factores en pacientes del Noreste de México, encontrando evidencias significativas de asociación entre el CaCU y HLA (17). Aunque no se descarta que otros factores internos pudieran estar involucrados en el desarrollo del CaCU.

1.2.2 Factores Extrínsecos Asociados al CaCU.

Se ha demostrado en estudios epidemiológicos que las mujeres con un inicio de su actividad sexual a edad temprana, así como las que tienen múltiples compañeros sexuales, están en un riesgo mayor de padecer CaCU, aunque no se conoce con exactitud como es que estos factores modifican el riesgo, pero se cree que en edades tempranas existe un incremento de la susceptibilidad del cérvix a infecciones, debido a la metaplasia pavimentosa que está ocurriendo (6, 7, 18).

Existen otros factores de riesgo asociados al CaCU como: los patrones poblacionales (los rangos más elevados de CaCU se encuentran en

Latinoamérica) y el mayor riesgo en mujeres de clase socioeconómica baja; así como también el menor riesgo en mujeres judías de Israel, deficiencias nutricionales, principalmente de Vitamina A, C, D y β -carotenos, folatos, hábito de fumar (se han encontrado sustancias carcinogénicas derivadas del cigarro en biopsias de cervix), uso de anticonceptivos orales, paridad, etc (4, 5, 6, 7, 19).

También se ha determinado el papel del comportamiento sexual masculino como un factor determinante en el riesgo para CaCU: 1) Existe un incremento de CaCU y cáncer de pene en ciertas áreas geográficas; 2) Las esposas de hombres con cáncer de pene tienen de 3 a 6 veces mayor riesgo de padecer CaCU que las mujeres control; 3) Las mujeres casadas con hombres quienes sus primeras esposas presentaron CaCU, tienen un riesgo doble de padecer CaCU; 4) Mujeres quienes sus parejas tienen de 10 ó más compañeras sexuales, tienen un riesgo 5 a 7 veces mayor que las mujeres control. Todos estos factores han sido relacionados, sin embargo no se les ha demostrado asociaciones causativas con el CaCU (18, 19).

De todos estos factores extrínsecos, el único factor que se le a encontrado asociación causativa con el CaCU es la infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo (tipos 16, 18, 33, 45, 51, etc.). Esta asociación se ha correlacionado por la presencia del ADN viral en un 80-90% de los cánceres, porque se ha encontrado integración del genoma viral al genoma celular del

huésped, se ha demostrado la presencia de oncoproteínas virales que desregulan el ciclo celular y se ha demostrado su capacidad transformante de cultivos primarios de queratinocitos humanos (19, 20, 21,22 A pesar de todas estas evidencias, el VPH por sí solo no resulta ser un elemento suficiente para generar cáncer, pues en la actualidad se sabe que del 30-60% de las infecciones iniciales con VPHs son resueltas por el huésped (6, 7, 18, 19, 20). De hecho, 1 de cada 3 casos experimentan regresión de los cambios provocados por la infección y sólo una cuarta parte de las infecciones evoluciona hacia cáncer. Del total de lesiones que progresan, 10% lo hacen a cáncer in situ y menos del 1% llegan a tumores invasivos (3, 21, 22, 23).

1.3 El genoma del VPH.

Este consiste en un ADN circular de aproximadamente 7200 a 8000 pb (8 Kb), asociado a histonas celulares que forman un compuesto parecido a la cromatina. A todas las secuencias codificantes dentro del genoma de estos virus se les denominan ORF (del inglés: *Open Reading Frame* ó marcos de lectura abiertos). Esto significa que una región ORF es un segmento de ADN que tiene la información suficiente para codificar para una proteína (24, 25).

A la fecha se han descrito más de 10 ORFs, lo que conduce a la expresión de diferentes proteínas a partir de un solo fragmento de ADN. Estas secuencias codificantes han sido clasificadas como "tempranas ó secuencias E" (E del inglés

Early) y "tardías ó secuencias L" (L, del inglés *Late*) para indicar el momento de la expresión durante el ciclo de vida del virus.

Todos los genomas de VPHs contienen hasta ocho genes E y la mayoría contienen los genes E2, E4, E5, E6 y E7. El gen E3 solo se encuentra en el virus del papiloma bovino (VPB). Los genes E codifican para la replicación y transformación celular y su expresión es detectable en áreas proliferativas de lesiones inducidas por VPHs.

Los genes L, específicamente los L1 y L2, codifican para proteínas estructurales y su expresión está restringida a una pequeña parte del epitelio en diferenciación, donde también ocurre la replicación del ADN viral. Los genes L1 y E6 están separados por una región que no codifica para proteínas, que se ha denominado "Región No Codificante" ó NCR (del inglés: *Non Coding Región*), ó "Región Larga de Control" ó LCR (del inglés: *Long Control Region*), ó también "Región Reguladora río Arriba" ó URR (del inglés: *Upstream Regulatory Region*). Esta región LCR contiene secuencias críticas de ADN, con diferentes actividades de promotor y enhancer para regular la transcripción y la replicación de genes tanto virales como celulares. La organización de estas secuencias codificantes se muestra en la figura 2 (24, 25).

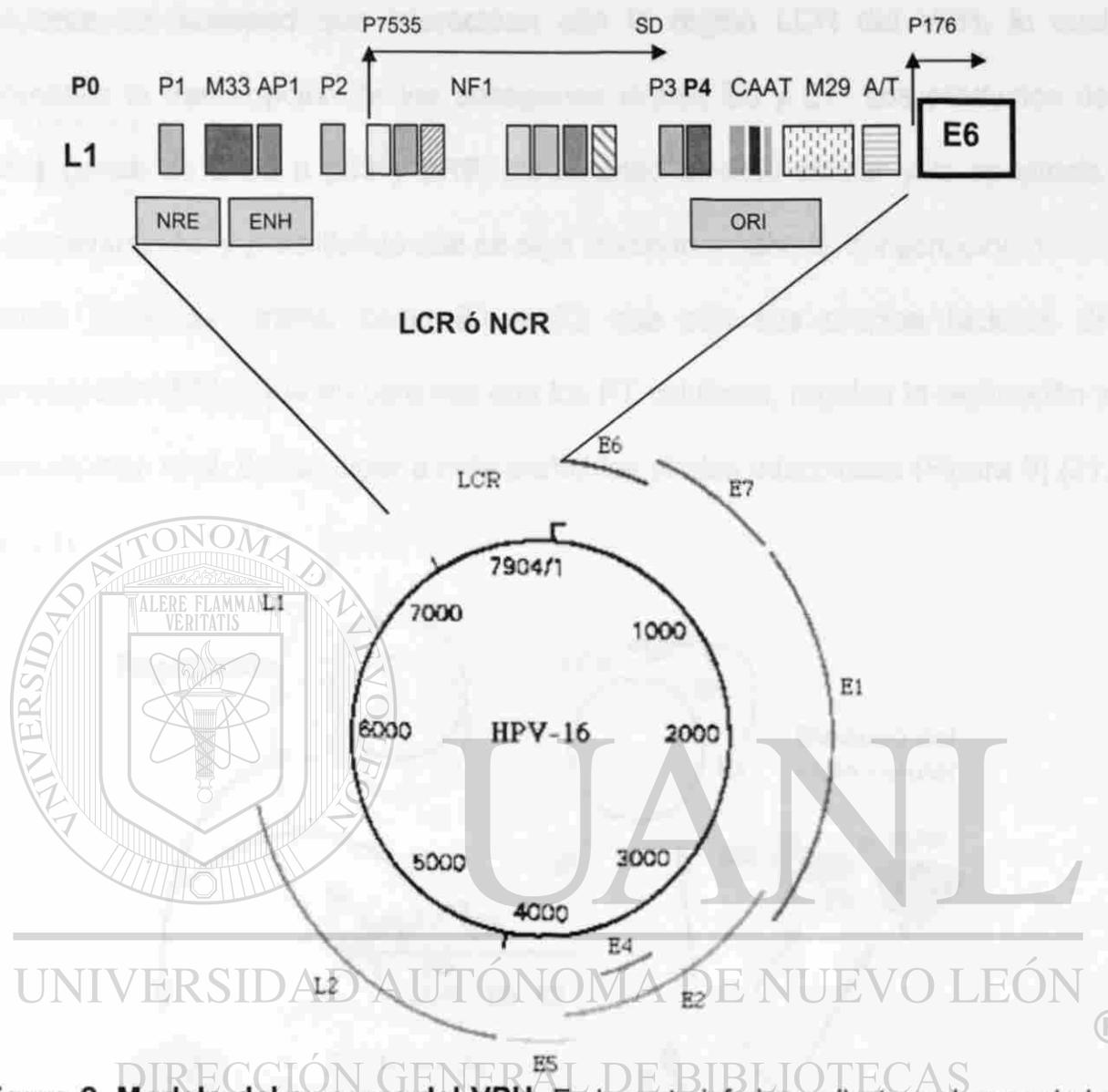


Figura 2. Modelo del genoma del VPH. En la parte inferior se ilustran algunas de los ORFs para los genes que conforman el genoma de este virus (E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2 y L1), y la parte superior muestra con más detalle la organización y distribución de los elementos reguladores de la región NCR: **P7535**, **P175** son los sitios "cap" de los promotores en NCR; **SD**: sitio donador de splicing; **M33**, **M29**, **CAAT**, **A/T**: secuencias altamente conservadas entre los VPs; **P0-P4**, **AP1**, **NF1**: Sitios de unión de la proteína E2 y de factores de transcripción celular; **NRE**: elemento regulador negativo; **ENH**: elemento potenciador; secuencia mínima de origen de replicación viral.

Cuando la infección de VPHs inicia en las células basales de epitelios estratificados, ocurre una combinación particular de factores transcripcionales

celulares del huésped que interactúan con la región LCR del VPH, lo cual promueve la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7. Los productos de estos genes se unen a p53 y pRB, bloqueando el ciclo celular y la apoptosis, respectivamente, y permitiendo que se siga llevando a cabo la transcripción de las demás proteínas virales, como E1 y E2 que son sus propios factores de transcripción (FT) y que en conjunto con los FT celulares, regulan la replicación y transcripción viral, dando lugar a más partículas virales infecciosas (Figura 3) (21, 22, 23).

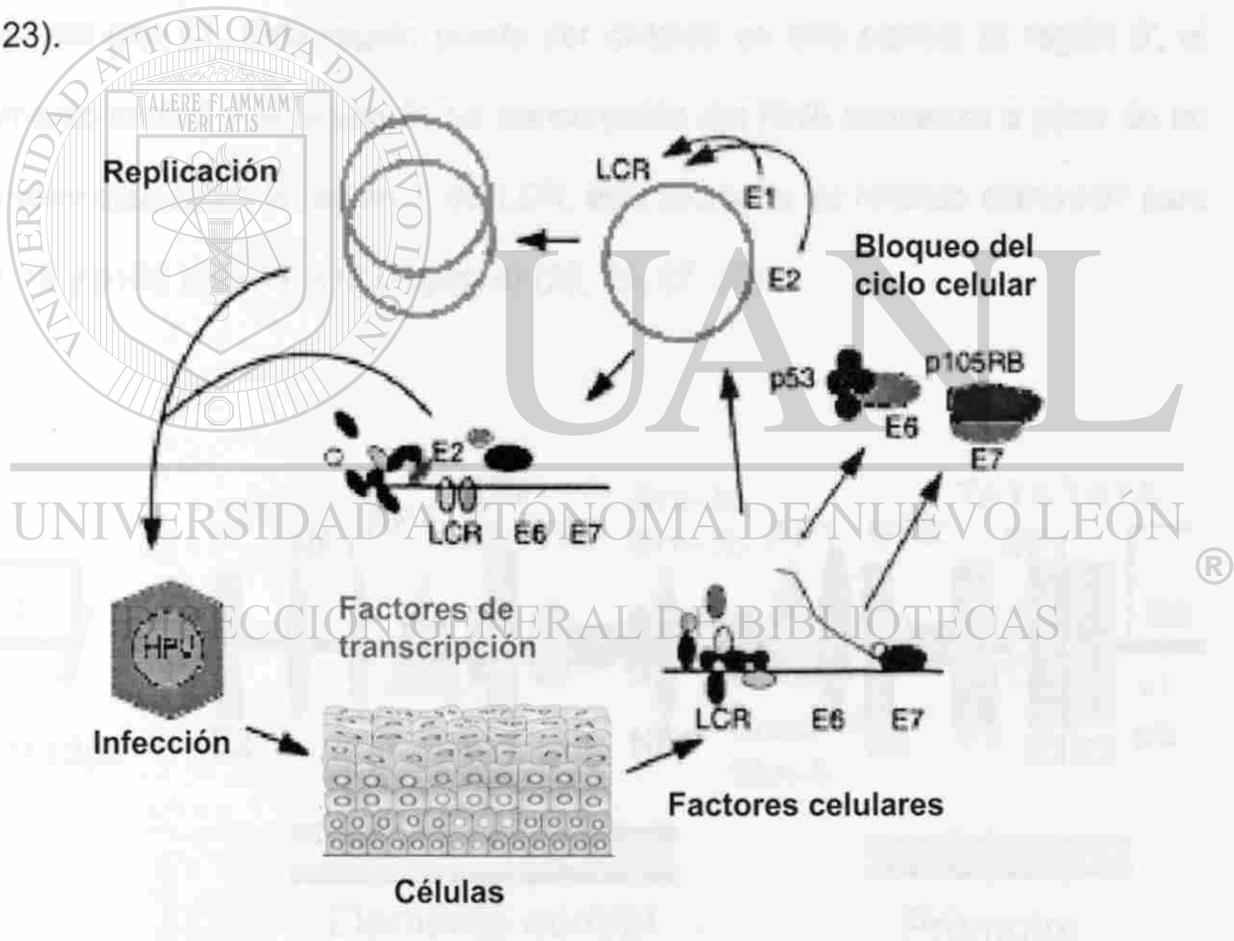


Figura 3.- Ciclo del VPH.- Cuando el VPH infecta las células del epitelio estratificado, el primer contacto del genoma viral se establece con los FT, los cuales se unen a la región LCR para transcribir las proteínas virales E6 y E7. Estas proteínas se unen a p53 y pRB bloqueando la apoptosis y el ciclo celular, respectivamente, permitiendo que se expresen las proteínas, E1 y E2 que son los propios FT del virus y que también se unen a la región LCR. Los FTs celulares y virales estimulan la producción de nuevas partículas virales infecciosas.

1.3.1 Región LCR del VPH

La región LCR abarca desde la región de la terminación del gen L1 hasta el codón para metionina del gen E6 (23, 24, 25). La región LCR es la menos conservada entre los papilomavirus. Esta contiene el promotor temprano (P97), sitios de unión para FT y el origen de replicación localizado entre dos sitios de unión de E2. La longitud de la región LCR varía entre 800 a 1000 pb para los diferentes tipos de VPH. Esta región se encuentra localizada directamente río arriba del gen E6 y río abajo del gen L1. Esta región puede ser dividida en tres partes: la región 5', el segmento central y la región 3'. La transcripción del RNA comienza a partir de un promotor situado en la región 3' del LCR, este promotor es referido como p97 para VPH16 y p105 para VPH18 (Figura 4) (25, 26, 27, 28).

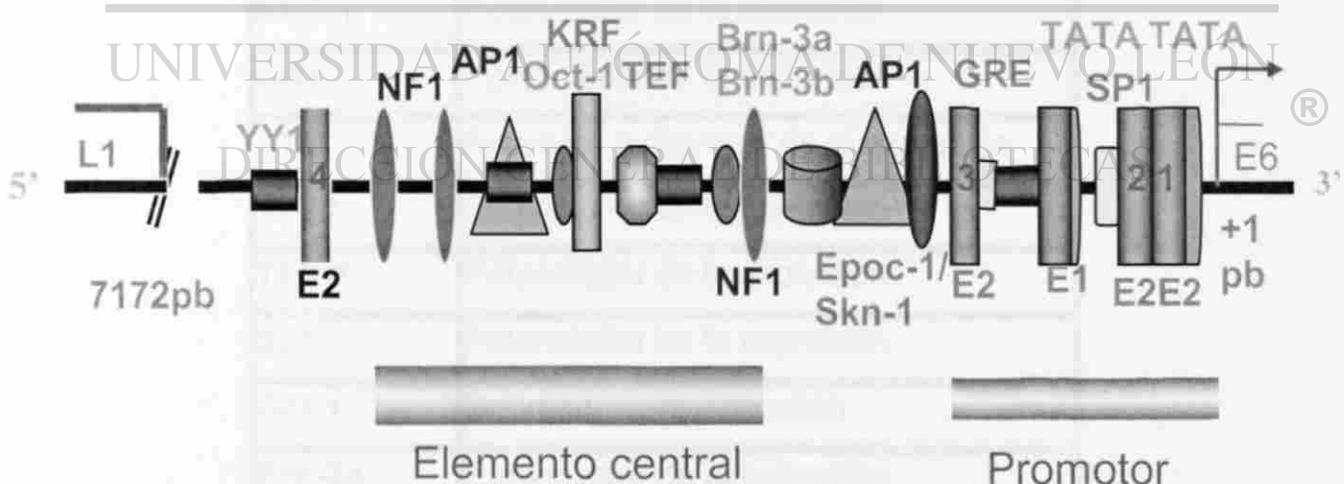


Figura 4.- Representación esquemática del LCR del VPH. La región LCR se divide en tres partes: el promotor cercano (región 3'), el potenciador (elemento central) y la región distal (región 5'). La región LCR del VPH posee distintos elementos de acción en cis sobre los cuales se unen distintos FT básicas que se encuentran en todos los tipos celulares, además de los FT específicos de tejido, que le dan la especificidad de expresión. Así mismo tiene sitios de unión para los FT viral E2 y E1, los cuales regulan la transcripción de los genes virales.

El promotor consiste de una caja TATA y un sitio de inicio de la transcripción que es regulado por diferentes potenciadores localizados en la región 3' y central del LCR (26, 27, 28). A este promotor se le unen FT del huésped (Tabla 1) que tienen sitios de unión en la región LCR de varios VPHs de alto riesgo, los cuales se han visto que regulan la expresión de los genes virales (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37). La región 5' del LCR contienen señales de terminación y poliadenilación de los transcritos virales tardíos (26,29).

Tabla 1.- Factores de transcripción celulares que regulan la expresión de genes del VPH.

FACTOR	FUNCIÓN EN LA REGIÓN LCR
AP1	Potenciador de la expresión
NFI	Activador o represor de la expresión
KRF-1	Potenciador de la expresión
GRE	Potenciador de la expresión
YY1	Activador o represor de la expresión
TFIID	Potenciador de la expresión
TEF-1	Potenciador de la expresión
Sp1	Potenciador de la expresión
Oct-1	Represor de la expresión
Brn-3a	Potenciador de la expresión
Brn-3b	Represor de la expresión

1.3 Factores de Transcripción.

Las proteínas que no forman parte de la molécula de la RNA polimerasa, pero que son necesarias para la iniciación de la transcripción, se denominan FT. Estas proteínas controlan dónde, cuándo y cómo se expresan los genes. Los FT son estructuras modulares con al menos dos dominios funcionales: uno que se une a secuencias de DNA de los promotores y de los potenciadores (dominio de unión a DNA), y otra que activa la transcripción mediante interacciones proteína-proteína (dominio de activación trans). Esta región se une a la RNA polimerasa o a otros factores de transcripción. Los dominios de unión a DNA tienen distintos patrones estructurales tridimensionales, o motivos. La comparación entre las secuencias de numerosos FT sugieren que existen tipos comunes de dominios que se clasifican en: 1) receptores de esteroides, 2) dedos de zinc, 3) hélice-giro-hélice (HTH, del inglés helix-turn-helix), 4) hélice-brazo-hélice y 5) cremalleras de leucina (38, 39). A continuación se describirán los tres dominios más comunes e importantes (39).

1.3.1 Hélice-Giro-Hélice.

Este fue el primer dominio de unión que se descubrió. Se caracteriza por su conformación geométrica, más que por una secuencia aminoacídica característica. Este motivo tiene dos hélices α adyacentes separadas por un giro de varios aminoácidos, que permite que la proteína se una al DNA, pero a diferencia de otros motivos de unión a DNA, el patrón HTH no puede plegarse o funcionar solo,

sino que siempre forma parte de un dominio de unión mayor. Los residuos aminoacídicos que están fuera del motivo HTH son importantes para la regulación del reconocimiento y de la unión al DNA (Figura 5) (38, 39).

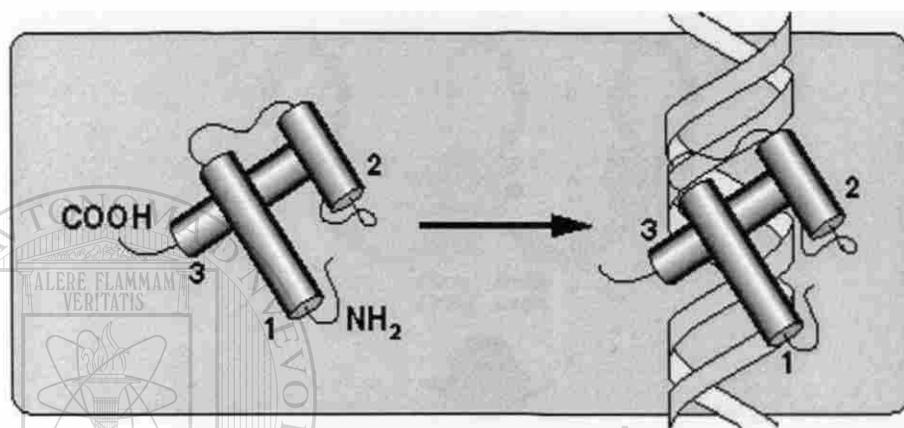


Figura 5.- Esquema de un FT con estructura de Hélice-Giro-Hélice.-Tres hélices del homeodominio unido al surco mayor del DNA (40).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.3.2 Los Dedos de Zinc.

Descubiertos en el factor de transcripción TFIIA de *Xenopus*, estos dedos de zinc contienen grupos de cisteínas y dos residuos de histidinas en intervalos repetidos.

La repetición consenso es Cys-N₂₋₄-Cys-N₁₂₋₁₄-His-N₃-His. Los residuos de cisteína e histidina unen átomos de zinc covalentemente, plegando los aminoácidos en lazos conocidos como dedos de zinc. Cada dedo está formado por 23 aminoácidos aproximadamente, con un lazo de 12 a 14 a.a. entre los residuos de cys e his, y con una unión entre lazos formada por 7 u 8 a.a. Los a.a. del lazo

interaccionan con secuencias específicas del DNA y se unen al surco mayor del DNA, envolviéndose alrededor de él. Dentro del surco mayor, los dedos de zinc establecen contactos con un grupo de bases del DNA especialmente con cadenas ricas en G, con las cuales forman puentes de hidrógeno (Figura 6) (38, 39).

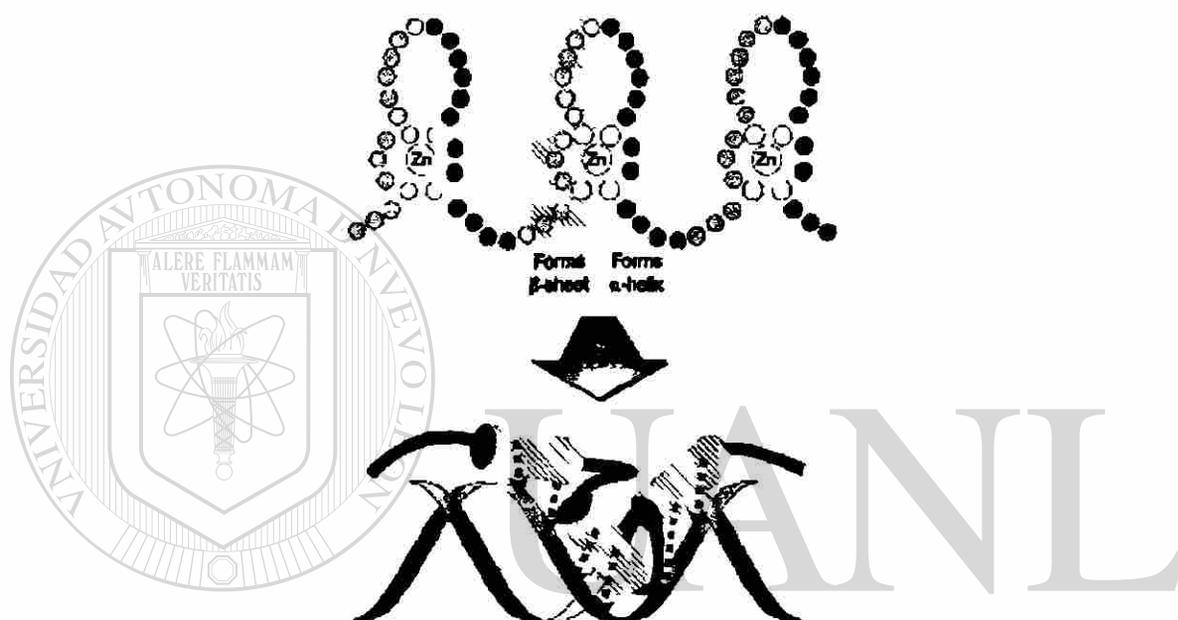


Figura 6.- Esquema de un FT con estructura de Dedos de Zinc.- La α -hélice se inserta en el surco mayor del DNA y la β hélice en el surco menor (38).

1.3.3 Las Cremalleras de Leucina.

Observadas inicialmente como un trecho de 35 a.a. en una proteína de hígado de rata, estas tienen cuatro residuos de leucina separados por siete a.a., y está flanqueado por a.a. básicos. Las regiones ricas en leucina forman una hélice con los residuos de leucina sobresaliendo en cada vuelta. Cuando se dimerizan dos de estas moléculas, los residuos de leucina se cierran como una cremallera.

El dímero contiene dos regiones de hélice alfa adyacentes a la cremallera que se unen a los residuos fosfatos y a bases específicas del DNA (ver Figura 7) (38, 39).



Figura 7- Esquema de un FT con estructura de Cremallera de Leucina. Las regiones ricas en leucina forman una hélice con los residuos de leucinas sobresaliendo en cada vuelta. Cuando dimerizan dos de estas moléculas, los residuos de leucina se cierran como una cremallera (41).

1.3.4 FT involucrados en CaCU

De los once FTs que se unen a la región del LCR (Tabla1), se eligieron cuatro: Brn-3a, Brn-3b, Oct1 y YY1, de acuerdo a sus antecedentes en el CaCU y la disponibilidad de sus secuencias en el GenBank.

1.3.4.1 Brn-3a y Brn-3b.

Se identificaron por primera vez en células neuronales y sus dominios de unión al DNA son del tipo POU (hélice-giro-hélice) (42). Brn-3b es antagonista de Brn-3a, debido a un cambio de una isoleucina por valina. Este cambio a.a. convierte a Brn-3b de un represor en un potenciador de la transcripción (43). Brn-3a es un factor de transcripción que activa la expresión de E6 Y E7 a partir del promotor de HPV16. Un estudio reciente de D. Ndisang y cols. demuestra que Brn-3a se encuentra sobre expresado hasta 300 veces en biopsias cervicales de mujeres con NIC III, comparadas con biopsias de cérvix normal (42).

Otros estudios han demostrado que Brn-3a es un potente activador del protooncogen Bcl-2, pero esta actividad es fuertemente inhibida por la proteína p53 (44). Por las evidencias presentadas en estos estudios se sugiere un papel crítico de Brn-3a y Brn-3b en la regulación de la expresión génica de HPV y en el control del crecimiento y transformación de las células cervicales.

1.3.4.2 Oct1.

Su dominio de unión al DNA es de tipo POU. Este es un factor de transcripción de células B, inmunoglobulinas, H2b, snRNAs y en algunas células T (45), por lo que es un factor muy importante en la respuesta inmune que monta el huésped a una infección viral. En estudios realizados con la región LCR del VPH 16 se ha

observado que mutaciones en el sitio de unión al factor Oct-1, bloquean la unión de este factor a la región LCR, incrementando significativamente la actividad enhancer/promotor de esta región y aumentando la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del virus (46).

1.3.4.3 YY1.

Este es un FT ubicuo. Su dominio de unión forma dedos de zinc (47) y puede actuar como un represor o un activador dependiendo del contexto del promotor. YY1 es un potente activador de la región reguladora río arriba (URR) del VPH 18, pero su capacidad de activación es dependiente de una región adyacente al sitio de unión al DNA. La delección de esta región adyacente causa que YY1 actúe como represor de la actividad del URR del VPH 18 (48). Además, mutaciones en el sitio de unión de YY1 incrementan la actividad del promotor P97 del VPH 16 de 3 a 6.5 veces (49).

Otros autores han analizado la secuencia promotora del interferón gamma, encontrando un sitio de unión para YY1 y han determinado que YY1 actúa como inhibidor de la transcripción del IFN-gamma, y que su sobre expresión podría generar una inmunosupresión del huésped, facilitando la infección y/o proliferación del VPH (50). Adicionalmente se ha visto que YY1 activa a c-Myc, el cual es un oncogen asociado a la proliferación en CaCU (51).

1.4 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP en Inglés).

El genoma humano no es una entidad estática. Antes al contrario, el DNA está sometido a multitud de alteraciones que pueden provocar numerosas enfermedades. Estas alteraciones genéticas pueden implicar grandes reorganizaciones cromosómicas, incluyendo duplicaciones o deleciones de fragmentos y hasta de cromosomas enteros. Asimismo, son muy frecuentes modificaciones más sutiles que implican cambios en uno o en unos pocos nucleótidos. Estos cambios que sufre la estructura del DNA se denominan mutaciones.

Las mutaciones se originan por múltiples causas, incluyendo errores en los mecanismos de replicación y reparación del DNA y factores ambientales u ocupacionales. Además, las reacciones químicas espontáneas de despurinación y desaminación son una fuente extraordinariamente frecuente de alteraciones genéticas. Las consecuencias de la acumulación de mutaciones en un organismo pueden ser también diversas. Así, las mutaciones pueden tener efectos deletéreos y causar enfermedades, incluyendo el cáncer (52). Sin embargo, en ocasiones las mutaciones pueden ser neutras o incluso beneficiosas. Este tipo de mutaciones nos sirve para introducir el concepto de polimorfismo, que surge de la variación alélica entre individuos de la misma especie. Un polimorfismo es considerado como tal cuando su frecuencia en la población es superior al 1%. Hay varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias

repetidas), pero los más frecuentes son los denominados SNPs (single nucleotide polymorphisms del inglés) (53).

Los SNPs son secuencias alternativas (alelos) que existen en los genomas de individuos de determinadas poblaciones (54). Por ejemplo un individuo podría tener una guanina en una posición particular de su genoma (locus), donde otro individuo podría tener una citosina exactamente en la misma localización.

Los SNPs son las formas más comunes de polimorfismos genéticos en el genoma humano, que ocurren en promedio una vez por cada 1,000 pb. (55). El genoma humano es dividido en genes y regiones intergénicas. Las primeras se dividen a su vez en regiones codificantes y no codificantes de las proteínas, conocidos como exones e intrones respectivamente. Por lo tanto un SNP que ocurre dentro de un exón podría resultar en un cambio aminoacídico entre individuos, esto es conocido como un SNP codificante.

Los a.a. pueden variar en su tamaño y carga, un cambio de a.a. puede resultar en un cambio conformacional en la proteína, afectando la interacción proteína-proteína o la unión ligando-receptor. Además un SNP podría resultar en la formación de un codón de terminación, lo cual resultaría en una proteína truncada no funcional. Los SNPs en intrones no afectarían directamente en el cambio de una proteína, pero podrían servir como marcadores de genes cercanos (56, 57).

1.4.1 SNPs en FT involucrados en enfermedades.

La asociación de SNPs en FT a patologías es muy escasa. Esto se debe principalmente a que se pensaba que es casi imposible encontrar cambios en sus secuencias y mucho menos que estos cambios estén asociados a enfermedades. Con la secuenciación completa del genoma humano se han encontrado 1.42 millones de SNPs en todo el genoma (56), por lo que es muy probable encontrar SNPs en las secuencias de los FT.

En los últimos años se han hecho algunos estudios sobre SNPs en FT los cuales no solo demuestran la presencia de polimorfismos, si no también la relación de éstos a algunas patologías. Por ejemplo los factores de transcripción de tiroides 1 y 2 los cuales se han asociados a hipotiroidismo congénito y disgenesia tiroidea (58, 59, 60, 61), SNPs en el FT AP-2 se les han asociado a trastornos de personalidad (62) y por ultimo SNPs en el factor de transcripción de migración de macrófagos (MIF) se han asociado a artritis idiopática juvenil (63).

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación.

A la fecha no existen antecedentes sobre SNPs en factores de transcripción que puedan asociarse al desarrollo de neoplasias. Estos cambios podrían provocar un cambio en la afinidad entre los factores y la región LCR del VPH, potenciando la expresión de E6 y E7, produciendo una desregulación del ciclo celular y desencadenando la transformación maligna. Por otro lado, estos cambios en la afinidad podrían alterar la unión de éstos a la región LCR, pudiendo provocar que la expresión de E6 y E7 también se altere, explicando porqué algunos huéspedes infectados con VPH nunca desencadenarán CaCU.

Para esta tesis se propuso el análisis de la secuencia del dominio de unión al DNA de algunos de los FT que participan en la infección por VPH, regulando la expresión de las oncoproteínas virales. Este estudio determinaría por primera vez la presencia de polimorfismos en los dominios de los FT, los cuales podrían alterar la afinidad de éstos al sitio de unión al DNA, provocando una alteración en la expresión de los genes celulares y virales.

2.2 Objetivo General.

Determinar polimorfismos en los factores de transcripción celulares involucrados en la expresión de genes del VPH, en un grupo de mujeres sin CaCU.

2.3 Objetivos Específicos:

- **Seleccionar los factores de transcripción celulares que serían analizados en este trabajo.**
- **Determinar si existe variabilidad en la secuencia de los factores de transcripción y determinar los SNPs presentes en las regiones codificantes de los FT celulares.**
- **Determinar si los cambios encontrados pudieran tener implicaciones en la secuencia aminoacídica del factor de transcripción.**
- **Determinar si estos SNPs pueden estudiarse por metodologías sencillas como PCR-RFLP.**

CAPÍTULO III

ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir los objetivos planteados, se siguió la estrategia detallada e ilustrada a continuación (Figura 8).

1.-Se recolectaron un total de 100 muestras de sangre periférica con EDTA como anticoagulante. De cada una se extrajo el RNA con el método descrito por Chomczynski y Sacchi, 1987 y se estableció un banco de muestras.

2.-Se almacenaron las muestras de RNA a -70°C hasta el momento de su utilización.

3.-Se realizó la búsqueda de las secuencias de los FT, en el GenBank.

4.-Se diseñaron pares de oligonucleótidos para amplificar los dominios de unión de los FT Oct1, YY1, Bm-3a y Bm-3b.

5.-Se estandarizaron las reacciones de RT-PCR para los oligonucleótidos diseñados y se eligieron los FT a estudiar en este trabajo.

6.-Se amplificaron los factores de transcripción para los RNAs extraídos.

7.-Los productos amplificados (PA) se purificaron usando fosfatasa alcalina y exonucleasa ó extracción fenol-cloroformo a partir de agarosa.

8.-Los PA purificados se secuenciaron y todas las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con la secuencia reportada en el GenBank en busca de SNPs.

9.-Se determinó el efecto de la mutación en la secuencia de a.a del FT y se determinó la naturaleza del cambio bioquímico en la secuencia de la proteína.

10-Se determino si el SNP o la contraparte normal se asociaban a sitios de reconocimiento para enzimas de restricción por el método de PCR-RFLP.

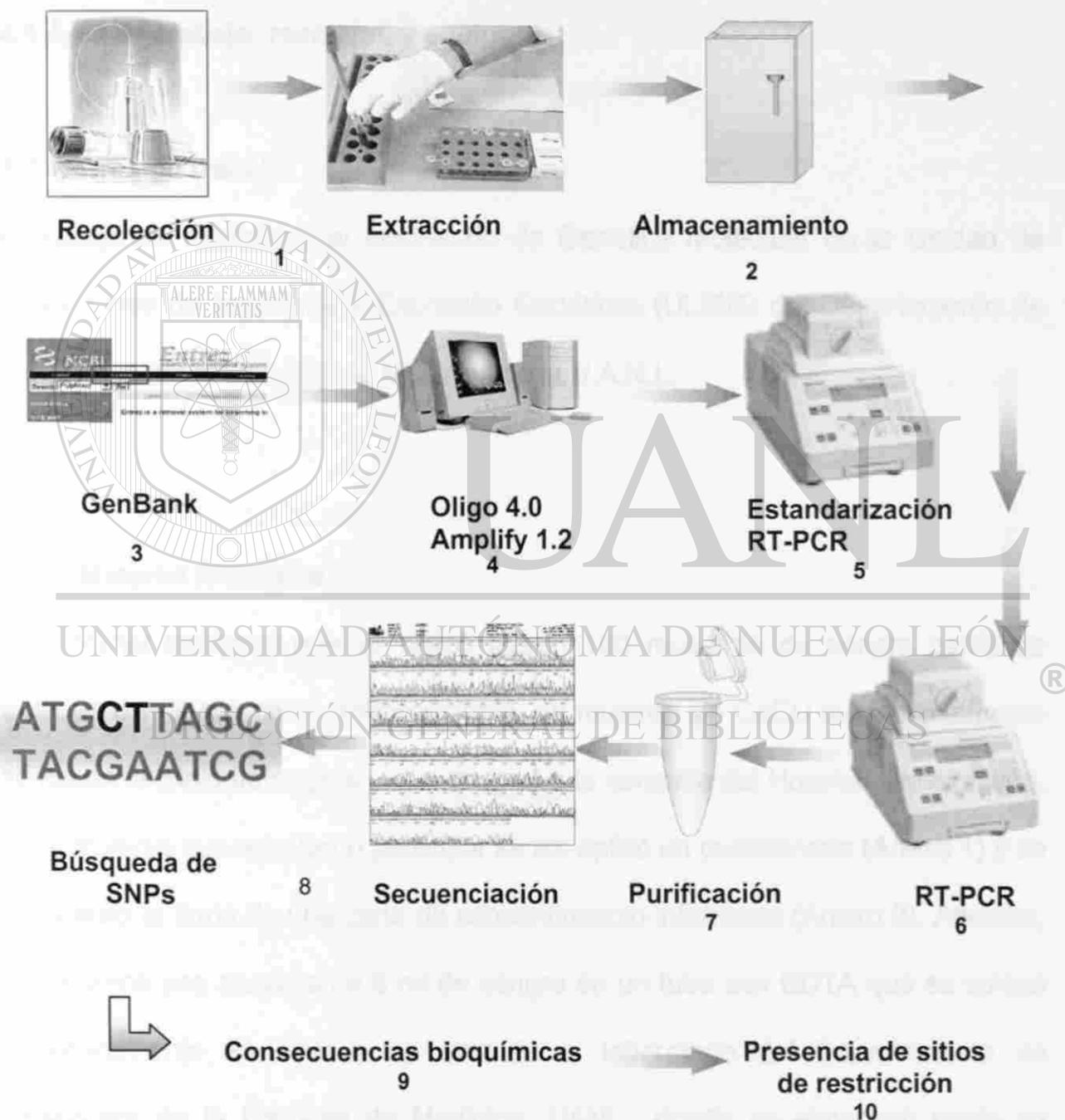


Figura 8.- Esquema de la Estrategia General. Se ilustra los pasos que comprenden la estrategia experimental realizada en este trabajo, los números corresponden al número del paso de la estrategia general descrita en la página anterior.

CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Área de trabajo, reactivos y equipo

4.1.1.-Área de trabajo.

El trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

4.1.2.-Material Biológico.

El material biológico que se utilizó fueron 100 muestras de sangre periférica tratadas con EDTA como anticoagulante, de mujeres sin CaCU que normalmente se hacen la citología vaginal y que acuden a la consulta del Hospital Universitario. A las mujeres que aceptaron participar se les aplicó un cuestionario (Anexo 1) y se les solicitó la firma de una carta de consentimiento informado (Anexo 2). Además, se les tomó una muestra de 5 ml de sangre en un tubo con EDTA que se colocó inmediatamente en hielo y se trasladó al laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL., donde se almacenó hasta su análisis.

4.1.3.-Reactivos químicos.

Los reactivos que se utilizaron para la extracción de RNA fueron: Acetato de sodio, EDTA, NH_4Cl , NaHCO_3 , DEPC, citrato de sodio, sarcocil, β -mercapto-etanol y fenol, adquiridos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA), isotiocianato de guanidina de Life technologies (Rockville, MD, EUA), alcohol isoamílico y cloroformo de Merck (México, D.F.).

Para realizar la retro transcripción ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), los reactivos fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: Los oligonucleótidos, iniciadores al azar, DTT, la enzima M-MLV y los dNTPs se adquirieron de la compañía Gibco BRL (Gaithersburg, MD, EUA), la amplitaq gol con gene Amp twelve paq 10X PCR bufferII roche kit fue adquirido a Applied Biosystems (México, D.F.), el BSA fue comprado a New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA).

Para la electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol, acrilamida, N,N-metilenbisaacrilamida, TEMED, γ -metacriloxi propil tri-metoxisilano, urea y bromuro de etidio todos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA), mientras que el persulfato de amonio se adquirió de BioARad (CA, EUA).

Para la purificación de los PA fueron utilizadas dos enzimas: la fosfatasa alcalina (1.2U) y la exonucleasa I (6U) (PCR Product Pre-Sequencing Kit, Gibco-BRL, Life Tech, Gaithersburg MD, EUA).

En la secuenciación se usó: PCR product presequencing kit, Thermo Sequenase cycle sequencing kit de USB corporation (Cleveland, Ohio, USA), IRDyeTM 800 Terminator Mixes, KB^{plus} Gel Matrix 3.7%, IR2 STOP Solution RED de Li-COR Biosciences (Lincoln, USA) y Vivid violet DNA/RNA Co-precipitante de CHIMERx (Milwaukee, Wisconsin, USA).

4.1.4.- Material consumible.

Los tubos de microcentrífuga (de 0.2, 0.5, 1.5 y 2.0 ml), las puntillas (de 0.01, 0.2, 1.0 ml) para las micropipetas de precisión, los tubos cónicos de polipropileno (de 15 y 50 ml) y los guantes de látex fueron comprados a Cell Associates (Houston, TX, EUA). Las micropipetas de precisión de volumen variable de 2, 10, 20 200 y 1000 μ l fueron obtenidas de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA). Los cepillos citológicos desechables utilizados fueron comprados a las Industrias DM, S.A. de C.V. (México, D.F.).

4.1.5.- Equipo.

Se utilizó una centrífuga clínica de mesa Beckman TJ6 y un vórtex modelo 37600 de Thermolyne (Dubuque, Iowa, USA), una balanza granataria Sartorius modelo 1206 MP (Cambh, Göttingen, Alemania), una centrífuga Beckman Allegra™ 21R, modelo 367570, un agitador de tubos BRNAstead Thermoline modelo Maxi Mix (Bubuque, IOWA, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA) y una microcentrífuga Eppendorf modelo 5412 (Hamburg, Alemania).

Los termocicladores utilizados fueron: un Termociclador PTC-100 de 60 pozos de 0.5 ml, MJ-Research (Watertown, MA, EUA), un PCR-Express de 96 pozos de 0.2 ml, Hibayd (Reino Unido), un secuenciador automático DNA sequenecer Long Reader 4200 (LI-COR, California, EUA) y un termomixer 5436 (Eppendorf).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Para analizar los productos amplificados por PCR, se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal Fotodyne (Hartland, WI, EUA), cámaras verticales de 20 x 20 cms y una fuente poder de Gibco-BRL modelo 250 (Gaithersburg, MD, EUA). Para analizar los geles de agarosa, se utilizó el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, Ca, EUA).

4.1.5.1.- Apoyo computacional. El procesamiento de datos fue realizado en una computadora personal Toshiba modelo 2115 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO RAD).

El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word XP* (Microsoft Corporation), Procesadores gráficos *Microsoft Power Point XP* (Microsoft Corporation), Adobe Photoshop *Limited Edition 5.0* (Adobe System Incorporated) y HP Scan-Jet 5100 C (Hewlett Packard, Inc).

Los programas utilizados por vía INTERNET fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); BLAST Network Service (Blaster); *Gen Bank* (ICEBEG, Trieste, Italia). El programa utilizado para comunicación en la red fue el *Microsoft Internet Explorer* versión 5.0

4.2 Métodos

4.2.1.-Características de la población de estudio.

Se tomaron 100 muestras de sangre periférica de mujeres (en el periodo de 1 de febrero a 30 de abril del 2002) que tenían una edad entre los 30 y 60 años, una residencia de 5 años o más en el estado de Nuevo León, que tuvieran una

citología vaginal negativa para CaCU o NIC de al menos seis meses, que no hubieran tenido cáncer de cervix o displasia, que no estuvieran, ni hubieran recibido tratamiento de quimioterapia y radioterapia, y por último, que consultarán en el Hospital Universitario.

4.2.2.-Extracción de RNA.

Las muestras de sangre periférica de mujeres se procesaron utilizando el método de Chomczynski y Sacchi (64). Se colocaron 5 ml de sangre en un tubo falcon de 50ml y se le agregaron 35 ml de solución de lisis (NH_4Cl 155 mM, NaHCO_3 10 mM y EDTA 0.1 mM, pH 7.4), se incubó la muestra en hielo durante 15 min y se centrifugó durante 10 min a 2000 rpm. Al terminar se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de leucocitos en 20 ml de solución de lisis, se incubó en hielo 5 min centrifugándose 10 min a 2000 rpm, se volvió a descartar el sobrenadante y se lavó nuevamente la pastilla con solución de lisis. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 1 ml de H_2O -DEPC y se añadió 1.8 ml de solución D (Iso-tiocianato de guanidina 4M, Citrato de sodio 25mM, Sarcosil 0.5% y β -mercapto-etanol 0.1M) y se mezcló por inversión, se le agregaron 180 μl de acetato de sodio 2M pH=4.0, 1.8 ml de fenol equilibrado con H_2O -DEPC a pH 7 y 360 μl de Sevag (alcohol isoamílico-cloroformo 1:49). La suspensión formada se agitó en el vortex por 10 seg y se incubó en hielo durante 15 min, se centrifugó a 10,000 rpm, por 20 min a 4°C, la fase acuosa se transfirió a otro tubo

falcon y se le añadieron 2.5 vol de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se colocó a -20°C durante 1 h, se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C , se decanto el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 μl de solución D, se transfirió a un tubo de 2 ml y se añadieron 2 vol de etanol absoluto, y se almacenó a -20°C hasta su utilización, donde se tomó una alícuota de 200 μl y se centrifugo a 14,000 rpm a 4°C , se decantó el sobrenadante y la pastilla se secó al medio ambiente y se resuspendió en 10 μl de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$, almacenándose a -70°C .

4.2.3.- Análisis electroforético del RNA.

Para observar la calidad de los RNAs extraídos, estos se visualizaron en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes al 1% (250 μl de isotiocianato de guanidina 1M y 5 μl de bromuro de etidio 100X).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.4.- Diseño de los oligonucleótidos.

El primer paso fue elegir 4 de los 11 FT que se unen a la región LCR del VPH. Esto fue hecho en base a que estuvieran sus secuencias reportadas en el genbank o algun otro banco de DNA y la relevancia de estos factores en las neoplasias. Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de secuencias reportadas de los DNAC de los 4 FT. Las secuencias se obtuvieron del GenBank vía Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los oligonucleótidos se diseñaron sobre las regiones de los dominios de unión al DNA para amplificar las secuencias de los FT. Para el diseño se utilizaron los programas Oligo 4.0 y Amplify 5.1. Estos programas permitieron controlar los factores como: las temperaturas de alineamiento, los malos apareamientos, los dímeros entre los oligonucleótidos, etc. La especificidad de los oligonucleótidos se comprobó utilizando el programa Blast.

4.2.5 Reacción de RT.

Los DNAC se sintetizaron a partir de RNA total (RNAt) utilizando 1µl de hexámeros al azar más 1µl de RNA, desnaturalizando a 65°C 5 min e incubación por 2 min en hielo. Posteriormente se le agrego la mezcla de buffer, dNTPs, DTT, RNAsin, BSA, H₂O y la enzima MMLV-RT. Las condiciones utilizadas al principio de la RT fueron 25°C 10 min, 42°C 60 min y 70°C 15 min, las concentraciones de la reacción se muestra en la tabla 2.

4.2.6 PCR.

Una vez que se tenían los DNAC, se realizaron las PCRs utilizando los oligonucleótidos diseñados y utilizando al principio las condiciones descritas en la tabla 3 para todos los FT.

Tabla 2- Condiciones Iniciales para la RT de los FT.

Reactivos	Volumen	Concentración final
RNA de sangre periférica	1 μ l	50 ng/ μ l aprox.
random primers (0.5 μ g/ μ l)	1 μ l	0.05 μ g/ μ l
Buffer 5X	2 μ l	1x
dNTPs (10mM)	1 μ l	1mM
DTT (100 mM)	1 μ l	10mM
RNAsin (20U/ μ l)	0.5 μ l	1 U/ μ l
BSA (10U/ μ l)	0.2 μ l	0.2 U/ μ l
MMLV-RT (2 U/ μ l)	0.2 μ l	0.04 U/ μ l
H2O	3.2 μ l	-----
Volumen total	10 μ l	-----

El programa de amplificación utilizado al inicio para la PCR consistió un paso inicial de desnaturalización (a 95°C por 5 min, una sola vez), un paso de alineamiento (95°C por 30 seg, 55°C por 30seg y 75°C por 30 seg todo esto 30 veces más) y por ultimo un paso de extensión (a 75°C por 15 min, un sola vez). Tanto las condiciones descritas en la tabla 3 como el programa de PCR son utilizados como estándares en la ULIEG para iniciar la estandarización de las amplificaciones por PCR.

Una vez terminadas las PCR todos los PAs eran almacenados a -20 °C hasta el momento de la electroforesis para verificar la amplificación y la secuenciación de estos.

Tabla 3.- Condiciones iniciales de la PCR para los FT

Reactivos	Volumen	Concentración
Buffer 10X	2 μ l	1X
dNTPs (10mM)	0.5 μ l	0.25 mM
MgCl ₂ 25 mM	2 μ l	2.5 mM
OligoF 5 μ M	2.5 μ l	0.62 μ M
OligoR 5 μ M	2.5 μ l	0.62 μ M
Taq gold 5U/ μ l	0.5 μ l	0.12U/ μ l
H ₂ O	9 μ l	10.9
DNAc	1 μ l	---
Volumen total	20 μ l	---

4.2.7 Electroforesis en gel de agarosa.

La amplificación de los dominios de unión de los FT se verificó en geles de agarosa al 2%. El gel de agarosa al 2% se preparó en solución amortiguadora TBE 1X (0.089 M Tris-Borato y 0.089 M ácido bórico; pH=7.9), disolviendo en éste la agarosa con calor. La agarosa líquida se vació a un molde de electroforesis y una vez que ésta gelificó a temperatura ambiente, el gel se depositó en una cámara de electroforesis y se cubrió con buffer TBE 1X. Se mezcló 1 μ l de las muestras y 1 μ l de jugo azul 6X (0.3% azul de bromofenol, 0.3% xilencianol y 30% glicerol). Se realizó la electroforesis, inicialmente a 50 V mientras se internaban las muestras y el colorante en el gel y posteriormente a 110 V por 1 hora (dejando correr el azul de bromofenol tres cuartas partes del gel). Concluída la electroforesis, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2 μ g/ml por

5 ó 10 min y luego se lavó varias veces con agua corriente para quitar el exceso de bromuro y así proceder a su observación en un trans iluminador de luz UV.

4.2.8 Purificación de los PA.

Después de confirmar que las PCRs habían funcionado, se tenían que purificar los PAs. Se siguieron dos métodos: El primero cuando los geles presentaban inespecificidades, se cortaban las bandas de interés y se ponían en tubos de 0.5 ml con un hueco en la parte de abajo y empaquetados con fibra de vidrio dentro de un tubo de 1.5 ml , se centrifugaban a 14,000 rpm por 5 min y a la solución obtenida en el tubo de 1.5 ml se le hacía extracción fenol-cloroformo. El segundo método se utilizaba cuando en el gel se advertía una sola banda, entonces a 10 μ l del PA se le agregaba 1.5 μ l de exonucleasa y 1.5 μ l de fosfatasa alcalina en un tubo eppendorf de 0.5 ml, se mezclaban y se ponían en un termociclador 30 min a 37°C, para que actúen las enzimas y 15 min a 80°C, para inactivarlas (Figura 9), este ultimo método fue el que se utilizó en la mayoría de las muestras.

4.2.9 Secuenciación de los PA.

La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automatizado DNA Sequencer 4200 de LICOR (Anexo 3)



Figura 9.- Esquema para la purificación de los PA.- El método de purificación depende de la calidad del PA, si son PAs con una sola banda se purifican utilizando exonucleasa y fosfatasa alcalina, si son PAs con muchas inespecificidades se corren en geles de agarosa, se corta la banda, se pasa la agarosa por fibra de vidrio y se realiza una extracción fenol-cloroformo.

El sistema LI-COR emplea un detector fluorescente. En la reacción de secuenciación la DNA polimerasa incorpora terminadores nucleotídicos marcados con un colorante que absorbe en el infrarrojo (IRDye) en los fragmentos de DNA sintetizados, los cuales migran a diferente longitud dependiendo del tamaño de estos en el gel de acrilamida, un láser de diodos excita el colorante infrarrojo y la señal emitida por el colorante incorporado en los fragmentos es registrada por el detector fluorescente. Los datos son enviados a un software, el cual traduce esas señales a una imagen de una serie de bandas, estas bandas representan la secuencia de los PA, las cuales debe ser corroboradas en forma manual con la secuencia blanco.

El protocolo que se utilizó en la secuenciación de las muestras se describe y observa en la Figura 10.

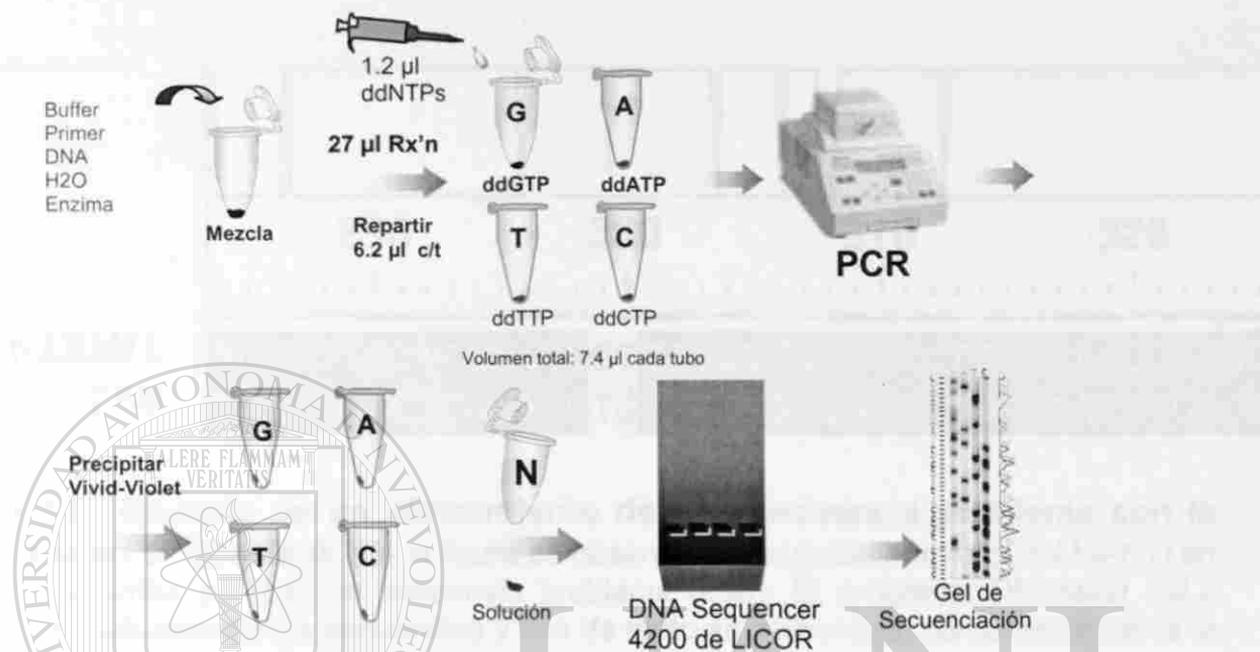


Figura 10.- Esquema del protocolo de secuenciación. En un tubo eppendorf de 0.5 µl se le agrega el buffer de reacción 10X, el oligonucleótido (5µM), el DNA (ng) y la enzima secuenasa, todo esto lleva a un volumen total de 27 µl (Anexo 3), el cual se reparte en cuatro tubos con 6 µl cada uno, después se le agrega 1.2 µl de mezcla de los terminadores nucleotídicos (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP), se mezcla y se realiza la PCR, una vez terminada la PCR se procede a precipitar los PAs utilizando vivid violet y se resuspenden en 3µl de solución Stop, desnaturalizando por 10 min (Anexo 4), para posteriormente cargar todas las muestras en un gel desnaturalizante de acrilamida al 3.7% corriendo la electroforesis por seis horas a 2000 volts, al termino de ese tiempo se observa y analiza la imagen registrada en el secuenciador, registrándose todos los datos obtenidos en un diario de condiciones de reacción (Anexo 5) y otro diario de resultados (Anexo 6).

4.2.10 Análisis de las secuencias nucleotídicas.

Una vez obtenidas las secuencias de los dominios de unión de los FT, se compararon mediante el programa BLAST con las secuencias reportadas en el

GenBank y se realizaron alineamientos utilizando el programa DNAMAN 5.2.2. (Figura 11).

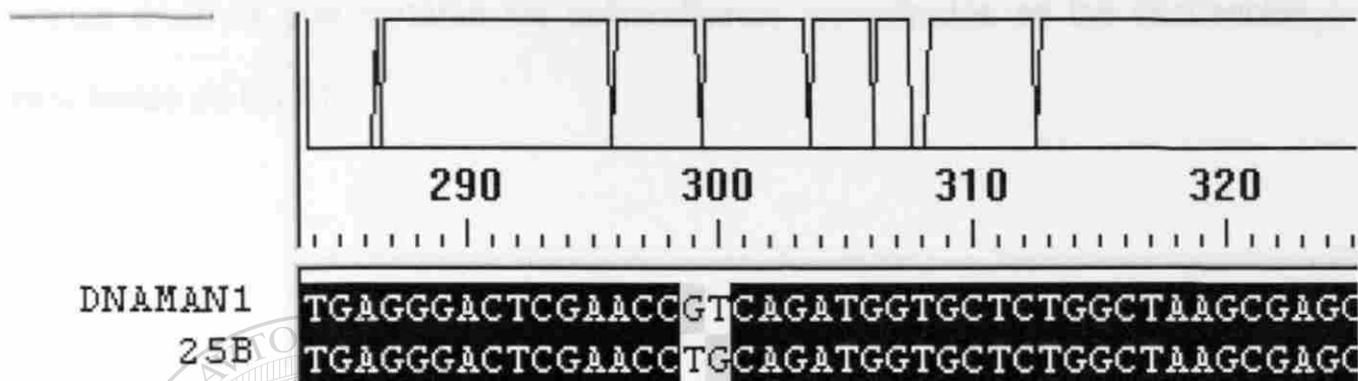


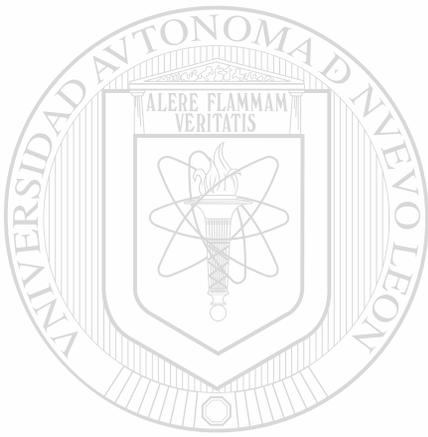
Figura 11.- Ejemplo de un alineamiento de una secuencia problema con la reportada en el GenBank. En la figura se observa la secuencia normal (DNAMAN1) en la parte de arriba y abajo la secuencia problema (25B). El programa DNAMAN 5.2.2 alinea automáticamente las secuencias y nos da tanto en porcentaje, como visualmente la similitud y diferencias de las dos secuencias comparadas.

4.2.11. Cambios producidos por SNP en las proteínas.

Al realizar los alineamientos de las secuencias problemas con la secuencia normal reportada, se observaron los cambios nucleotídicos (SNPs) de manera visual y se localizó el codón en donde se encuentra el cambio, esto se observa en el programa DNAMAN 5.2.2 como un hueco ó un sombreado de manera que si existe una diferencia en las secuencias es fácilmente detectada. Posteriormente se observó el marco de lectura del DNAC reportado en el GenBank, agrupando todos los codones y se verifica si el SNP encontrado en el codón genera un cambio de aminoácido utilizando el código genético.

4.2.12. Búsqueda de RFLPs para los SNPs encontrados.

Para analizar los SNPs encontrados en las muestras se hizo un análisis computacional utilizando el programa DNAMAN 5.2.2 y el DNASTrider 1.3 para buscar enzimas que cortaran los polimorfismos encontrados en las secuencias estudiadas de los FT.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Extracción de RNA

Se creó un banco de RNAs de las muestras y se verificó la calidad de estos geles de agarosa (Figura 12).

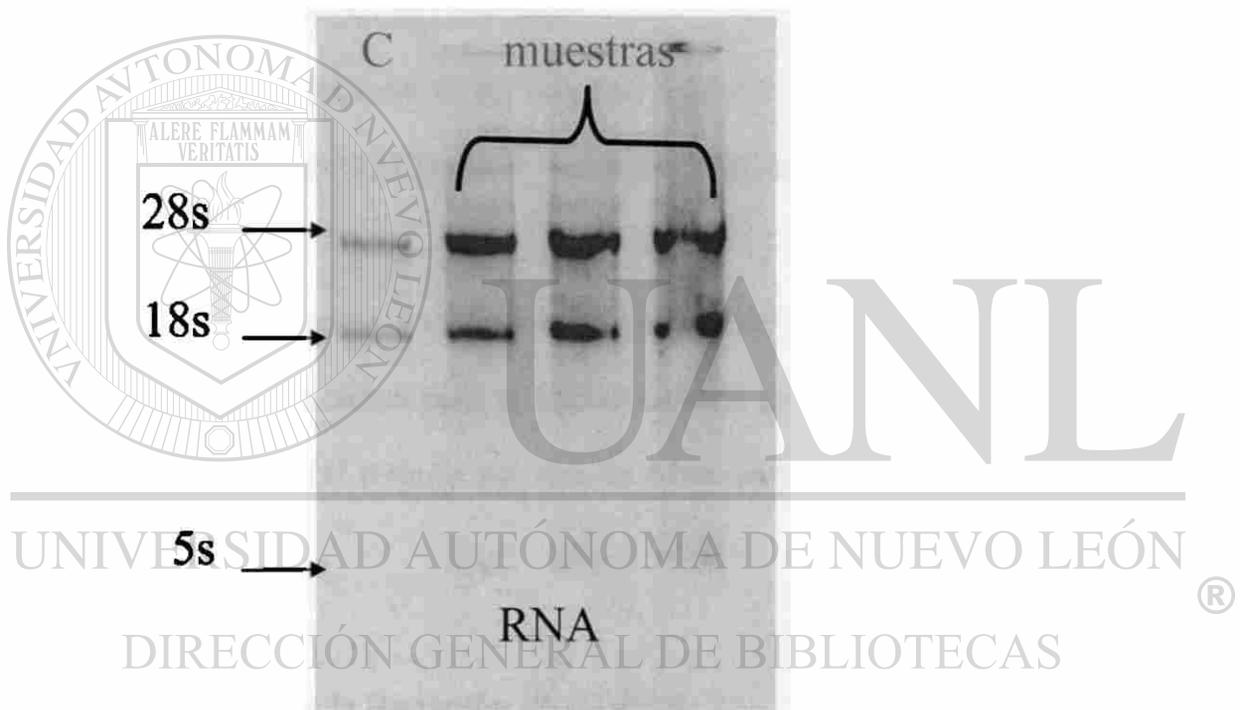


Figura 12.-RNA en gel de Agarosa al 1%. El carril C es un RNA de sangre que se usó como marcador en donde se observa las subunidades ribosomales 28s y 18s, en los siguientes carriles son tres muestras en las cuales se observan tanto las subunidades 28s, 18s y la 5s.

5.2 Diseño de Oligonucleótidos

Las secuencias de los FT estudiados se encontraron en GenBank como sigue a continuación:

1: NM_006237 Homo sapiens POU domain, class 4, transcription factor 1 (POU4F1), mRNA

gi|20127494|ref|NM_006237.2|[20127494]

2:NM_004575 Homo sapiens POU domain, class 4, transcription factor 2 (POU4F2), mRNA

gi|4758947|ref|NM_004575.1|[4758947]

3:XM_007245 Homo sapiens YY1 transcription factor (YY1), mRNA

gi|13647907|ref|XM_007245.3|[13647907]

4:XM_043760 Homo sapiens POU domain, class 2, transcription factor 1 (POU2F1), mRNA gi|20538219|ref|XM_043760.5|[20538219]

En base a estas secuencias y utilizando los programas Oligo 4.0 y Amplify 1.2, se diseñaron oligonucleótidos para la secuencias de los dominios de unión al DNA de los FT YY1, Oct1 (Figura 13), Brn-3a y Brn-3b (Figura 14).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.3 Estandarización de la Reacción de RT-PCR

Una vez teniendo los RNAs extraídos y los oligonucleótidos, se procedió a la estandarización de la reacción de RT-PCR. Para la RT se utilizaron las condiciones descritas en la tabla 4. Al DNAc obtenido se le hizo la PCR, siendo las condiciones estandarizadas para la amplificación de YY1 y Oct1 las que se observan en la tabla 5 y para Brn-3b y Brn-3a de la tabla 6.

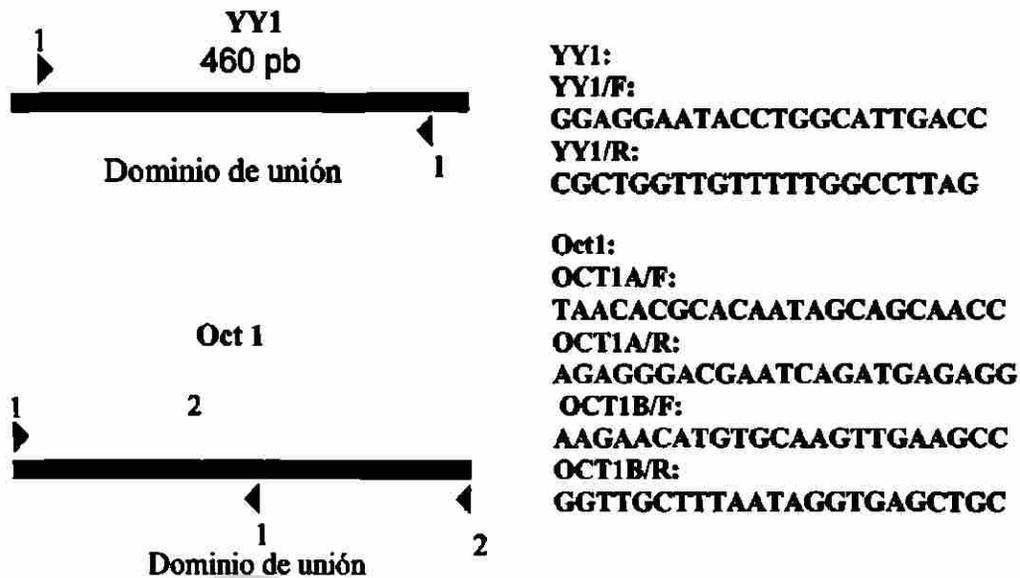


Figura 13.-Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para YY1 y Oct1. En la parte superior izquierda se esquematiza el diseño de los oligonucleótidos para los FT YY1 y Oct1; en la parte superior derecha se observa las secuencias de los oligonucleótidos. En la parte inferior izquierda se esquematiza el diseño de los oligonucleótidos para los Oct1 y en la parte inferior derecha se observa las secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos.

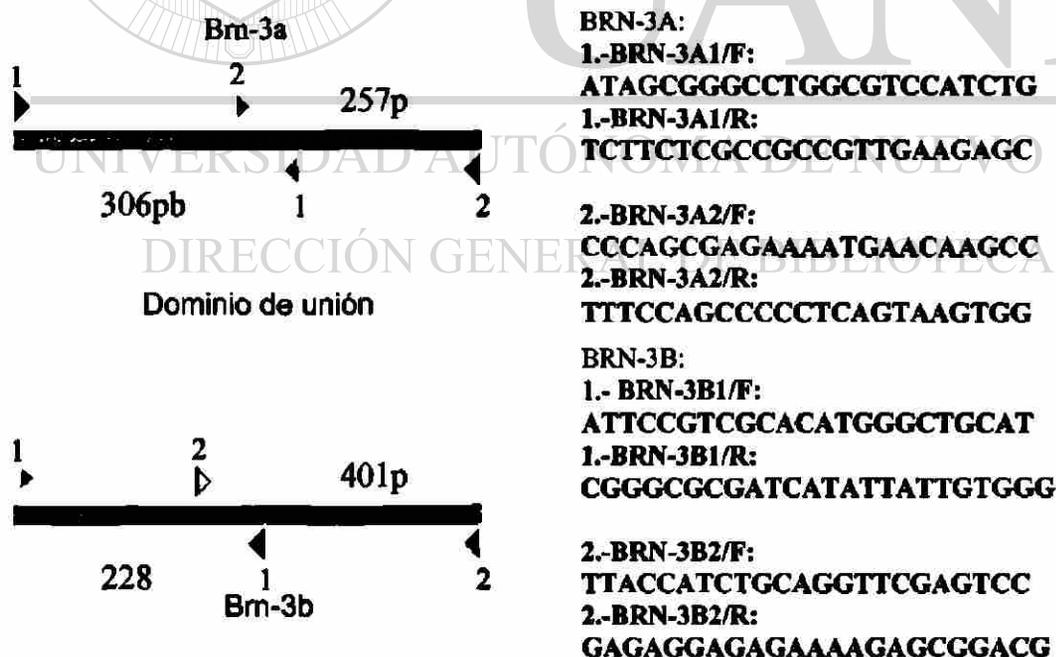


Figura 14.- Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para Brn-3a y Brn-3b. En la parte superior izquierda se esquematiza el diseño de los oligonucleótidos para los Brn-3a y en la parte superior derecha se observa la secuencia de los oligonucleótidos. En la parte inferior izquierda se esquematiza el diseño de los oligonucleótidos para los Brn-3b y en la parte inferior derecha se observa la secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos.

Tabla 4 - Condiciones finales para la RT de los FT.

Reactivos	Volumen	Concentración final
RNA de sangre periférica	4 a 8 μ l	200 a 400 ng/ μ l
random primers (0.5 μ g/ μ l)	2 μ l	0.09 a 0.07 μ g/ μ l
Buffer 5X	2 μ l	0.9 a 0.8X
dNTPs (10mM)	1 μ l	0.9mM a 0.67mM
DTT (100 mM)	1 μ l	9mM a 6.7 Mm
RNAsin (20U/ μ l)	0.5 μ l	0.9 a 0.7 U/ μ l
BSA (10U/ μ l)	0.2 μ l	0.19 a 13 U/ μ l
MMLV-RT (2 U/ μ l)	0.2 μ l	0.04 a 0.03 U/ μ l
H2O	---	---
Volumen total	10.9 a 14.9 μ l	---

La variaciones más importantes de las condiciones iniciales para la RT fueron la cantidad de RNA que se utilizó, al principio se agrego 50 ng y se termino agregando de 200 a 400 ng, otro cambio fue el aumento de random primers, del cual se utilizaba 0.05 μ g/ μ l y finalmente se utilizó de 0.07 a 0.09 μ g/ μ l.

En las condiciones de PCR los cambios se enfocaron el las concentraciones de $MgCl_2$ y la temperatura de apareamiento, esto fue para mejorar tanto la astringencia de las reacciones, como la intensidad de las bandas obtenidas. Todas las condiciones de estandarización para los FT se tuvieron que hacer muy astringentes, ya que los PCR generaban muchas inespecificidades.

Tabla 5.- Condiciones de amplificación de la PCR para YY1 y Oct1.

Reactivos para YY1	Concentración	Reactivos para Oct1	Concentración
Buffer 10X	1X	Buffer 10X	1X
dNTPs (10mM)	0.24 mM	DNTPs (10mM)	0.24 mM
MgCl ₂ 25 mM	0.9 mM	MgCl ₂ 25 mM	0.75 mM
YY1F 5 μ M	0.4 μ M	Oct1F 5 μ M	0.4 μ M
YY1R 5 μ M	0.4 μ M	Oct1R 5 μ M	0.4 μ M
Taq gold 5U/ μ l	0.1U/ μ l	Taq gold 5U/ μ l	0.1U/ μ l
H ₂ O	10.9	H ₂ O	10.9
DNAc	5 μ l	DNAc	5 μ l
Volumen total	25 μ l	Volumen total	25 μ l

Tabla 6.- Condiciones de amplificación de la PCR para Brn-3b y Brn-3a.

Reactivos para Brn-3b	Concentración	Reactivos Para Brn-3a	Concentración
Buffer 10X	1X	Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.25 mM	MgCl ₂ 25 mM	1.6 mM
dNTPs (10mM)	0.24 mM	DNTPs (10mM)	0.24 mM
Brn-3b1R 5 μ M	0.4 μ M	Brn-3 ^a 1R 5 μ M	0.4 μ M
Brn-3b1F 5 μ M	0.4 μ M	Brn-3 ^a 1F 5 μ M	0.4 μ M
Taq gold 5U/ μ l	0.1U/ μ l	Taq gold 5U/ μ l	0.1U/ μ l
H ₂ O	13.25	H ₂ O	10.9
DNAc	3 μ l	DNAc	5 μ l
Volumen total	25 μ l	Volumen total	25 μ l

Para verificar que las condiciones de amplificación de los PA de YY1, Oct1, Brn-3a y Brn-3b, se hicieron electroforesis en geles de agarosa al 2% (Figura 15).

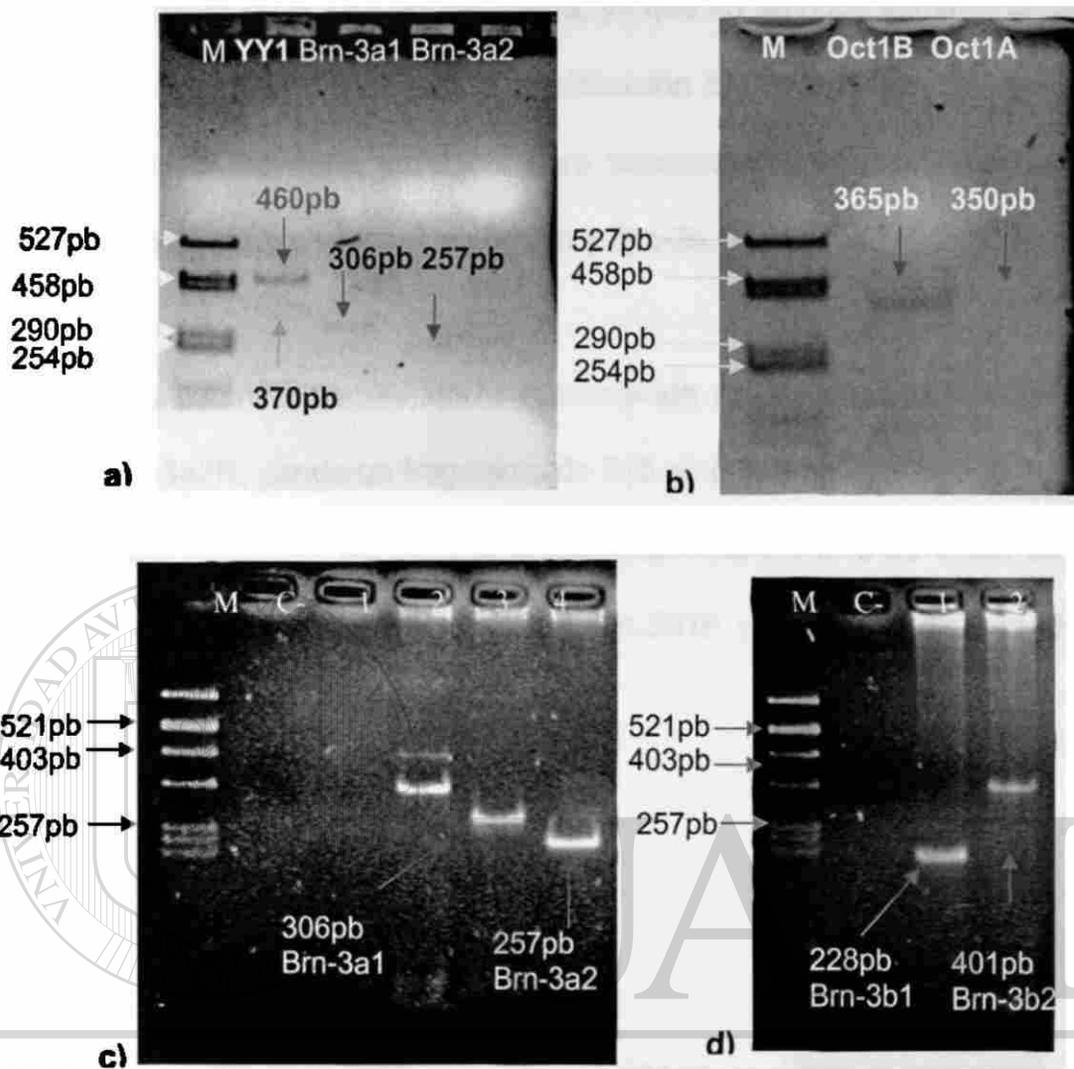


Figura 15.- Gel de Agarosa al 2% de los PA de YY1, Oct1, Brn-3a y Brn-3b.

a) El carril M es un marcador de peso molecular, en el carril YY1 es la estandarización del FT YY1 en donde se observa la banda de 460 pb que es la esperada y otra banda de 370 pb que posiblemente es una inespecificidad, en los carriles Brn-3a1 y Brn-3a2 son productos muy débiles del FT Brn-3a. b) El carril M es un marcador de peso molecular, en el carril Oct1B se observa una banda de 365 pb que es el segundo fragmento del FT Oct1, en el carril Oct1A se observa una banda de 350 pb que corresponde al primer fragmento del dominio de unión al DNA del FT Oct1. c) El carril M es un marcador de peso molecular, en el carril C- es el control negativo de la reacción, los carriles 1 y 2 son amplificaciones del FT Brn-3b no estandarizados, el carril 3 esta el PA de Brn-3a1 de un tamaño de 306 pb y por ultimo en el carril 4 esta el PA de Brn-3a2 de un tamaño de 257 pb. d) El carril M es un marcador de peso molecular, en el carril C- es el control negativo de la reacción, en el carril 1 es la amplificación del fragmento Brn-3b1 y en el carril 2 es el PA del fragmento de Brn-3b2.

La estandarización de YY1 no fue buena, ya que no se pudo eliminar la banda de 370 pb. En el caso de Oct1 la amplificación fue muy tenue, por lo que la cantidad de PA no sería suficiente para secuenciar, y consecuentemente el trabajo de esta tesis se enfocó en Brn-3a y Brn-3b.

Una última estandarización fue la combinación de los oligonucleótidos Brn-3a1F y Brn-3a2R, dando un fragmento de 515 pb que amplifica todo el dominio de unión del factor Brn-3a. Para la amplificación del dominio de unión de Brn-3b, se combinaron los oligonucleótidos Brn-3b1F y Brn-3b2R, resultando un fragmento de 570 pb (Figura 16).

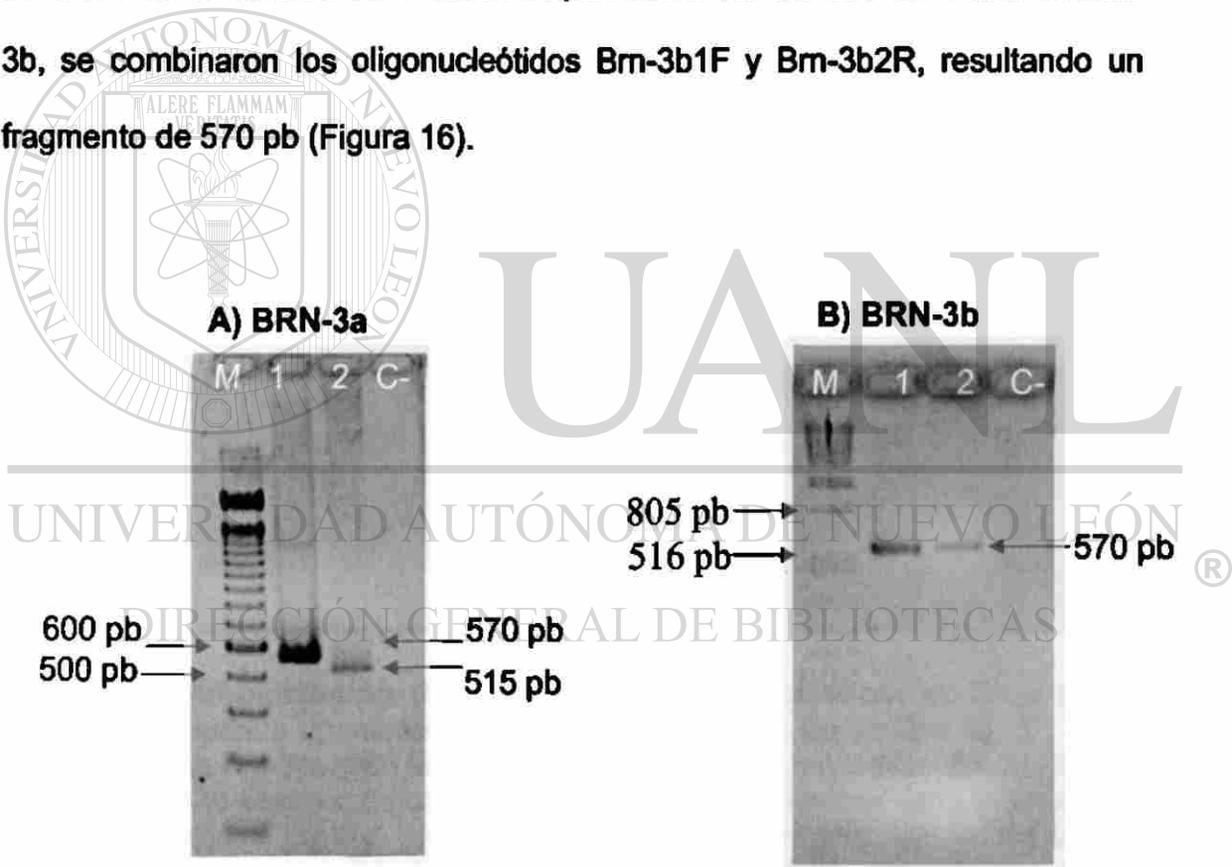


Figura 16- Gel de Agarosa al 2% de los PA de Brn-3a y Brn-3b. A) Brn-3a: En el carril M se encuentra un marcador de 100 pb, donde la primera banda de 100 pb no se observa debido al corte del gel, en el carril 1 es una estandarización de Brn-3b, en donde no se pudo obtener una sola banda y por ultimo en el carril 2 se encuentra el PA de Brn-3a de un tamaño aproximado de 515 pb, la cual es una banda única. B) Brn-3b: En el carril M se encuentra un marcador de PM λ +PstI, los carriles 1 y 2 se encuentran productos de Brn-3b de un tamaño de 570 pb, los cuales son bandas únicas.

5.4 Amplificación de los dominios de unión de los FT Brn-3a y Brn-3b

La amplificación del dominio de unión de Brn-3a se llevó a cabo para todos los RNAs almacenados a -70°C . De las 100 muestras de RNA analizadas, 70 muestras amplificaron de las cuales dos no dieron el tamaño de banda esperado de 515 pb, las 30 muestras restantes no se pudieron amplificar por la metodología de RT-PCR para el FT Brn-3a (Figura 17). Pero ese mismo DNAC se utilizó para amplificar Brn-3b, para el cual las 100 muestras amplificaron, solo 1 muestra tubo un tamaño de banda menor al esperado de 570 pb (Figura 18).

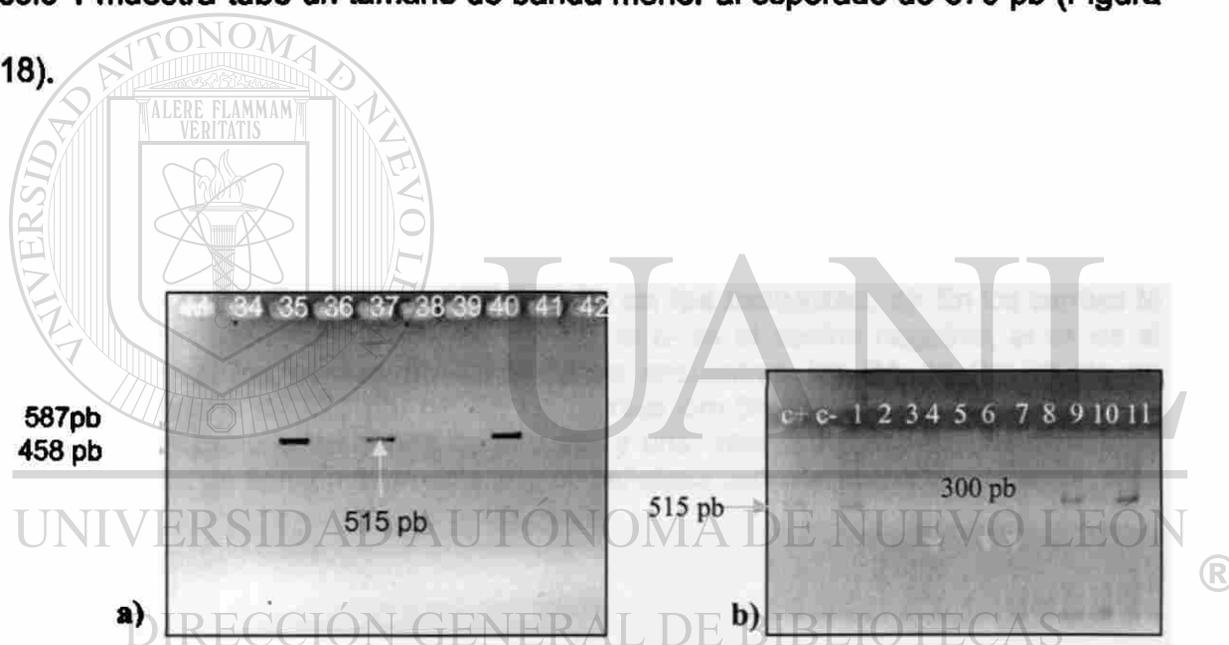


Figura 17.- Amplificación del FT Brn-3a en las muestras. a): En el primer carril M se encuentra un marcador de PM PBS+HaeIII, en los carriles 35, 37, 40 se observan PA de Brn-3a de un tamaño de banda de 515 pb, en los carriles 34, 36, 38, 39, 41 y 42, no se observa amplificación para este FT. **b):** El primer carril se encuentra c+ que es un control positivo, en el c- se encuentra el control negativo, en los carriles 1, 9 y 11 se encuentran PA del tamaño esperado de 515 pb, mientras que en los carriles 4, 6 y 7 se observan productos de menor tamaño de aproximadamente 300 pb.

5.5.- Secuenciación de los PA de los FT Brn-3a y Brn-3b

Los productos de la RT-PCR, que fueron 70 para Brn-3a y 100 para Brn-3b se purificaron, las muestras que se obtuvieron más de dos bandas se les aumento

la temperatura para eliminar las bandas inespecíficas. Todos los PA se sometieron a secuenciación para obtener las secuencias de cada una de las muestras y posteriormente se compararon con la secuencia normal reportada en el banco de genes llamado GenBank (Figura 19).

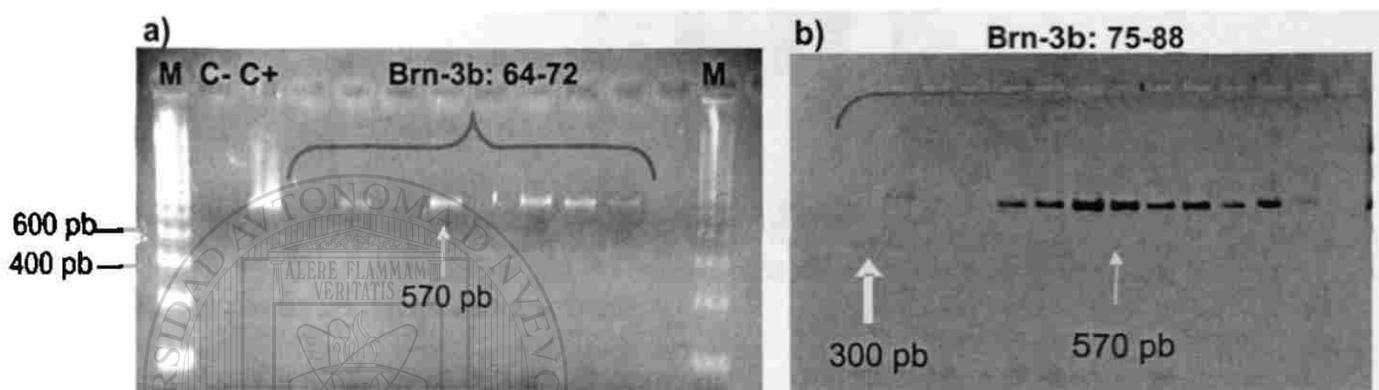


Figura 18.- Amplificación del FT Brn-3b en las muestras. a): En los carriles M se encuentran escaleras de PM de 100 pb, el c- es el control negativo, el c+ es el control positivo, los carriles Brn-3b:64-72 se encuentran los PA de Brn-3b de un tamaño de banda de 570 pb. **b):** En los carriles Brn-3b:75-88 se encuentran PA de Brn-3b de un tamaño de banda de 570 pb y una muestra presentó una banda de menor tamaño de aproximadamente 300 pb señalada con una flecha amarilla.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para el dominio de unión al DNA del FT Brn-3a, cuatro muestras presentaron cambio nucleotídico, los cuales dan como resultado mutaciones con cambio de sentido. Dos de las muestras presentan el mismo cambio de a.a. (N296Y), una muestra presenta el cambio a.a. C260S y la cuarta muestra presentó cuatro cambios nucleotídicos de los cuales, uno es silencioso y los otros tres son mutaciones con sentido (Tabla 7).

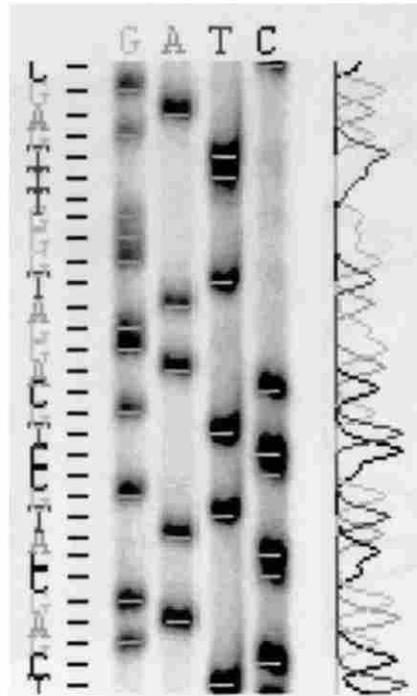


Figura 19. Ejemplo de un gel de secuenciación de Brn-3a y Brn-3b. Este es un ejemplo de un gel de secuenciación.

En la figura 20 se puede observar un ejemplo de los cambios encontrados en el dominio de unión de Brn-3a.

Tabla 7.- Polimorfismos encontrados en el FT Brn-3a.

Muestra	Cambio	Sitio de la mutación	Alteración de la secuencia	Efecto en la proteína
33	S CS	POU (N-terminal)	G855A A856G G858A A860G	V 285V T286A Q287R
39, 55	CS	POU (N-terminal)	A886T	N296Y
123	CS	Fuera de POU	G779C	C260S

S= mutación silenciosa

CS= mutación de sentido

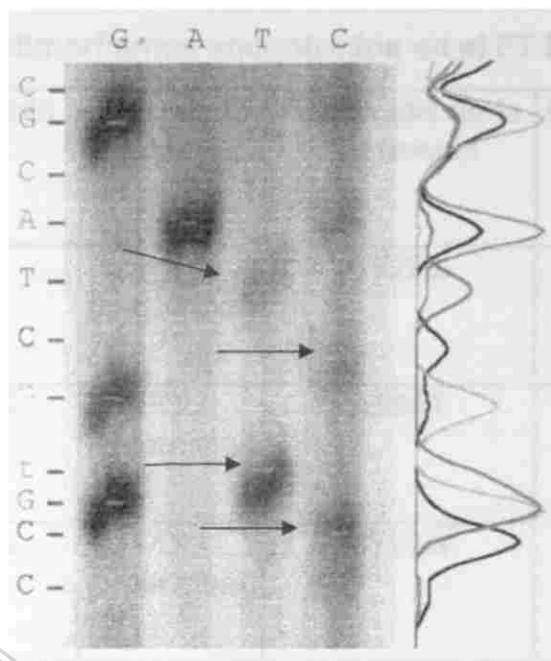


Figura 20.- Gel de secuenciación de Brn-3a donde se muestra polimorfismos. Este gel es de la muestra 33 secuenciada con el oligonucleótido Brn-3a2R, los cambios están señalados por flechas. De arriba para abajo el primer cambio es Val285Val (G855A), el segundo es Thr286Ala (A856G, G858A) y el último Glu287Arg (A860G).

Todos los cambios encontrados en el dominio de unión de Brn-3a se localizaron en la región POU, con excepción del C260S, que se encuentra en un codón externo hacia el extremo 3' del dominio POU.

Para Brn-3b se encontraron 7 muestras con cambios nucleotídicos. Cinco de ellas presentaron el cambio nucleotídico silencioso C929G (S309S). Una muestra presentó el cambio nucleotídico A858T, generando una mutación con cambio de sentido (N286Y), el cual es el mismo presentado en dos muestras de Brn-3a (N296Y). La última muestra presenta el cambio nucleotídico C763G, el cual genera una mutación con cambio de sentido (A254G) (Tabla 8).

Tabla 8. –Polimorfismos encontrados en el FT Brn-3b.

Muestra	Cambio	Sitio de la mutación	Alteración de la secuencia	Efecto en la proteína
6, 15, 17, 56, 70	S	POU (N-terminal)	C929G	S309S
29	CS	POU (N-terminal)	A858T	N286Y
47	CS	POU (N-terminal)	C763G	A254G

Los cambios presentados en Brn-3b también se localizan en la región POU del dominio de unión, la misma región en donde se encontraron los cambios para Brn-3a. En la figura 21 se observan algunos ejemplos de los polimorfismos encontrados en Brn-3b.

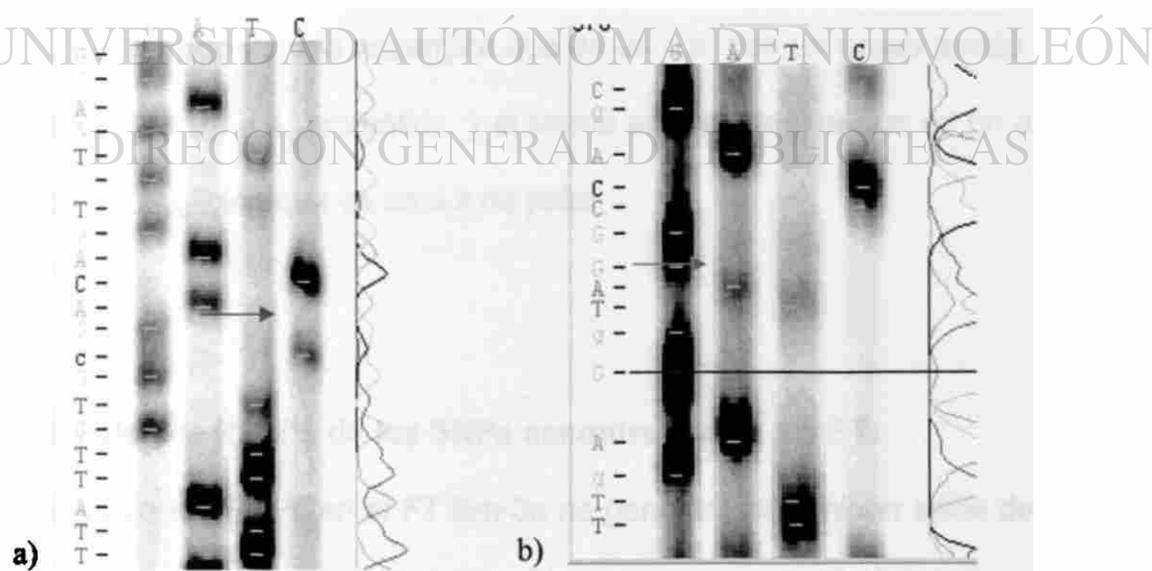


Figura 21.- Geles de secuenciación de Brn-3b donde se muestran polimorfismos. a) El cambio presentado en esta muestra fue de una G por C con el oligonucleótido Brn-3a2R (señalado por una flecha), al realizar el cambio reverso-complementario el polimorfismo es C929G. b) El cambio presentado en esta muestra fue una A por T con el oligonucleótido Brn-3a2R (señalado por una flecha), al realizar el cambio reverso-complementario el polimorfismo es A858T.

5.6 Cambios bioquímicos generados por los SNPs en las proteínas.

Los SNPs encontrados en el FT Bm-3a dan como resultado cuatro cambios aminoácidos (T286A, Q287R, N296Y, C260S) y un cambio silencioso (V285V). El primero es una treonina que es un a.a polar por una alanina que es un a.a no polar, el segundo es una glutamina de carga neutra por una arginina de carga positiva, el tercero es una aspargina que es un a.a. con un grupo amida por la tirosina que es una a.a. aromático, el cuarto es una cisteína que es un a.a. con un grupo de azufre por una serina que es un a.a. con un grupo hidroxilo, y el último que no genera cambio a.a. por lo que no genera ningún cambio bioquímico.

Los SNPs encontrados en el FT Bm-3b dan como resultado un cambio silencioso (S309S) y dos cambios aminoácidos (N286Y, A254G). El primero no genera cambio bioquímico en la proteína, debido a que es una serina por serina, el segundo es una aspargina que es un a.a. con un grupo amida por la tirosina que es un a.a. aromático, y el último es una alanina que es un a.a. no polar por una glicina que es un a.a no polar.

5.7 Análisis por RFLPs de los SNPs encontrados en los FT.

El análisis de los SNPs en el FT Bm-3a no generan, ni eliminan sitios de corte para enzimas de restricción. Para el FT Bm-3b, solo un SNP (A858T) ocasiona que se pierda el sitio de corte con las enzimas de restricción Bal I y MscI (ver figura 22).



Figura 22.- Análisis por enzimas de restricción para el polimorfismo A858T. Las enzimas Bal I y MscI cortan la secuencia normal (N) del dominio amplificado del FT Bm3B en el sitio TGG/CCA, dando dos bandas de 134 pb y 436 pb. La secuencia con el polimorfismo (29) pierde el sitio del corte por lo que en un gel de agarosa se observara una sola banda de 570 pb.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Existen numerosos estudios sobre la expresión y regulación de los FT Bm-3a y Bm-3b en diversos cánceres: como el aumento de 300 veces el FT Bm-3a en pacientes con NIC III, comparándolas con mujeres sanas (42), o que en tumores mamarios los niveles reducidos de BRCA-1 muestran una expresión aumentada de Bm-3b, lo cual sugiere un posible rol de este FT en la regulación de la expresión de BRCA-1 (65) y de la expresión aumentada de Bm-3a en tumores neuroendocrinos agresivos, pudiendo ser los responsables de la proliferación de las células malignas (66). Pero no existe ningún estudio hasta ahora sobre la presencia de SNPs en los dominios de los FT, los cuales podrían alterar la afinidad de los FT al sitio de unión al DNA, provocando una alteración en la expresión de los genes celulares y virales que regulan estos factores. Particularmente en el CaCU estos cambios podrían provocar un cambio en la afinidad entre los factores y la región LCR del VPH, potenciando la expresión de E6 y E7, produciendo una desregulación del ciclo celular y desencadenando la transformación maligna. Por otro lado, estos cambios en la afinidad podrían disminuir la unión de éstos a la región LCR, pudiendo provocar que la expresión de E6 y E7 también disminuya, explicando porqué algunos huéspedes infectados con VPH nunca desencadenarán CaCU.

Al amplificar los dominios de unión al DNA de los FT, treinta de las muestras no amplificaron para Brn-3a, esto puede deberse a que la expresión del FT esta muy baja en las personas sanas en comparación de una enferma (Daniel Ndisang et al. 1998), ya que el mismo DNAC se utilizó para amplificar el FT Brn-3b, el cual si pudo detectarse por esta metodología. Al realizar la RT-PCR para los FT Brn-3a y Brn-3b se detectaron bandas de corrimiento electroforetico de menor tamaño al esperado, pero al hacer las reacciones para la secuenciación el tamaño de las bandas y las secuencias fueron normales, por lo que las bandas obtenidas de menor tamaño eran artificios de la RT-PCR.

Los cambios encontrados en el FT Brn-3a dan como resultados cambios aminoacídicos. Aunque solo un polimorfismo se repite en dos muestras (N296Y), la mayoría ocurren en la región amino terminal del dominio POU, región muy importante para la unión FT-DNA. Además, la mayoría de estos cambios no sinónimos probablemente cambie las propiedades físico-químicas, la estructura y función de la proteína (Figura 23). Estos SNPs podrían generar un cambio en la afinidad de el FT con sus sitios de unión al DNA, provocando una mayor expresión o represión del gen que están regulando, provocando alteraciones en la vía en la cual el gen participa y en conjunto con algún otro factor alterado podrían generar una patología. Solo un cambio a.a. cae fuera del sitio POU (Q287R), por lo que posiblemente esta mutación no genere un cambio relevante en la afinidad del FT con el sitio de unión al DNA, no alterándose así la expresión de los genes que este regulando el FT (Figura 24).

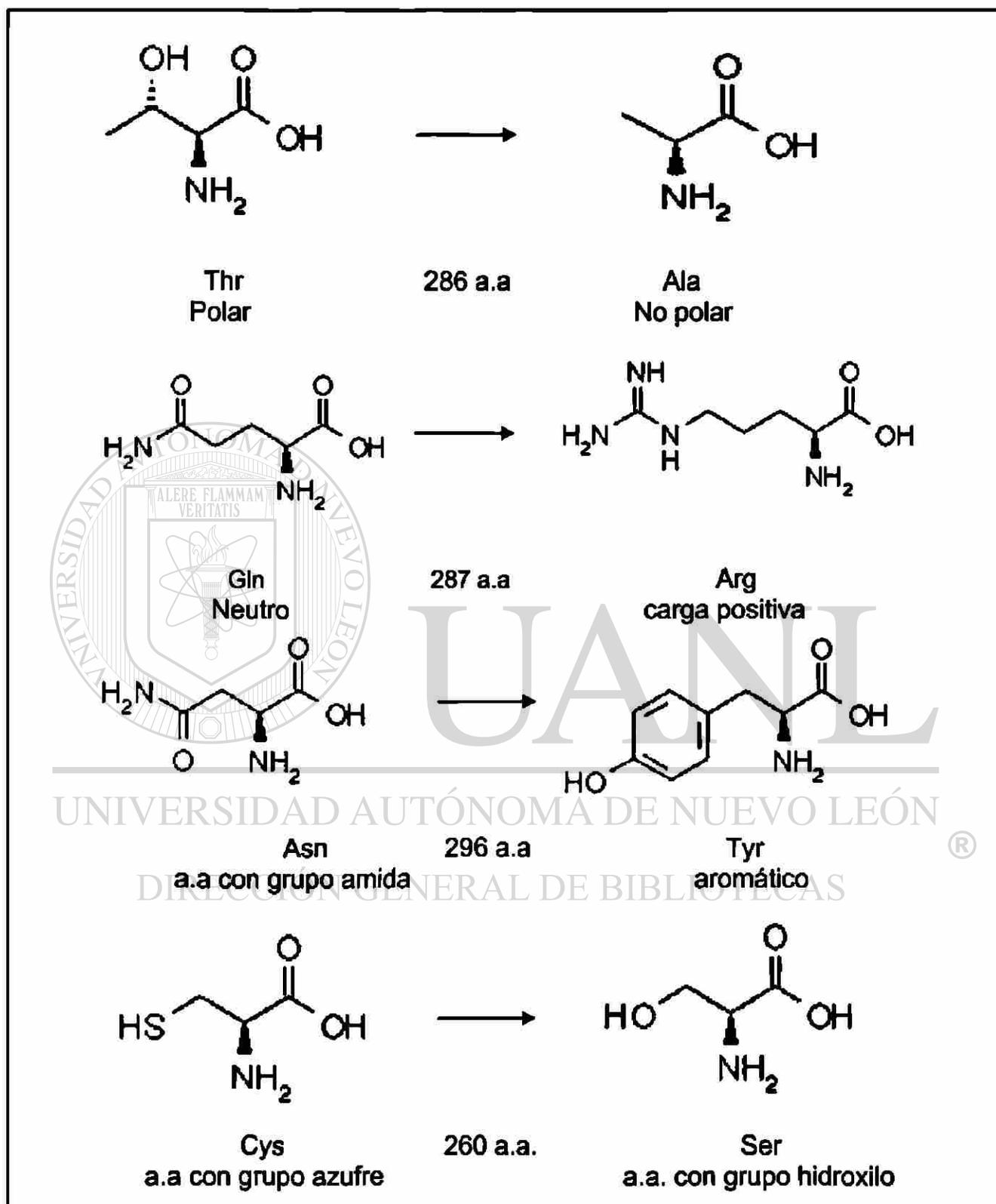
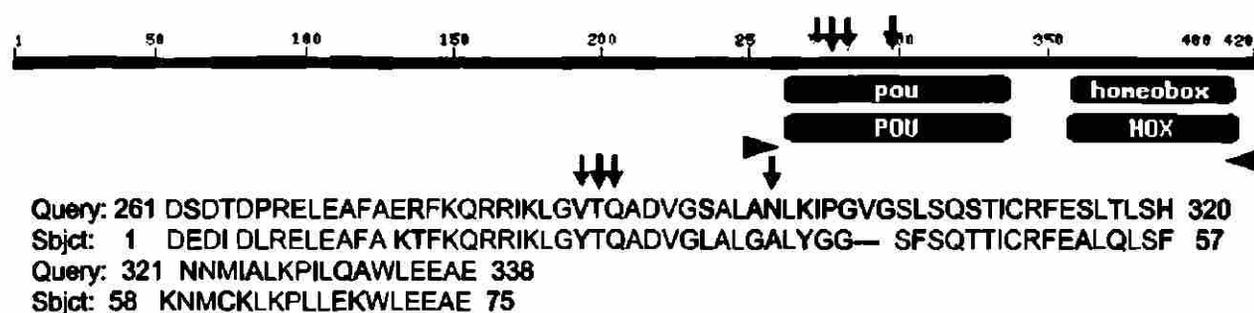


Figura 23.- Cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones con cambio de sentido en Brn-3a. Como pueden observarse todas las mutaciones ilustradas producen un cambio de a.a por otro de propiedades físico-químicas diferentes.



BRN-3A: Val 285Val, Thr286Ala, Glu287Arg, Asp296Tyr, Cys260Ser

Figura 24.- Esquema tridimensional del FT Brn-3a. El FT Brn-3a tiene aproximadamente 420 a.a. del cual se analizó la región del homodominio (formado por la región POU y el homeobox) que corresponde del 261 al 420 a.a. Los cinco cambios encontrados en la proteína se señalan con flechas tanto en el dibujo de la proteína, como en la secuencia del dominio POU en la parte de abajo.

Por otra parte el polimorfismo más común encontrado en Brn-3b (C929G: cinco muestras) no generan cambios aminoacídicos (S309S), por lo que no tendrá ningún efecto en la afinidad del FT con su sitio de unión al DNA, no alterándose la expresión del gen que esta regulando.

Solo dos muestras presentaron cambio aminoacídico en el FT Brn-3b, los cuales ocurren en la región amino terminal del dominio POU, curiosamente en la misma región que presenta cambios el FT Brn-3a (Figura 25). Estos polimorfismos también podrían generar un cambio en la afinidad del FT con sus sitios de unión al DNA, provocando una desregulación del gen que esta controlando y alterando la vía en la cual el gen participa.

Una de estas dos muestras tubo un cambio en el aminoácido N286Y para el FT Brn-3b. Esta mutación genera un cambio de a.a. que alteraría las propiedades físico-químicas del factor y lo convierte en un candidato muy serio para buscarlo en algunas patologías neoplásicas (Figura 26).

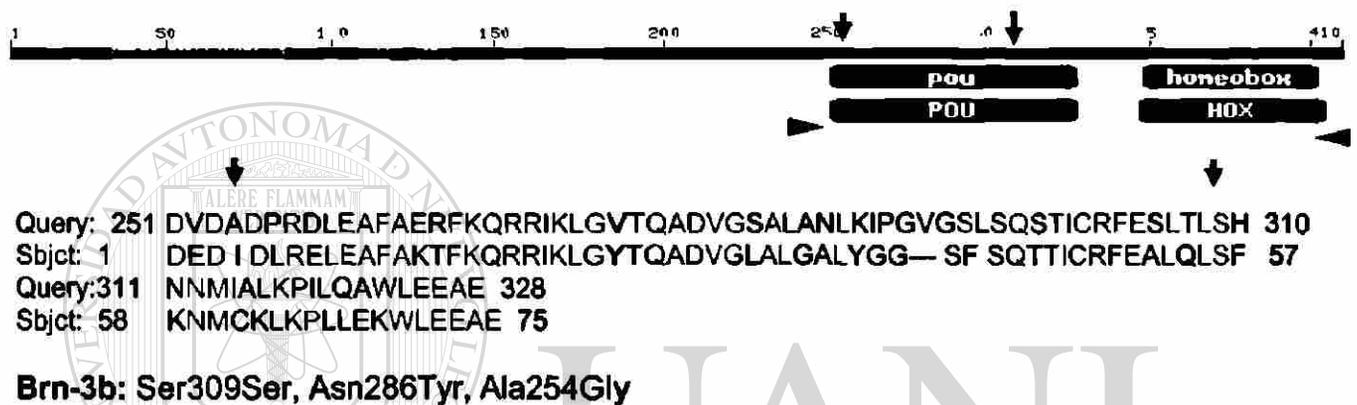


Figura 25.- Esquema tridimensional del FT Brn-3b. El FT Brn-3b tiene aproximadamente 415 a.a. del cual se analizó la región del homodominio (formado por la región POU y el homeobox) que corresponde del 250 al 415 a.a. Los tres cambios encontrados en la proteína se señalan con flechas tanto en el dibujo de la proteína, como en la secuencia del dominio POU en la parte de abajo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los SNPs encontrados en Brn-3a y Brn-3b en mujeres sanas podrían buscarse en pacientes de manera más directa y más fácil utilizando RFLPs. Aunque solo un polimorfismo podría analizarse por enzimas de restricción, para los demás se podrían diseñar oligonucleótidos que creen sitios de restricción y así poder analizarlos.

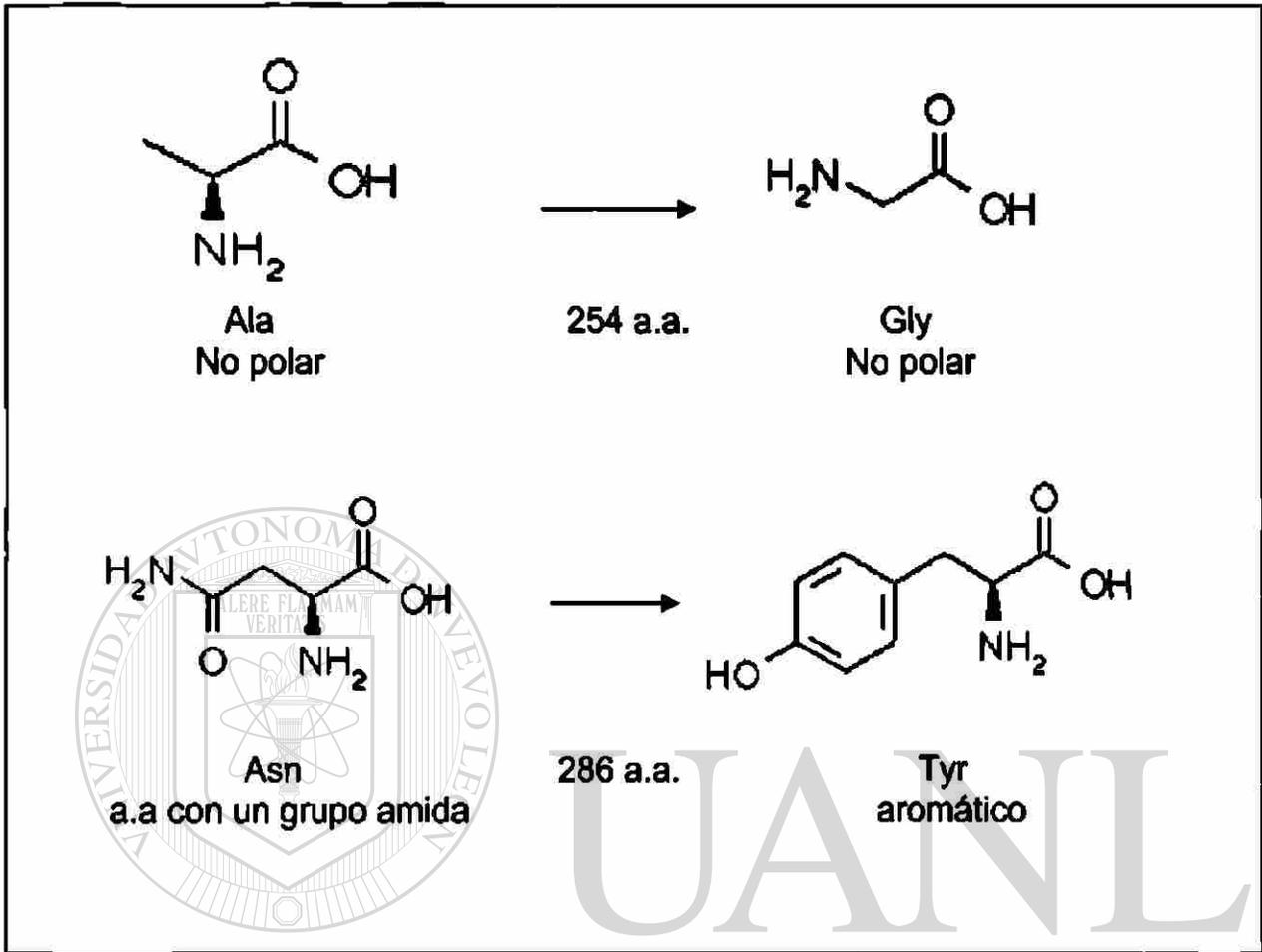


Figura 26.- Cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones con cambio de sentido en Brn-3b. Como pueden observarse las dos mutaciones ilustradas producen un cambio de a.a por otro. Sin embargo el cambio mas importante es el Asn286Tyr el cual provoca un cambio de a.a. de propiedades fisico-químicas diferentes.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en el presente trabajo, permite concluir lo siguiente:

- Si existen polimorfismos en los FT Brn-3a y Brn-3b.
- En el 30% de las muestras no se detectó Brn-3a.
- En el dominio de unión del FT Brn-3a, se encontraron 5 polimorfismos, de los cuales 4 predicen cambio a.a.
- La frecuencia polimórfica encontrada en el dominio de unión de Brn-3a fue del 5.7%.
- En el dominio de unión del FT Brn-3b, se encontraron 7 polimorfismos, de los cuales solo 2 predicen cambio a.a.
- La frecuencia polimórfica encontrada en el dominio de unión de Brn-3b fue del 7%.
- El único polimorfismo analizable con enzimas de restricción (Ball y MscI) es el A858T (Asn286Tyr).
- La mayoría de los polimorfismos en Brn-3a y Brn-3b se localizan en el dominio POU.

CAPÍTULO VIII

PERSPECTIVAS

❖ Hacer un estudio de casos (CaCU, tumores neuroendocrinos y tumores mamarios) y controles (sanas) para comparar las frecuencias de polimorfismos de factores Brn.

❖ Medir la expresión de Brn-3a y Brn-3b en tejidos con CaCU, tumores neuroendocrinos, etc.

❖ Estudiar las interacciones de las proteínas Brn polimórficas con la región LCR del VPH de alto riesgo.

❖ Hacer un estudio *in vitro* e *in vivo* del posible efecto terapéutico de los FT Brn-3a y Brn-3b.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

1. López-Ríos O, Lazcano-Ponce EC, Tovar-Guzmán V, Hernández-Avila M. La epidemia de cáncer de mama en México ¿Consecuencia de la transición demográfica?. Salud Pública de México. 1997 Vol. 39(4): 1-7.
2. Cancer Statistics (1998). A Journal of the American Cancer Society.
3. <http://www.iladiba.com.co/upr/2001/no012001/htm/cancer.asp>
4. Departamento de Estadística e Informática del INEGI (1997) Secretaria de Salud en Nuevo León.
5. Mohar A, Frias M, Suchil L. Epidemiología descriptiva del cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. Salud Pública de México, 1997; Vol. 39(4):253-258.
6. Stern Peter L. and Stanley Margaret A. (1994). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. Biology and Immunology. Chapte 4, 72-87.
7. Schneider A. and Koutsky L. (1992). Epidemiology of Cervical Cancer and of HPV infection. In Epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer (eds. N. Muñoz, F. X. Bosch, K. V. Shah and A. Meheus), Vol 119, pp.3-53. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
8. Helland A, Olsen AO, Gjoen K, Akselsen HE, Sauer T, Mangus, Borresen-Dale AL, Ronningen KS. An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II-III among human papillomavirus positive patients with the HLA-DQA*0102-DQB1*0602 haplotype: a population-based case-control study of Norwegian. Int J Cancer 1998 Mar 30; 76 (1): 19-24.

9. Kari Syrjanen and Stina Syrjanen. Papillomavirus Infections in human pathology. John wiley & sons, LTD 2000; 12- 51pag.
10. Alan Storey, Miranda Thomas, Ann Kalita et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer Nature May 1998; 393.
11. Klaes R, Ridder R, Schaefer U, Benner A, Von Knebel Doeberitz M. No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus associated cervical cancer. J Mol Med; 77:299-302. 1999.
12. Wang NM, Tsai CH, Yeh KT, Chen SJ, Chang JG. P53 codon 72 Arg polymorphism is not a risk factor for carcinogenesis in the chinese. Int J Mol Med; 4: 249-52. 1999
13. Prokopakis P, Sourvinos G, Koumantaki Y, Koumantakis E, Spandidos DA. K-ras mutations and HPV infection in cervicitis and intraepithelial neoplasias of cervix. Oncol Rep. 2002 Jan-Feb;9(1):129-33.
14. Stenzel A, Semczuk A, Rozynskal K, Jakowicki J, Wojcierowski J. Low - risk and high-risk HPV- infection and K-ras gene point mutations in human cervical cancer: a study of 31 cases. Pathol Res Pract. 2001; 197 (9):597-603.
15. Alonio LV, Dalbert D, Picconi MA, Cervantes Vazquez G, Garcia Carranca A, Distefano AL, Mural J, Bartt O, Bazan G, Teyssie AR. Ha-ras and p53 gene mutations scanned by PCR-SSCP in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix associated with human papillomavirus. Medicina (B Aires). 2000; 60 (6) : 895-901.

16. Li X, Jiao S, Mi R. Clinical significance of p21H-ras expression and H-ras codon 12 mutation in squamous intraepithelial lesion and carcinoma of uterine cervix. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 1997 Jul; 19 (4) : 306-8.
17. Q.C.B, M.C. Sandra Guadalupe Martínez Garza. 2002. Análisis Molecular de los Factores Extrínsecos e Intrínsecos asociados a Cáncer Cérvico-Uterino. Tesis Doctoral.
18. Boring CC, Squires TS, Tong T y Montgomery S. Cancer Statistics,1994. *CA Cancer J Clin* 44:7-26.
19. Cho KR. (1998). Cervical Cancer. In *The Genetic Basis of Human Cancer*. (eds. Vogelstein B, Kinzler KW). Pp.631-637.
20. Krebs HB. (1994). Lesiones premalignas del cuello uterino. En *Ginecología* (eds. Copeland LJ, Jamell JF). Pp.932-60.
21. Harald Sur Hausen. 1991. Viruses in Human Cancers. *Science* 254, 1167-1173.
22. Greg Matlashewski. 1989. The Cell Biology of Human Papillomavirus Transformed Cells. *Anticancer Research* 9: 1447-1556.
23. Sailaja G, Watts RM, Bernard HU. Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancer. *J Gen Virol* 199;80:1715-1724.
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>
25. <http://life.anu.edu.au/viruses//ctv/vf-fst-g.htm>.
26. Demeret, C., Le Moal, M. Thierry, F. Control of HPV18 replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Research* 23, 4777-4784.
27. VPH Home Page. Laboratorio de Terapia Génética. Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV.

<http://cinvestav.mx/genetica/MyFiles/Papillomavirus/PAPindex.htm>. México, D.F., Septiembre,2002.

28. Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol*. 1988 Nov; 62 (11):4321-30.
29. Cripe TP, Alderbom A, Anderson RD, Parkkinen S, Bergman P, Haugen TH, Pettersson U, Turek LP. Transcriptional activation of the human papillomavirus 16 P97 promoter by an 88 nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1 responsive modules. *New Biol*. 1990 May;2(5):450-63.
30. Gius D, Grossman S, Bedell MA, Laimins LA. Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J. Virol*. 1988 Mar; 62(3):665-72.
31. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, et al. Identification of negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: Interaction with the transcription with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J* 1992;11:4607-4617.
32. Butz K, Hoppe-Seyler F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: Composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol* 1993;67:6476-6486.
33. Chong T, Apt D, Gloss B, et al. The enhancer of human papillomavirus type 16: Binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, AND AP-1 Participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* 1991; 65:5933-5943.
34. Chong T, Chan WK, Bernard HU. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP-1, steroid receptors and a possibly

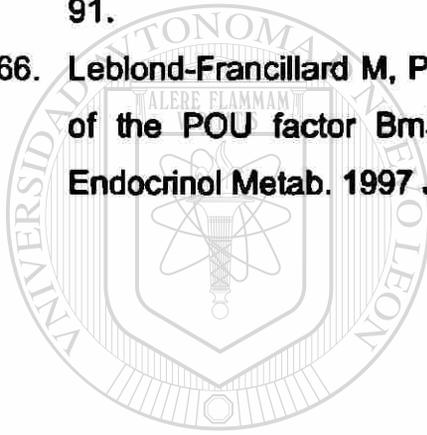
- novel transcription factor, PVF: A model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:465-470.
35. Hoppe-Seyler F, Butz K, zur Hausen H. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol* 1991;65:5613-5618.
36. O'connor M, Bernard HU. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* 1995;207:77-88.
37. Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, et al. Two AP1 sites binding JunB are essential for HPV18 transcription in keratinocytes. *J Virol* 1992;66:3740-3748.
38. Benjamin Lewin, *Genes VII*, Oxford University Press Inc., New York, First published 2000, pag:649-678.
39. William S. Klug and Michael R. Cummings, *Conceptos de genética*, Prentice Hall Iberia, S.R.L. Télec, Madrid, Quinta edición 1999, pag:573-582.
40. www.usask.ca/biology/biol316/316questions/regln.html
41. www.icm.edu.pl/propublico/piekno/modelowanie_czasteczek.htm
42. Ndisang D, Morris PJ, Chapman C, Ho L, Singer A, Latchman DS. The HPV-activating cellular transcription factor Brn-3a is overexpressed in CIN3cervical lesions. *J Clin Invest*. 1998 Apr 15;101(8):1687-92
43. Morris PJ, Dawson SJ, Wilson MC, Latchman DS. A single residue within the homeodomain of the Brn-3 POU family transcription factors determines

whether they activate or repress the SNAP-25 promoter. *Neuroreport* May 1997 27;8(8):2041-5.

44. Vishwanie Budhram- Mahadeo, Peter J. Morris, Martin D. Smith, Carol A. Midgley, Linda M. Boxer, and David S. Latchman. P53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *Journal of biological Chemistry*, May 1999; vol 274:15237-15244.
45. David Strubin M et al. Eucariotic transcription factor. *Cell* 1995;80:497.
46. Gary J. Sibbet, Scott Cuthill, and M. Saveria Campo. The enhancer in the long region of human papillomavirus type 16 is regulated by PEF-1 and down-regulated by Oct-1. *Journal of Virology* July 1995;4006-4011.
47. Usheva, A. and Shenk, T. (1994). TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* 76(6): 1115-1121. Medline abstract.
48. Tobias Bauknecht, Franziska Jundt, Ingrid Herr, Thomas Oehler, Hajo Delius, Yang Shi, Peter Angel, and Harald zur Hausen. A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *Journal of Virology*, Jan 1995; 1-12.
49. Dong XP, Stubenrauch, Beyer-Finkler E, Pfister H. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer*, Sep 1994;15;58(6):803-8.
50. JIANPING YE, Marco Cippitelli, Linda Dorman, John R. Orlando, and Howard A. Young. The nuclear factor YY1 suppresses the human gamma interferon promoter through two mechanisms: inhibition of AP1 binding and activation of a silencer element. *Molecular and Cellular Biology*, Sept. 1996;4744-4753.
51. Riggs KJ, Saleque S, Wong KK, Merrell KT, Lee JS, Shi Y, Calame K. Yin-yang 1 activates the c-myc promoter. *Mol Cell Biol*. Dec. 1993;13(12):7487-95.

52. **Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS et al (1999). Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 400:464-468.**
53. **Wang DG, Fan JB, Siao CJ et al (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077-1082.**
54. **<http://snp.cshl.org/>**
55. **Brookes AJ The essence of SNPs. *Gene*, 1999; 234: 177-186.**
56. **The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2001, 409: 928-933.**
57. **http://www.fbsmres.leeds.ac.uk/users/bgyijd/ijid_topic.htm**
58. **Hishinuma A, Ohyama Y, Kuribayashi T, Nagakubo N, Namatame T, Shibayama K, Arisaka O, Matsuura N, Ieiri T. Polymorphism of the polyalanine tract of thyroid transcription factor-2 gene in patients with thyroid dysgenesis. *Eur J Endocrinol*. 2001 Oct;145(4):385-9.**
59. **Macchia PE. Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism. *Mol Med Today*. 2000 Jan;6(1):36-42.**
60. **Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di Lauro R. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie*. 1999 May;81(5):433-40.**
61. **Hishinuma A, Kuribayashi T, Kanno Y, Onigata K, Nagashima K, Ieiri T. Sequence analysis of thyroid transcription factor-1 gene reveals absence of mutations in patients with thyroid dysgenesis but presence of polymorphisms in the 5' flanking region and intron. *Endocr J*. 1998 Aug;45(4):563-7.**
62. **Hishinuma A, Kuribayashi T, Kanno Y, Onigata K, Nagashima K, Ieiri T. Sequence analysis of thyroid transcription factor-1 gene reveals absence of mutations in patients with thyroid dysgenesis but presence of polymorphisms in the 5' flanking region and intron. *Endocr J* 1998 Aug;45(4):563-7.**

63. Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W; British Paediatric Rheumatology Study Group. A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2001 Aug;44(8):1782-5.
64. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
65. Budhram-Mahadeo V, Ndisang D, Ward T, Weber BL, Latchman DS. The Bm-3b POU family transcription factor represses expression of the BRCA-1 anti-oncogene in breast cancer cells. *Oncogene*. 1999 Nov 18;18(48):6684-91.
66. Leblond-Francillard M, Picon A, Bertagna X, de Keyzer Y. High expression of the POU factor Bm3a in aggressive neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jan;82(1):89-94.

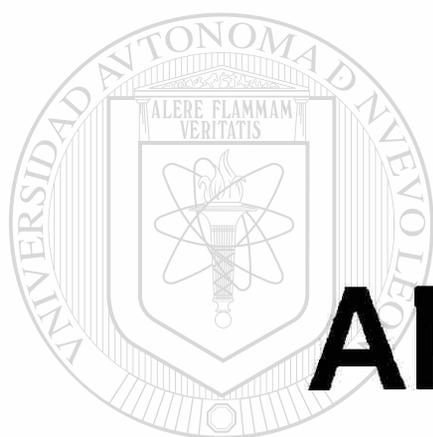


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





ANEXOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANEXO 1:

**PROTOCOLO: ASOCIACIÓN DE INFECCIONES CONCURRENTES DE VPH Y OTROS
VIRUS DNA GENITALES CON LA PROMOCION DE CANCER DE CERVIX**

Clave del Paciente _____
Fecha: _____
Nombre: _____ No. _____ De
Expediente: _____ años
Edad: _____
Domicilio: _____

Teléfono: _____ Escolaridad _____
Ocupación _____

ANTECEDENTES HEREDO FAMILIARES

Antecedentes de Cáncer (SI) (NO) Quién _____ Tipo de
HCáncer _____
Quién _____ Tipo de Cáncer _____
Diabetes _____

Otras enfermedades _____

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS

Tabaquismo (NO) (SI) N° de años _____ N° de cigarrillos/día _____ Activo (SI) Inactivo
desde hace _____
Alcoholismo (NO) (SI) N° de años _____ Cantidad _____ Tipo de
bebida _____
Activo (SI) Inactivo desde hace _____

ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS

Menarquia _____ Regla _____ X _____ días Menopausia (año) _____
I.V.S. _____
C.S. _____
Gestas _____ Partos _____ Cesáreas _____ Abortos
_____ Ectópicos _____
M.P.F. (SI) (NO) Tipo y tiempo de uso: Condón _____ DIU _____
OTB _____

Hormonal Oral (nombre/tiempo) _____ Hormonal Parenteral
(nombre/tiempo) _____

(especifique) _____ Otros

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Enfermedad	Año de Diagnóstico	Tratamiento	Evolución.	Como fue la respuesta
Diabetes	_____	_____	_____	_____
Hipertensión	_____	_____	_____	_____
Artritis Reumatoide	_____	_____	_____	_____
Obesidad	_____	_____	_____	_____
Otras	_____	_____	_____	_____

ENFERMEDADES TRANSMISIÓN SEXUAL

Papilomatosis vulvar o vaginal, condiloma acuminado o atípico, gonorrea, sífilis, chancro blando, tricomoniasis, clamidiasis, SIDA, Hepatitis B o C, vaginosis inespecífica, candidiasis. Otras.

Cervicitis Crónica : _____

NEOPLASIAS BENIGNAS

Resultado Anatomopatológico _____

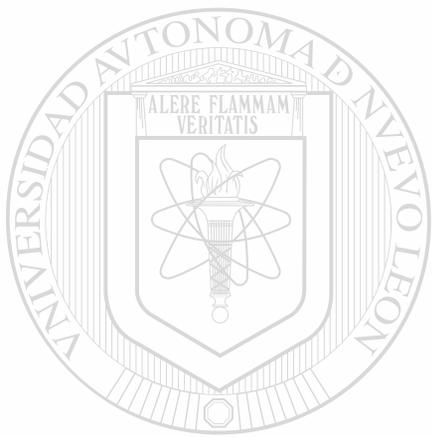
HISTORIA DE CITOLOGÍAS CERVICALES

Mencionar si existe infección por HPV u otro microorganismo. Se detectó HPV (SI) (NO)
Fecha _____
Resultado _____
Fecha _____ Resultado _____
Fecha _____ Resultado _____

Cáncer Cérvico-Uterino.
Fecha de Diagnóstico _____
Estadio Clínico _____

Diagnóstico de Biopsia _____

COMENTARIOS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANEXO 2:

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PORJECTO DE INVESTIGACIÓN: DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CELULARES QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN DE GENES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Rocío Ortiz López, profesora, Dpto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UANL.

Co-INVESTIGADORE

- Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, jefe Dpto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UANL.
- Dr. Augusto Rojas Martínez, profesor, Dpto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UANL.
- Dr. Oscar Vidal Gutiérrez, profesor, Serv. Ginecología, Hospital Universitario, UANL.
- Dra. Oralia Barboza Quintana, profesora, Serv. Patología, Hospital Universitario, UANL.
- Q.F.B Luis Miguel Canseco Avila, estudiante colaborador, Dpto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UANL.

Los investigadores del proyecto mencionado arriba me han solicitado participar de manera voluntaria en su estudio. Entiendo que la colaboración que solicitan es la donación de una pequeña muestra de biopsia del tumor de cuello uterino y /o 5 ml de sangre, el cual será utilizado para realizar estudios científicos que podrían generar conocimientos sobre el comportamiento del Cáncer Cervico Uterino y de cómo tratarlo. Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además, entiendo que si no deseo participar en este estudio, esta decisión no me afectará en futuros tratamientos que requiera en el Hospital Universitario.

Los resultados de esta investigación podrán ser presentados en publicaciones especializadas o reuniones de carácter científicos. Entendiendo que la información de la investigación presentada será manejada en forma confidencial y que nunca violará mi privacidad, que todas las marcas de identificación de las muestras de tejido y/o de sangre tomadas serán borradas por el investigador o su asistente al momento de ser colectadas y que en ningún momento se violará mi privacidad.

Además, el Hospital Universitario de la U.A.N.L., estará en la disposición de brindarme tratamiento médico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañada directamente por cualquiera de los procedimientos del proyecto de investigación, y en caso de daño permanente, tendré derecho a ser indemnizado de acuerdo al daño sufrido.

Nombre del Paciente: _____

Firma: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Testigo: _____

Firma: _____

Dirección: _____

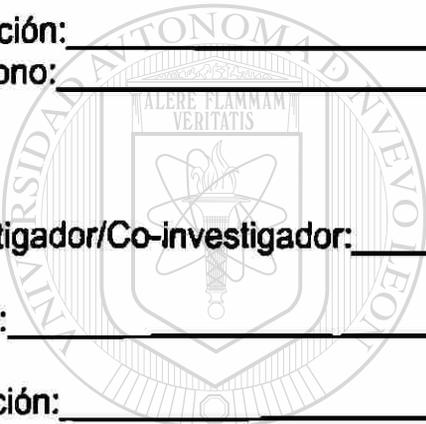
Teléfono: _____

Investigador/Co-investigador: _____

Firma: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A _____ de _____ del _____, Monterrey, N.L.

ANEXO 3:

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN INICIADORES IRDye™ 800

PROTOCOLO:

1.- Preparar la mezcla de secuenciación para todas las muestras a secuenciar.

REACTIVO	PARA 1 REACCIÓN (Volumen en μ l)
H ₂ O	μ l
Buffer Concentrado	2.0 μ l
dNTP's 2.5 mM	1.0 μ l
¹ Iniciador 5' (5 μ M) o ² Iniciador 3' (5 μ M)	1.5 μ l
³ Thermo Sequenase DNA Polymera	0.5 μ l
⁴ Volumen total	μ l

Mezclar bien y dar un spin.

¹ y ² Se debe pipetar en obscuridad: apagar la luz de la campana, porque el colorante fluorescente es fotosensible y termoestable.

A partir de este paso recuerda que siempre debes mantener los tubos en hielo y tapados

³ Sacarla de -20°C en hielo, hasta que se necesite y guardarla inmediatamente.

pipetear con puntillas blancas

⁴ Depende de la mezcla de reacción.

2. Para cada muestra a ser secuenciada, preparar la siguiente mezcla de reacción.

REACTIVO	REACCIÓN
DNA	. μ l
H ₂ O	. μ l
Mezcla de secuenciación	. μ l
Volumen total	27.0 μ l

Mezclar bien y dar un spin.

3.- Para cada DNA a secuenciar etiquetar 4 tubos (de 0.2 ml) marcados con las letras G,A,T y C (con su numeración respectiva).

4.- En cada uno pipetear 1.2 µl de las soluciones G, A, T y C .

5.- Agregar 6.2 µl de la mezcla de reacción a cada tubo respectivamente.

Para que se pueda completar el volumen, se debe pipetear la mezcla de reacción en la superficie. Depositar hasta el fondo, mezclar y cambiar de puntilla entre cada pipeteada.

6.- Llevar los tubos al termociclador para iniciar el programa que consta de 30 ciclos cada uno de los cuales incluye los siguientes pasos:

EL TERMOCICLADOR DEBE TENER TAPA OSCURA.

ETAPA	Temperatura °C	Tiempo
1.- Desnaturalización inicial	94	5 min
2.- Desnaturalización	94	30 seg
3.- *Apareamiento	69	30 seg
4.- Extensión	72	45 seg
5.- Ir al paso 2, 30 ciclos		
6.- Extensión prolongada	72	10 min

* Depende de la temperatura de apareamiento del iniciador.

7.- Una vez finalizada la PCR, retirar los tubos del termociclador.

8.- Agregar 3.0 µl de solución stop. Mezclar y dar un spin.

9.- Antes de depositar al gel desnaturalizar las muestra por 10 min. a 95°C.

NOTA: siempre mantener los tubos tapados.

ANEXO 4:

PRECIPITACION CON VIVID VIOLET

PROTOCOLO:

- 1.- En un tubo de 0.2ml, agregar lo siguiente (en el orden indicado): 1.0 μ l de Acetato de Sodio 3M, 7.4 μ l de la reacción de secuenciación, 1.0 μ l de Vivid Violet y 20 μ l de etanol al 100%.
- 2.- Mezclar brevemente. Incubar 30 min a temperatura ambiente, mezclar nuevamente
- 3.- Centrifugar a 14,000 rpm por 30 min.
- 4.- Descartar el sobrenadante, utilizando una pipeta automática.
- 5.- Adicionar 100 μ l de etanol al 70%, mezclar brevemente.
- 6.- Centrifugar a 14,000 rpm por 30 min.
- 7.- Descartar el sobrenadante utilizando una pipeta automática.
- 8.- Secar al aire, ó utilizar el secador de vacío por 7 min.
- 9.- Resuspender con 3.0 μ l de solución STOP de LI-COR IR².
- 10.- Desnaturalizar a 95°C, por 10min. pasar inmediatamente en hielo, y luego depositar al gel. 1.0 a 1.5 μ l.

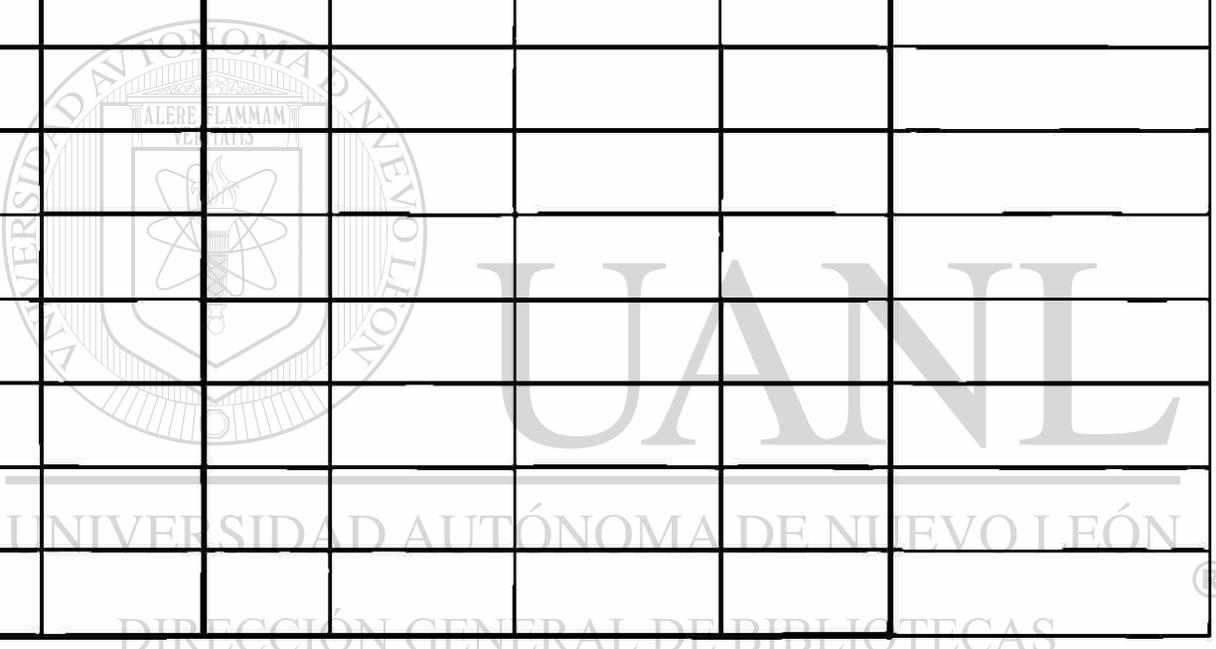
NOTAS

- 1) LAS MUESTRAS ESTÁN MARCADAS CON UN COLORANTE FLUORESCENTE, SE DEBEN TRABAJAR EN LA MAYOR OSCURIDAD POSIBLE, PARA QUE LOS PRODUCTOS NO SE DEGRADEN.
- 2) RECUERDA QUE ES UNA PRECIPITACIÓN SELECTIVA Y NO DEBES PASAR LOS TIEMPOS INDICADOS, PORQUE EMPIEZAN A PRECIPITAR TODOS LOS ANÁLOGOS NO INCORPORADOS

ANEXO 5:

**CONTROL DE REACCIONES DE SECUENCIACIÓN
ALUMNO: Luis Miguel Canseco Avila
ENERO – AGOSTO
2002**

REACCIÓN		GEL				OBSERVACIONES
Fecha	No. Mtas	Fecha	Ausencia Carril (es)	No salieron	pb leídas	



ANEXO 6:

SECUENCIACION

 / /

NOMBRE DEL ALUMNO: Luis Miguel Canseco Avila

Número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Muestra										
Clave Oligo										
H ₂ O										
DNA										
Primer										
Mix de rx										
Tm										

MEZCLA DE REACCION

1 X

___ X

Buffer: 1.5 µl

___ µl

H₂O: ___ µl

___ µl

Enzima : 0.5 µl

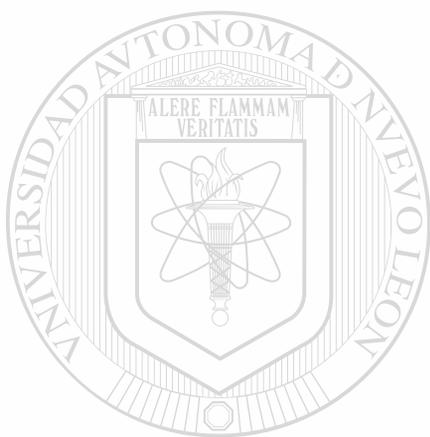
___ µl

TERMOCICLADOR: _____

NOMBRE Y FECHA GEL: _____

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Muestra										
pb leídos										
Repetir al gel										
Repetir reacción										
Observaciones										

Carril _____ plantilla del primer F
 Carril _____ plantilla del primer R



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



