



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Expresión de Receptores Notch y Detección de
Virus de Papiloma Humano en Cáncer
Cervicouterino**

Tesis que presenta

Erika Nahomy Marino Marmolejo

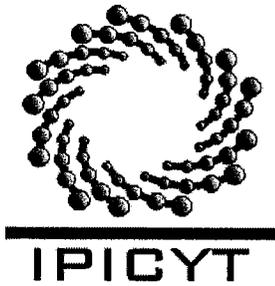
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Martha Leticia Santos Martínez

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2005.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 011 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 2 días del mes de agosto del año 2005, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Secretario	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Erika Nahomy Marino Marmolejo

sobre la Tesis intitulada:

Expresión de Receptores Notch y Detección de Virus de Papiloma Humano en Cáncer Cervicouterino

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 2 días del mes de agosto de 2005.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico




Mtra. Mg. Eñisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

La presente tesis de Maestría en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Erika Nahomy Marino Marmolejo y aprobada el 2 de agosto de 2005 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Rubén H. López Revilla

Presidente



Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Secretario



Dra. Martha Leticia Santos Martínez

Vocal

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio 4 de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Martha Leticia Santos Martínez. Durante la realización del trabajo la autora de este trabajo de tesis recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 182072) y apoyo para la formación de recursos humanos “José Antonio Villaseñor y Sánchez” a través del Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología.

DEDICATORIAS

A mis Padres por su apoyo y su cariño, en especial a mi Madre por estar siempre a mi lado alentándome a seguir adelante.

A mi hermana Nallely por su confianza y apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida.

A mis amigos, gracias por brindarme su amistad incondicional y por su apoyo en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Santos, por su apoyo y enseñanzas.

Al Dr. Rubén López Revilla por el apoyo brindado a la realización de
esta tesis.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por su asesoría.

A la Biol. Mireya Sanchez.

Al Dr. Humberto Cuevas, de la Clínica de Displasias del Hospital
General zona 1 del IMSS, San Luis Potosí, S. L. P.

Al Médico pasante de servicio social Sara Fonseca Castañol.

Al IPICYT por el apoyo para continuar mis estudios.

Al CONACYT por la beca estos dos años

ÍNDICE

	Página
Hoja de aprobación de la tesis	
Dedicatorias	
Agradecimientos	
Índice	
Lista de tablas	
Lista de figuras	
Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
I.1 Cáncer cervicouterino	3
I.2 Virus del papiloma humano	6
I.3 Vía de señalización Notch	10
I.3.1 Componentes de la vía	10
I.3.2 Activación	13
I.3.3 Genes blanco	15
I.3.4 Moduladores de la vía	16
I.3.5 Implicaciones de la vía Notch en cáncer	17
II. Materiales y métodos	22
2.1 Obtención de biopsias	22
2.2 Oligonucleotidos	23
2.3 Extracción de ADN	23
2.4 Extracción de ARN total	25
2.5 Reacción de Transcriptasa Reversa (RT)	25
2.6 Amplificación de genes Notch 1 - 4	25
2.7 Amplificación de oncogenes E2, E6 y E7 VPH-16	26
2.8 Electroforésis de ADN	27
2.9 Análisis de resultados	27
III. Resultados	28
3.1 Amplificación de transcritos de los receptores Notch y detección de los oncogenes de VPH-16 en NIC3	28
3.2 Amplificación de transcritos de los receptores Notch y detección de los oncogenes de VPH-16 en CaCU invasor	30
IV. Discusión	38
V. Referencias	41
VI. Anexos	44

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Principales componentes de la señalización Notch	13
2. Señalización Notch en cáncer	19
3. Mecanismos generales de la señalización Notch en cáncer	19
4. Secuencias de oligonucleótidos empleados	24
5. Valores normalizados de intensidad de las bandas de los receptores Notch	32
6. PCR oligos VPH-16 y MY 09-11	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Clasificación de las etapas de progresión del CaCU	12
2. Entrada de VPH por traumatismo	15
3. Esquema de la organización del genoma de VPH-16	17
4. Relación entrada-progresión de la infección por VPH con los grados de lesión intraepitelial.	18
5. Estructura de los cuatro receptores Notch en mamíferos	22
6. Modelo de activación de la vía Notch	25
7. Ejemplo de patrón de amplificación de muestra normal	29
8. Ejemplo de patrón de amplificación de lesión NIC3	30
9. Ejemplo de patrón de amplificación en CaCU invasor	31
10. PCR oligos VPH-16 y MY 09-11	33
11. Expresión relativa del ARNm de Notch-2	35
12. Expresión relativa del ARNm de Notch-3	36
13. Valores promedio (unidades arbitrarias) de Notch-4	37

RESUMEN

El desarrollo de cáncer es el resultado de la acumulación progresiva de alteraciones moleculares específicas, particularmente en eventos que dirigen la determinación del destino celular. La vía de señalización Notch juega un papel fundamental en las diferentes etapas de desarrollo celular como proliferación, diferenciación y apoptosis. Estudios recientes han demostrado que dependiendo del nivel de expresión y del contexto celular, los receptores de membrana Notch contribuyen a la tumorigénesis. En este trabajo se investigó el patrón de expresión de los receptores Notch-1 al -4 en cáncer cervicouterino. Se detectó una expresión aumentada de receptores Notch-2 y -3 y una expresión baja pero consistente de Notch-4 en lesiones de pacientes en etapas avanzadas con cáncer cervicouterino. Además se comprobó la presencia de virus de papiloma humano en todos los casos estudiados. Los resultados obtenidos revelan de manera inesperada una expresión diferente a la reportada, ya que el receptor Notch-1 se sobreexpresa y proporciona los efectos para transducir una señal de supervivencia en estas células tumorales.

Palabras clave:

Señalización Notch, cáncer cervicouterino.

ABSTRACT

The development of cancer is the result of a progressive accumulation of specific molecular alterations, mainly those driving cell fate determinations. The Notch signaling pathway plays a crucial role at different stages of cell development such as proliferation, differentiation, and programmed cell death. Recent studies have demonstrated that depending on the expression level and cellular context, the Notch receptors contribute to tumorigenesis. This work describes the expression pattern of the membrane receptors Notch-1 to -4 in cervical cancer. We detected an up-regulated expression of Notch-2 and Notch-3 and a low but steady expression of Notch-4 in lesions of patients with advanced stages of cervical cancer. The presence of the Human Papilloma virus was confirmed in all cases studied. Unexpectedly, the results obtained reveal an atypical expression pattern when compared to the data reported up to now, in which Notch-1 is frequently overexpressed and confers the primary effects to transduce a survival signal in this specific type of tumoral cells.

Key words:

Notch signaling, cervical cancer.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino (CaCU) ocupa el segundo lugar entre las causas de mortalidad que afectan a la mujer a nivel mundial con una frecuencia que sólo se ve superada por el cáncer de mama, con una cifra aproximada de 500,000 casos diagnosticados cada año¹. El CaCU constituye un grave problema de salud en países en vías de desarrollo en regiones como África, América Latina y el Caribe. En México este padecimiento representa la neoplasia ginecológica más común que ocasiona el 25% de los fallecimientos por cáncer en la mujer².

El CaCU es una enfermedad que se desarrolla por etapas. La clasificación de estas etapas está basada en los cambios morfológicos del epitelio que define el grado de la lesión. La clasificación más utilizada es la neoplasia cervical intraepitelial (NIC, o CIN por sus siglas en inglés) que se divide en grados 1, 2 y 3 (Figura 1). Los criterios para el diagnóstico de neoplasia intraepitelial varían según el criterio del médico-patólogo, aunque los aspectos más importantes a considerar son la desorganización celular, la atipia nuclear y el aumento de la actividad mitótica³.

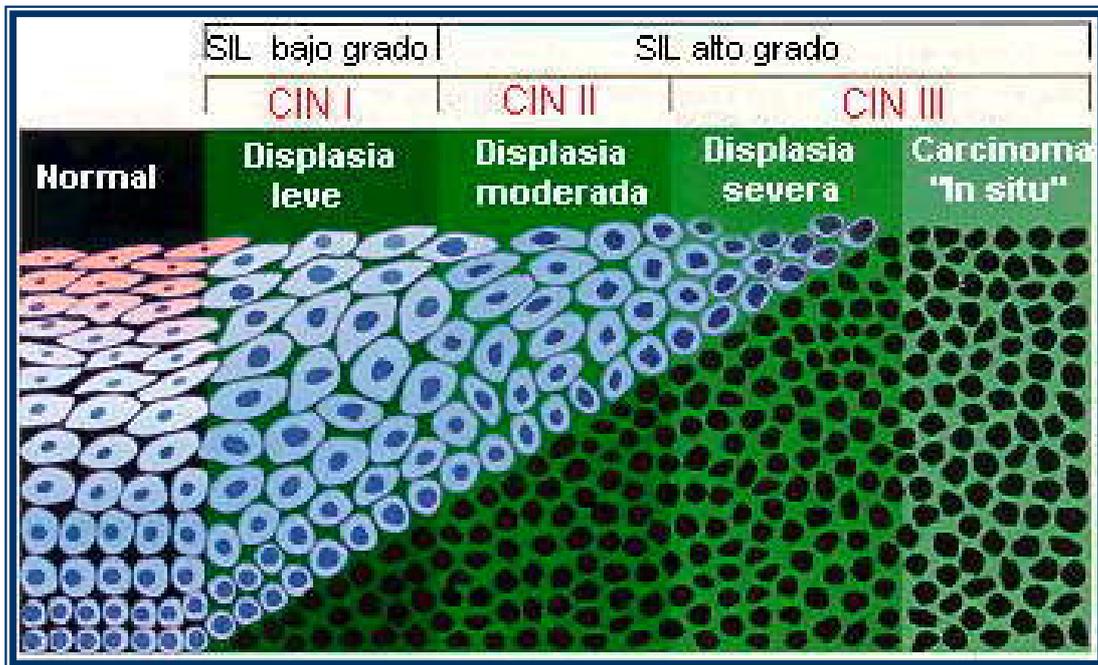


Figura 1. Clasificación de las etapas de progresión en CaCU

Se ha observado la presencia de ADN del Virus de Papiloma Humano en el 99.7% de los casos de CaCU y además que ciertos tipos de VPH son la causa central en el desarrollo de las neoplasias intraepiteliales y CaCU. El VPH se transmite por vía sexual, se estima que al menos 50% de los adultos con vida sexual activa han tenido contacto con VPH genital, que la prevalencia de la infección es mayor en mujeres de más de 25 años de edad y que su persistencia ocurre con mayor frecuencia en mujeres en un rango de edad entre 35 – 60 años⁴. El cuello del útero está compuesto por dos tipos de epitelio, el epitelio cilíndrico mucosecretor, que reviste al conducto endocervical y el epitelio escamoso que recubre al exocérvix. La

zona de unión entre estos epitelios se denomina zona de transición escamo-columnar o zona de transformación y es una región dinámica sujeta a cambios constantes relacionados con la acción de hormonas ováricas (e.g. estrógeno), fenómenos proliferativos como el cambio de epitelio cilíndrico a escamoso (metaplasia) y donde se originan con mayor frecuencia las lesiones intraepiteliales⁵. Pequeños traumatismos en el lugar de la inoculación facilitan la transmisión (Figura 2)⁵. Las alteraciones producidas por la infección del VPH pueden ser observadas en un frotis de un raspado cervical teñido con el método de Papanicolau.

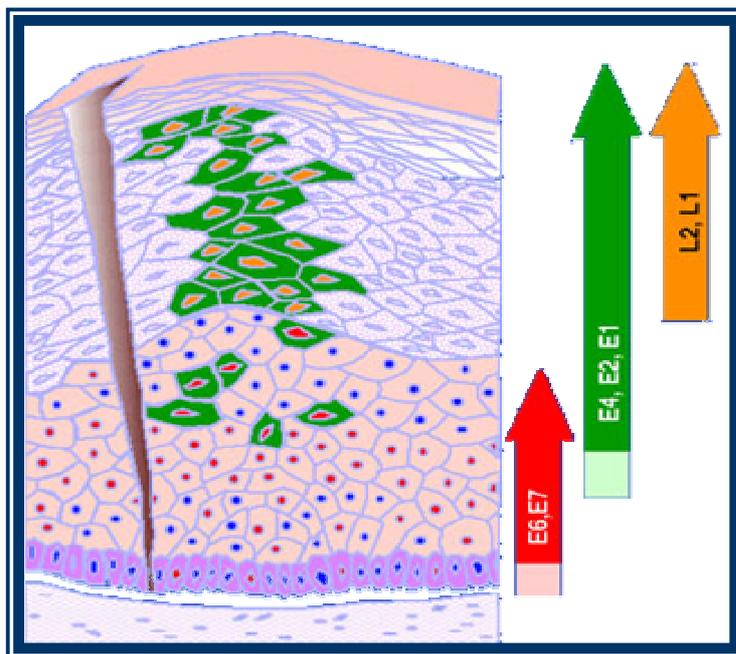


Figura 2. Entrada del VPH por traumatismo. El VPH infecta células basales y de ahí progresa la infección hasta alcanzar células superficiales. Las flechas esquematizan la expresión de oncogenes del VPH durante la infección.

Cabe señalar que no todas las mujeres infectadas con estos virus llegan a padecer la enfermedad, lo que indica que se requieren otros factores para la carcinogénesis por lo que el CaCU se considera un padecimiento multifactorial^{6,7}.

I.2 Virus de Papiloma Humano (VPH)

Los VPH pertenecen al género Papilomavirus de la familia Papovaviridae; son virus de ADN sin envoltura de 50 a 55 nm de diámetro, compuestos de cápsides icosaédricas formadas por 72 capsómeros. Contienen un genoma de ADN circular bicatenario de aproximadamente 8,000 pares de bases. La organización del genoma entre los VPHs es muy similar y constan de una región temprana (early, E), una región tardía (late, L) y una región de control (long control region, LCR). Se han descrito más de 100 genotipos de VPH, de los cuales 40 pueden infectar el aparato genital; 15 de ellos se catalogan de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82⁸. De estos considerados de alto riesgo los genotipos 16, 18 y 45 son los que con mayor frecuencia se encuentran en el desarrollo de neoplasias. Los virus del papiloma humano (VPH) son selectivos del epitelio de la piel y mucosas. Las infecciones son

generalmente asintomáticas, producen verrugas y pueden generar neoplasias benignas o malignas.

Los VPH oncogénicos tienen la capacidad de inmortalizar queratinocitos humanos por la integración y expresión de sus genes tempranos. Las proteínas E1 y E2 son responsables de la modulación de la replicación del ADN viral y la regulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7. Es importante señalar que la progresión de lesiones precursoras en cáncer se encuentra asociada a la pérdida en la expresión de la oncoproteína E2 a consecuencia de que el ADN del VPH se integra al ADN del genoma celular interrumpiendo así el marco de lectura del gen E2. Esta proteína tiene como peculiaridad la represión a nivel transcripcional de los oncogenes virales E6 y E7 a través de su unión al promotor de E6 y E7. La ausencia de E2 se manifiesta en una sobreexpresión descontrolada del ARN mensajero (ARNm) de estas dos proteínas⁸. Las oncoproteínas E6 y E7 a su vez interrumpen la regulación del ciclo celular. E6 reconoce a la proteína supresora de tumores p53 y la somete a degradación proteolítica vía proteasoma, previniendo así el arresto potencial del crecimiento en la fase G1 del ciclo celular y/o la apoptosis en respuesta al daño celular. La oncoproteína E7 se une a la proteína del retinoblastoma (Rb) y al igual que p53, la dirige al proteasoma para su degradación⁹.

El gen L1 codifica la proteína principal de la cápside, que constituye hasta el 80% de la masa del virión. El gen L2 codifica una proteína secundaria de la cápside. Los diferentes tipos de papilomavirus comparten al menos del 90% de homología en sus secuencias de ADN en L1. Los VPH son específicos de especie y no se propagan en cultivos de tejidos ni en animales de experimentación habituales.

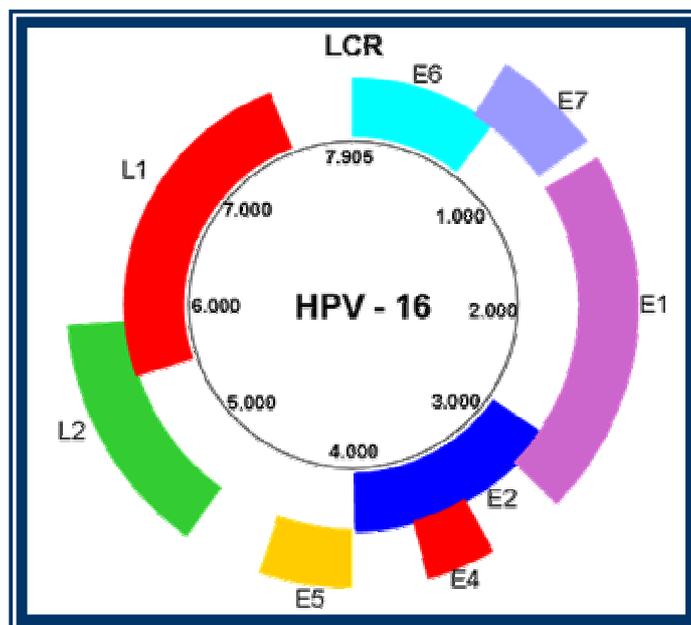


Figura 3. Esquema de la organización del genoma del VPH-16

El ADN viral generalmente se encuentra integrado al ADN celular en los carcinomas invasores y en líneas celulares derivadas de estos, mientras que en lesiones premalignas el ADN viral se encuentra en estado episomal. Estudios recientes han demostrado

que también es posible encontrar en CaCU formas episomales del virus¹⁰ (Figura 4).

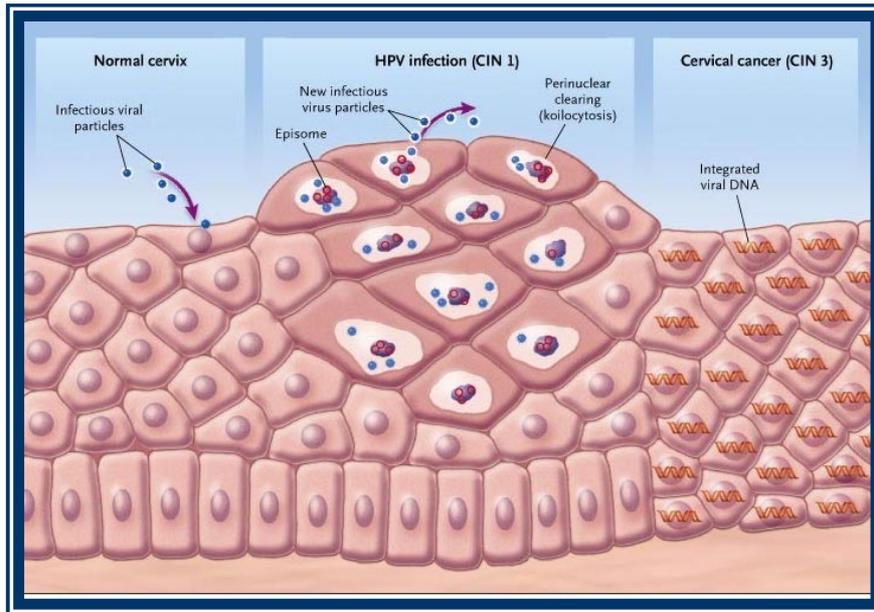


Figura 4. Relación de entrada-progresión de la infección por VPH; integración del genoma viral con los grados de neoplasia intraepitelial (NIC, CIN por sus siglas en inglés).

Recientemente se ha observado que las oncoproteínas codificadas por los virus tumorales de ADN como el VPH, tienen la capacidad de interactuar con proteínas celulares críticas para los procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular, y que el potencial oncogénico de dichos virus se debe, en parte, a tales interacciones¹¹.

I.3 Vía de señalización Notch

En los años recientes se han hecho avances importantes en el entendimiento de las interacciones moleculares que intervienen en las decisiones del destino celular¹². La señalización Notch se define evolutivamente como un antiguo mecanismo de interacción celular que juega un papel fundamental en el desarrollo. A través de los receptores Notch las señales entre células vecinas pueden amplificar y consolidar diferencias moleculares que eventualmente dirigen el destino celular. De esta manera, la señalización Notch controla la respuesta celular intrínseca o extrínsecamente en el momento que es necesario el despliegue de programas específicos de desarrollo. La actividad de Notch afecta la implementación de diferenciación, proliferación y programas apoptóticos, proporcionando una herramienta general para influenciar la formación de órganos¹³.

I.3.1 Componentes de la vía

El gen Notch se descubrió a principios del siglo veinte y fue caracterizado en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* a mediados de los 80's. El gen Notch codifica un receptor transmembranal de 300 kDa. Este receptor es sintetizado a partir de

un polipéptido precursor que es procesado por una convertasa en su paso por la región *trans* del complejo de Golgi produciendo un receptor heterodimérico que se ensambla a la membrana (Figura 6). El dominio extracelular contiene repetidos en tándem similares a las del factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) y tres repetidos ricos en cisteína (LN). Los repetidos EGF se localizan en la región amino terminal extracelular y participan en la unión con su ligando proveniente de otra célula, mientras que las repetidos LN previenen la activación de la señalización en ausencia del ligando. El dominio intracitoplásmico de Notch se encarga de transmitir la señal al núcleo; esta contiene un dominio RAM que posee una alta afinidad de unión a proteínas (factores de transcripción), seis repetidos de ankirina necesarias para la transmisión de señales, dos secuencias de localización nuclear (NLS 1 y 2), un dominio de activación transcripcional (TAD) y secuencias PEST (región rica en prolina-glutamato-serina-treonina) que tienen propiedades proteolíticas. *Drosophila* tiene un solo receptor mientras que en mamíferos existen cuatro genes Notch (Notch-1 al -4). Estos genes codifican para los cuatro receptores correspondientes, sus estructuras son muy similares, con pequeñas diferencias en sus regiones extracelulares e intracitoplasmáticas (Figura 5). En su dominio extracelular los receptores Notch-1 y Notch-2 tienen 36

repetidos EGF, Notch-3 tiene 34 y Notch-4 solo 29 repetidos. Otra diferencia está localizada en el dominio intracitoplasmático, TAD no se encuentra presente en los receptores Notch-3 y Notch-4¹² (Figura 5).

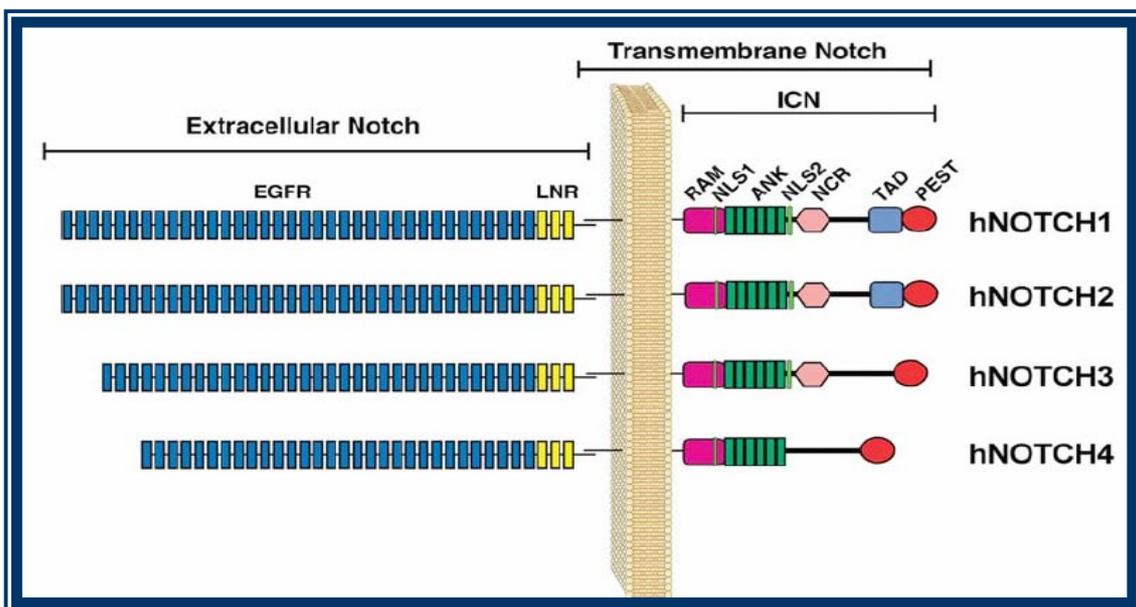


Figura 5. Estructura de los cuatro receptores Notch en mamíferos. EGFR, Repetidos de factor de crecimiento epidérmico; LNR, Repetidos de cisteína; RAM, región de unión a factores de transcripción; NLS1 y 2, señales de localización nuclear; ANK, repetidos de ankirina; NCR, regiones de respuesta a citocinas; TAD, dominio de transactivación; PEST, región compuesta de prolina-glutamato-serina-treonina.¹²

Los ligandos de los receptores Notch son proteínas transmembranales que poseen una arquitectura conservada y contienen los siguientes elementos: una secuencia señal, una región

N-terminal no conservada de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, un dominio familia específico (Familia Delta o Serrate), un número variable de repetidos EGF, un dominio transmembranal (TM), y un dominio no conservado intracelular (IC)^{12, 14}.

El sistema de señalización Notch ha sido estudiado en varios modelos. En *Drosophila melanogaster*, en *Cenorhabditis. elegans* y en mamíferos, en la Tabla 1 se muestran los componentes principales en estos sistemas^{12, 15}.

Tabla 1. Principales componentes de la señalización Notch

Componente	Mamíferos	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
Receptor	Notch-1 Notch-2 Notch-3 Notch-4	Notch	LIN-12 GLP-1
Ligando	Delta-like 1 (DLL1) Delta-like 3 (DLL3) Delta-like 4 (DLL4) Jagged 1 (JAG1) Jagged 2 (JAG2)	Delta Serrate	LAG-1 LAG-2 APX-1 ARG-2
Factor de transcripción	CBF1/RBPJk RBPL NFkB	Supresor de Hairless (SuH)	LAG-3

^{12, 15}

I.3.2 Activación

La señalización Notch se inicia por la interacción receptor-ligando entre dos células vecinas. Esta interacción ocasiona la activación del receptor originando dos cortes proteolíticos que libera la porción intracitoplasmática (Notch-IC) del dominio transmembranal.

La porción Notch-IC libre se trasloca al núcleo y se une a factores de transcripción (CLS; CBF1/ LAG-3/Supresor de Hairless)¹⁶. En ausencia de la porción Notch-IC, CLS inhibe la transcripción ya que se une y recluta a co-represores y diacetilasas de histonas. Cuando Notch-IC esta presente en el núcleo se une a CLS compitiendo con las proteínas inhibidoras que están unidas a el y facilitan la unión de proteínas co-activadoras y acetiltransferasas de histonas, por la formación de este complejo CLS pasa de ser un represor a un activador transcripcional (Figura 6)¹⁷.

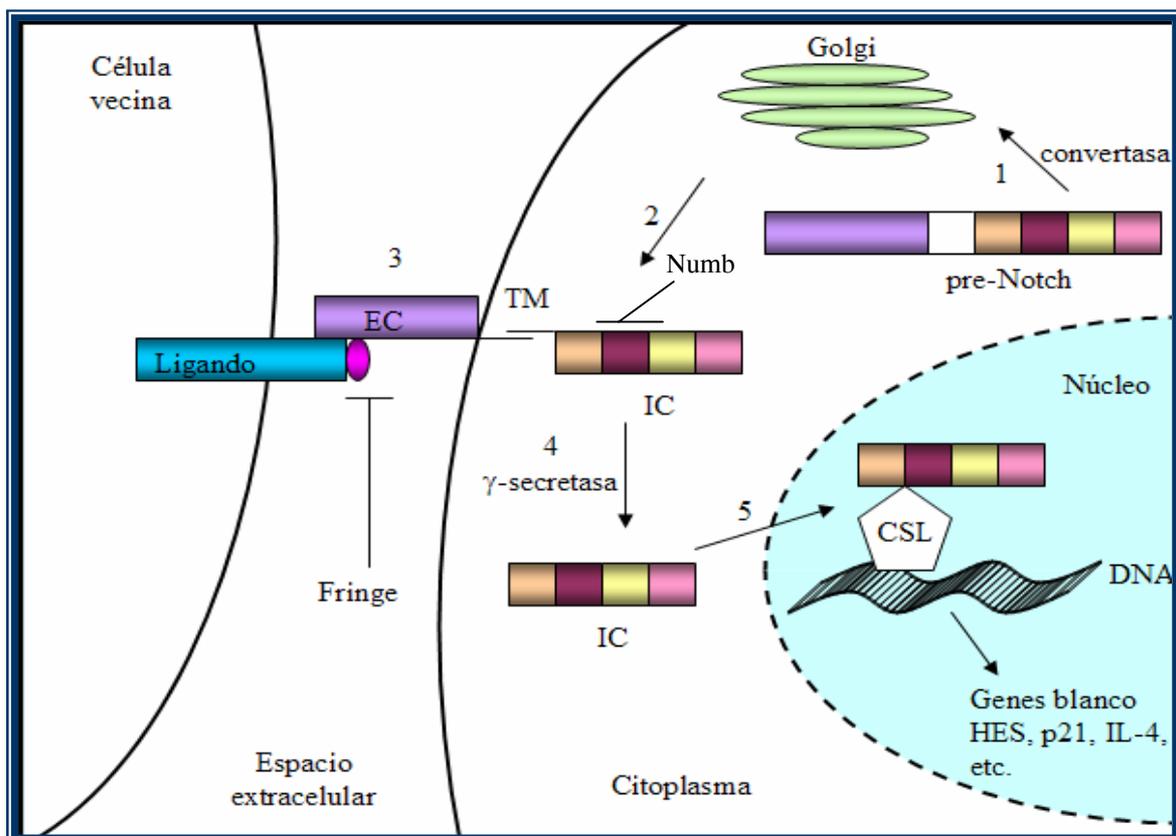


Figura 6. Modelo de activación mediada por la interacción receptor-ligando de la señalización Notch^{16, 23, 24}

El tamaño del complejo es de aproximadamente 1.5 MDa, e involucra a otras proteínas además de la porción Notch-IC y CLS. Análisis *in vitro* han mostrado que existen otros componentes clave en la formación del complejo, son polipéptidos de la familia de las mastermind-like (MAML). MAML son proteínas nucleares ricas en glutamina, que se unen a Notch a nivel de la región de repetidos de ankirina, formando un complejo ternario estable con Notch-IC y CLS. Juzgando por el gran tamaño de este complejo, es probable que existan otros componentes aún desconocidos¹⁸.

I.3.3 Genes blanco

El proceso de activación de la vía Notch tiene como finalidad la transcripción de genes blanco^{19, 20, 21} como son:

- Bcl-2: este gen codifica una proteína integral de membrana mitocondrial, bloquea la muerte apoptótica de varios tipos celulares como linfocitos.
- NFκB2: particularmente participa en el desarrollo de órganos linfoides y estimula la expresión de varios genes como las proteínas antiapoptóticas.
- HES: (hairy/enhancer of split) familia de factores de transcripción, que modulan negativamente a genes como los de

la familia achaete-scute, que inducen la diferenciación neuronal.

- p21: codifica un potente inhibidor de cinasas ciclino-dependientes. Esta proteína se une a los complejos ciclina-CDK2 o -CDK4 e inhibe su función y funciona como regulador de la progresión a G1 del ciclo celular.
- IL-4: La proteína codificada por este gen es una citocina pleiotrópica producida por las células T activadas (efecto protector contra el desarrollo de enfermedad).
- PI3K: la fosfatidil inositol-3-cinasa es una proteína de señalización que confiere resistencia a la anoikis (desencadenamiento de muerte celular por pérdida de adhesión con la matriz circundante) y a la apoptosis mediada por p53.
- ERBB2: factor de transcripción; estimula la proliferación y el crecimiento celular.

I.3.4 Moduladores de la vía

Existen múltiples proteínas reguladoras o moduladoras de la vía Notch, las más conocidas son producto de los genes *fringe*. Los genes de la familia Fringe existen tanto en invertebrados como en vertebrados. Una de sus funciones es la modulación de la activación

de la vía Notch dependiente de la unión receptor-ligando²². Fringe es una glucosiltransferasa identificada primero en *Drosophila* y subsecuentemente en mamíferos (Manic Fringe, Lunatic Fringe y Radical Fringe)²³. Glicosilan a los receptores y a los ligandos de la señalización Notch. Fringe cataliza la adición de β -1,3-N-acetilglucosamina sobre los residuos preexistentes de O-fucosa unidos a las repeticiones EGF de los receptores y de los ligandos. Esta acción evita la unión receptor-ligando y por lo tanto inhibe la activación de la señalización (Figura 6). La modulación del sistema de señalización Notch por las proteínas Fringe se lleva a cabo a nivel extracelular²⁴. Aún no es clara la modulación a nivel intracitoplasmático, pero se conoce la participación de las proteínas NUMB. Las proteínas NUMB inhiben la inducción dependiente de la región activa del receptor Notch (porción intracitoplasmática) de proteínas antiapoptóticas (Figura 6). Esta regulación es más una acción antagonista a la acción de Notch^{25, 26}.

1.3.5 Implicaciones de la vía Notch en cáncer.

La desregulación de la señalización Notch está ligada a varios tipos de enfermedades humanas, al igual que otras vías de señalización asociadas al desarrollo y proliferación celular²⁷. Existen

evidencias de que la vía Notch participa en la transformación neoplásica²⁸. Entre las causas más frecuentes en el desarrollo de cáncer se encuentran la presencia de mutaciones, deleciones, translocaciones e inserciones virales en sus genes.

La participación de los componentes de la señalización Notch se ha reportado en una variedad de carcinomas humanos, en la Tabla 2 se suman algunos de los carcinomas en los que se ha encontrado implicada a la vía Notch ^{9, 17, 29, 30, 31, .}

Se han descrito tres mecanismos generales de la manera en que la señalización Notch se involucra en la tumorigénesis (Tabla 3). El primer mecanismo es la translocación e inserción proviral en los genes de los receptores Notch lo que lleva a la producción independiente del ligando de polipéptidos similares a la región intracitoplasmática, como ocurre en leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL, por sus siglas en inglés) en humanos, en felinos y en ratones, y en carcinomas de mama murinos. El segundo mecanismo involucra la activación del receptor mediada por el ligando, este mecanismo se ha demostrado sólo en modelos experimentales. Finalmente, en un diverso grupo de tumores se ha observado la desregulación de la vía Notch por mecanismos generalmente inciertos³² (Tabla 3).

Tabla 2. Señalización Notch en cáncer.

Tumores	Componente involucrado
Leucemia Linfoblástica aguda de células T	Notch-1 (Translocación 7;9 (q34;q34.3))
Cáncer pulmonar de: células pequeñas células no pequeñas	Notch-2 receptores Notch-1, -2 y -3
Cáncer de piel	Baja expresión Notch-1 y -2 ligandos DLL1 y Jagged1
Cáncer de mama	Sobreexpresión Notch-1 y -2 Expresión constitutiva Notch-4
Cáncer cervicouterino	Sobreexpresión Notch-1 y Notch-2

9, 17, 29, 30, 31

Tabla 3. Mecanismos generales de la señalización Notch en cáncer.

Mecanismo	Ejemplos de tumores	Posibles terapias
Ganancia de función (mutación)	T-ALL (Notch-1) Carcinomas mamarios murinos (Notch-4)	Inhibidores intracelulares, inactivación del complejo nuclear.
Ganancia de función dependiente del ligando	Desórdenes linfoproliferativos (linfoma de Hodgkin)	Inhibidores intra o extracelulares, bloqueo de la unión ligando-receptor
Desregulación de la vía Notch	Carcinomas de pulmón Adenocarcinomas Carcinomas de células basales Neuroblastomas Carcinomas cervicales	Activadores o inhibidores de la vía Notch.

32

El papel de la señalización Notch en el desarrollo de cáncer de cérvix ha sido intensamente estudiado, sin embargo continúa siendo un desafío para su tratamiento y erradicación³¹. En 1995 se describió por primera vez la expresión aumentada de Notch-1 en lesiones intraepiteliales avanzadas en cérvix y en carcinomas cervicales^{33, 34} y revalidada en 1997^{34, 35}. En 1999 se reportó que la expresión de los ligandos de Notch, Delta-1 y Jagged-1, también se expresan en forma aumentada. Esto sugiere que la vía de señalización Notch se activa por la interacción de receptor-ligando.

En el contexto de las neoplasias cervicales asociadas a la infección por el VPH en ensayos de transformación *in vitro* se ha sugerido que la desregulación de Notch-1 se activa sinérgicamente por la expresión de las oncoproteínas E6 y E7^{36, 37}. Esto sugiere que la desregulación de Notch-1 puede ser necesaria para mantener la actividad transformante de las oncoproteínas de VPH. La regulación negativa de la expresión de Notch-1 en líneas celulares de carcinoma cervical que expresan E6 y E7 causa una notable inhibición de la proliferación *in vitro* y de la tumorigenicidad *in vivo*. Esto sugiere que la regulación positiva de la señalización Notch es mediada por E6 y E7⁹.

A pesar de los avances en el conocimiento sobre la biología y función de la señalización Notch en cáncer cervicouterino, queda aún

un largo camino por recorrer, ya que su importancia radica en el poder utilizar a los componentes de la vía Notch como blancos para el desarrollo de nuevos biofármacos, y es por esto que es necesario conocer cuáles componentes de esta vía y de qué manera contribuyen o participan en el desarrollo de neoplasias cervicales.

Este trabajo reporta un panorama general acerca de la participación de los genes Notch y las oncoproteínas del VPH en el proceso de transformación de células cervicales. Se identificó por lo tanto, el patrón de expresión espontánea de los cuatro receptores Notch en tejido cervical con lesiones de alto grado (NIC3 y CaCU invasor).

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

II.1. Obtención de biopsias

Se tomaron biopsias de 10 pacientes en edad reproductiva, 6 clasificados como NIC3 y cuatro clasificados como cáncer invasor, el diagnóstico del estadio de la neoplasia se basó en datos clínicos e histopatológicos (Clínica de Displasias y Departamento de Patología, Hospital General de Zona 1 del IMSS, San Luis Potosí, S.L.P.). Para cada paciente se realizaron dos tomas de biopsias, una de tejido aparentemente normal y otra de tejido con lesión. Adicionalmente se extrajeron biopsias de tejido cervical de individuos sanos que se usaron como controles negativos. Las biopsias tomadas se colocaron en tubos Eppendorf estériles y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y posteriormente se transfirieron a un ultra congelador a -70°C hasta el momento de procesarlas. Así mismo se tomaron dos muestras de sangre periférica (4mL) heparinizada de dos individuos normales y se congelaron a -20°C hasta el momento de utilización.

II.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes Notch se tomaron de la base de datos del *National Center Biotechnology Information* (NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov) como se muestra en la Tabla 4. En el caso de los genes para β -actina y los oncogenes E2, E6 y E7 de VPH-16, se diseñaron en referencia a las publicaciones incluidas en la Tabla 4. El control positivo de amplificación para los oncogenes E2, E6 y E7 consistió de un plásmido con el genoma completo de VPH-16 (donado por el Dr. Alejandro García Carrancá, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, México, D.F.).

II.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de sangre periférica para la estandarización de las técnicas de amplificación de los genes de Notch se llevó a cabo utilizando un kit de extracción de ADN genómico (Ultra Clean DNA blood spin kit, catalogo # 12200-50) MO BIO laboratorios, Inc. (Anexo 1).

En el caso de las biopsias de tejido cervical normal y con lesión se utilizó un kit de extracción de ADN genómico (Ultra Clean, tissue

DNA isolation kit, catalogo # 12334-50) MO BIO laboratorios, Inc. (Anexo 2). El ADN obtenido se cuantificó por espectrometría a 260 nm (Anexo 3).

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados.

Nombre	5' → 3'	Localización en el gen (nt)	Tamaño (pb)	Ref.
Notch-1	S: GGTCAATGCGAGTGGC A: GGCAGCAAGGCTACTGTG	48964 - 49099	153	1
Notch -2	S: ACTATGAAAGAGGCTGAC A: TCATTCCTTCTATGGCTG	156237 - 156483	153	2
Notch -3	S: ATTCTGCCATAAGGCTGGG A: GGGCAGATGTATGCATTCT	41106 - 41220	247	2
Notch -4	S: GGGTCTGACCACTGAGACAC A: CAGTGAGAGCTCTGAGGGTC	72 - 208	115	2
β-actina	S: GGGTCAGAAGGATTCTATG A: GGTCTCAAACATGATCTGGG	210 - 447	238	3
E2 VPH-16	S: GACTGGATCCATGGAGACTCTTTGCCAACG A: GACTGAATTCCATCATATAGACATAAATCCAG	-----	900	4
E6 VPH-16	S: GACCCAGAAAGTTACCACAG A: GACCCAGAAAGTTACCACAG	-----	450	4
E7 VPH-16	S: ATGACAGCTCAGAGGAGGAG A: TCATAGTGTGCCCATTAACAG	-----	150	4

s: sentido, a:antisentido.

(1) Schnabel M., et. al., 2002³⁸; (2) NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov, (3) Santos Martínez, et al., 1997³⁹; (4) Nees M., et al, 2000⁴⁰.

II.4 Extracción de ARN total

Se realizó por medio del método del Trizol™ (isotiocianato de guanidina) de Invitrogen, después de su extracción se cuantificó por espectrometría a 260 y 280 nm (Anexo 4).

II.5 Reacción de transcriptasa reversa (RT)

La síntesis de ADNc se llevó a cabo con 2 µg de ARN total, 40 U de enzima Super Script II (SSII) Invitrogen. (Anexo 5)

II.6 Amplificación de los genes Notch 1 – 4

Para llevar a cabo la PCR se utilizaron 11 µg de ADN o ADNc como molde, en presencia de los oligos específicos para amplificar los genes de los receptores Notch. Se realizaron las mezclas de reacción con un volumen final de 25 µl en las siguientes condiciones: 5U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 2.5 µM de cada oligo (sentido y antisentido). Las mezclas de reacción se incubaron en un termociclador iCycler (BIO RAD) con el siguiente programa: 1 ciclo con temperatura inicial de desnaturalización de 95°C durante 5 minutos, 28 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de annaling

56°C por un minuto (Notch-1), 53°C por un minuto (Notch-2), 58°C por un minuto (Notch-3), 59°C por un minuto (Notch-4), 72° por 2 minutos y finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 10 minutos.

II.7 Amplificación de los oncogenes E2, E6 y E7 del VPH-16

La reacción de PCR se llevó a cabo en presencia de 11 µg de ADN genómico extraído de una porción de las biopsias de lesiones NIC3 y CaCU invasor. Las mezclas de reacción con un volumen final de 25µl bajo las siguientes condiciones, 5U Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 2.5µM de cada oligo (sentido y antisentido). Las mezclas de reacción se incubaron en un termociclador iCycler (BIO RAD) con el siguiente programa: un ciclo a una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 95°C por 1 minuto, 47°C por un minuto, 72° por 2 minutos y finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 10 minutos. Se incluyó una reacción de amplificación en presencia de los oligos universales MY 09-11, que amplifican cualquier genotipo de VPH, la composición de las mezclas de reacción es similar a las de VPH-16 sólo que se utiliza una mezcla de los oligos universales a una concentración de 5 µM, en el programa del termociclador la temperatura de annaling es de 57°C.

II.8 Electroforesis de ADN

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (Invitrogen) preparados con TAE 1x (Tris/Acido acético/EDTA) o SB 1x (Sodio/Acido Bórico) teñidos con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron y se analizaron en un fotodocumentador utilizando el software Chemi Doc de Quantity One (Bio Rad).

II.9 Análisis de resultados

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas SigmaPlot y Microsoft Excel. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA).

III. RESULTADOS

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los resultados obtenidos del análisis de los transcritos para los receptores Notch y Tabla 6 la presencia de infección por VPH-16. Se llevo a cabo un análisis semicuantitativo de la expresión, utilizando como control interno para cada muestra procesada el gen de la β -actina. En cada reacción de amplificación se utilizo la misma cantidad de ADNc para cada par de oligos empleados y poder comparar la intensidad de las bandas. Después se escaneó cada banda y se tomo el valor arbitrario de uno a la intensidad en píxeles de la banda de β -actina, en cada una de las muestras analizadas y se realizó la normalización dividiendo el valor de las intensidades obtenidas en las bandas correspondientes para cada receptor entre el valor de β -actina en cada una de las muestras.

III.1 Amplificación de transcritos de los receptores Notch y detección de los oncogenes de VPH-16 en NIC3

Se detectó la presencia de transcritos de los receptores Notch-2 y Notch-3, tanto en tejido normal (Figura 7) como en tejido de la lesión (Figura 8). En cuatro de los tejidos (Tabla 5) de lesión NIC3,

se observó la presencia de transcritos de Notch-4. No se detectó la expresión de Notch-1 en los tejidos de NIC3.

Tabla 5. Valores normalizados de intensidad de las bandas de los receptores Notch

Muestra No.	Tejido	Grado de Lesión	Notch-1	Notch-2	Notch-3	Notch-4	β -actina *
01	Normal		-	1.21	1.29	-	1
01	Lesión	NIC 3	-	1.04	1.22	-	1
03	Normal		-	0.83	1.41	-	1
03	Lesión	NIC 3	-	0.88	0	0.29	1
04	Normal		-	0.39	0.8	-	1
04	Lesión	NIC 3	-	0.43	1.29	0.45	1
06	Normal		-	0.79	1.48	-	1
06	Lesión	NIC 3	-	1.01	1.38	-	1
08	Normal		-	0.64	1.01	-	1
08	Lesión	NIC 3	-	1.16	1.18	0.68	1
11	Normal		-	0.65	1.28	-	1
11	Lesión	NIC3	-	0.89	1.47	0.56	1
02	Normal		-	1.16	1.18	-	1
02	Lesión	CaCU inv.	-	0.99	1.05	0.42	1
05	Normal		-	+	+	+	ND
05	Lesión	CaCU inv.	-	+	+	+	ND
07	Normal		-	0.82	1.18	-	1
07	Lesión	CaCU inv.	-	0.95	1.4	0.62	1
12	Normal		-	1.05	1.03	-	1
12	Lesión	CaCU inv.	-	1.15	1.35	0.68	1
09	Normal	Histerectomia	-	1.01	1.01	-	1
09	Lesión	-----					
10	Normal						
10	Lesión	NIC 1	-	1.03	1.05	-	1

+ amplificación,
- no amplificación,

* valor arbitrario (Intensidad-pixeles)
ND no determinado.

Todos los tejidos NIC3 analizados resultaron positivos utilizando los oligos universales MY 09-11, esto indica la presencia de VPH. De estos, cuatro tejidos mostraron el patrón esperado para la detección de ADN de VPH-16 (Tabla 6) (Figura 10A).

Tabla 6. Detección de infección por VPH

Muestra No.	Tejido	Grado de Lesión	E2 VPH-16	E6 VPH-16	E7 VPH-16	MY 09-11 universal
01	Normal		-	-	-	-
01	Lesión	NIC 3	+	+	+	+
03	Normal		-	-	-	-
03	Lesión	NIC 3	-	-	-	+
04	Normal		-	-	-	+
04	Lesión	NIC 3	+	+	+	+
06	Normal		-	-	-	-
06	Lesión	NIC 3	+	+	+	+
08	Normal		-	-	-	+
08	Lesión	NIC 3	-	-	-	+
11	Normal		-	-	-	+
11	Lesión	NIC3	+	+	+	+
02	Normal		-	-	-	+
02	Lesión	CaCU inv.	-	-	-	+
05	Normal		-	-	-	+
05	Lesión	CaCU inv.	+	+	+	+
07	Normal		-	-	-	+
07	Lesión	CaCU inv.	+	+	+	+
12	Normal		-	-	-	-
12	Lesión	CaCU inv.	+	+	+	+
09	Normal	Histerectomía	-	-	-	-
09	Lesión	-----				
10	Normal					
10	Lesión	NIC 1	-	-	-	+

+ amplificación - no amplificación

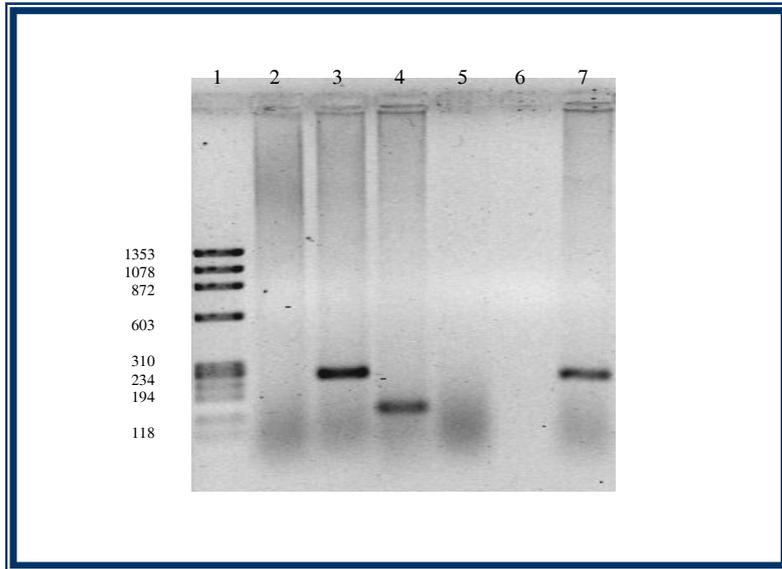


Figura 7. RT-PCR Notch-1 al -4 y β -actina. Ejemplo de patrón de amplificación de tejido normal. Carril: 1) Marcador de longitud de 100 pb, 2) Notch-1, 3) Notch-2, 4) Notch-3, 5) Notch-4, 6) β -actina ctr. (-) s/transcriptasa, 7) β -actina ctr. (+)

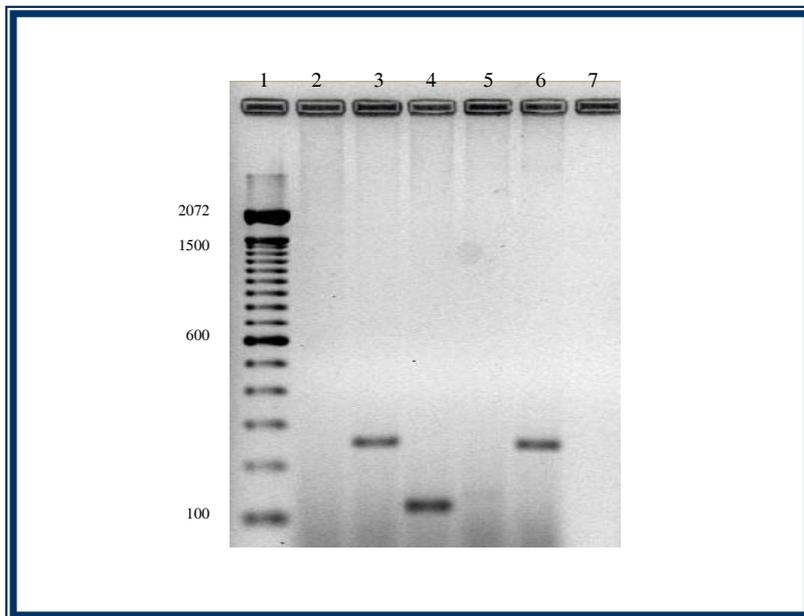


Figura 8 RT-PCR Notch-1 al -4 y β -actina.. Ejemplo de patrón de amplificación de lesión NIC3. Carril 1) Marcador de longitud de 100 pb, 2) Notch-1, 3) Notch-2, 4) Notch-3, 5) Notch-4, 6) β -actina ctr. (+), 7) β -actina ctr. (-) s/transcriptasa

III.2 Amplificación de transcritos de los receptores Notch y detección de los oncogenes de VPH-16 en CaCU invasor

En tejido con CaCU invasor (Tabla 5), al igual que en las muestras NIC3 analizadas, Notch-1 tampoco se detectó. Se observó la expresión de Notch-2. Los mismos resultados se observan para Notch-3. Notch-4 sólo es evidente en el tejido de la lesión y la banda es más notable en comparación con los tejidos de NIC3 (Figura 9).

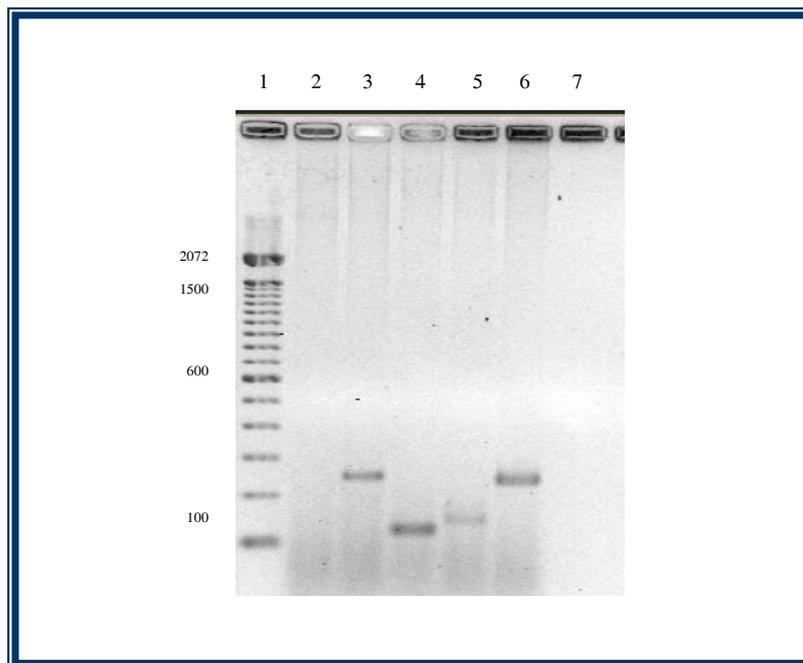


Figura 9 RT-PCR Notch-1 al -4 y ctr. β -actina. Ejemplo de patrón de amplificación en CaCU invasor. Carril: 1) Marcador de longitud de 100 pb, 2) Notch-1, 3) Notch-2, 4) Notch-3, 5) Notch-4, 6) β -actina ctr. (+), 7) β -actina ctr. (-) s/transcriptasa

Todos los tejidos de CaCU invasor analizados con los oligos MY 09-11, fueron positivos para VPH. Tres de los cuatro tejidos de CaCU

invasor resultaron positivos a la presencia de ADN de VPH-16 (Tabla 6) (Figura 10 B). Es importante señalar que dos tejidos de los considerados normales provenientes de pacientes con CaCU invasor resultaron positivos para MY 09-11, lo que indica la presencia de algún tipo viral y que a pesar de que su apariencia sea la de un tejido normal este ya tiene una infección en proceso. En la muestra 05 (Tabla 5) no fue posible amplificar el control de β -actina, debido a un bajo rendimiento de ARNm, sin embargo consideramos importante incluirla debido a que tanto el tejido normal y de la lesión se detectó transcrito de Notch-4.

El análisis de varianza (ANOVA) para la expresión relativa del ARNm de los receptores Notch-2 y Notch-3 ($P>0.05$), no mostró diferencias significativas en los distintos tejidos analizados (normal, NIC3 y CaCU invasor) a pesar de que se observa una tendencia de aumento en comparación con los tejidos normales.

La diferencia en los niveles de Notch-2 comparados en tejido normal (0.85 ± 0.044) contra NIC3 (0.863 ± 0.053) no tiene significancia estadística ($p=0.43$). Lo mismo sucede en la comparación entre tejido normal y CaCU invasor (1.03 ± 0.0075) ya que aunque se observa un aumento este no es significativo (Figura 11).

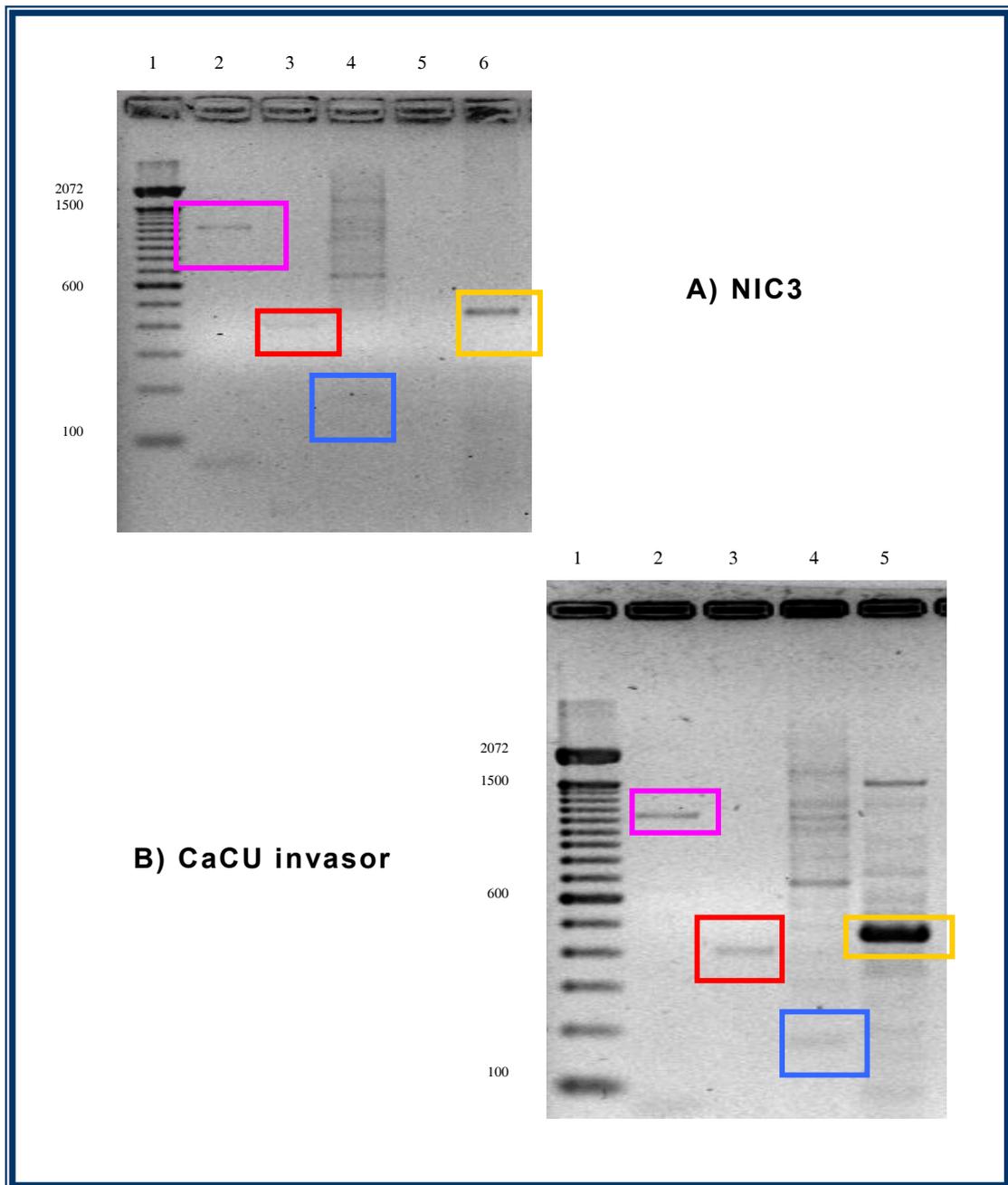


Figura 10. PCR oligos VPH-16 y MY 09-11. A) NIC3; B) CaCU invasor. Carril: 1) Marcador de longitud 100 pb, 2) E2 VPH – 16 aprox. 900 pb, 3) E6 VPH – 16 aprox. 450 pb, 4) E7 VPH – 16 aprox. 180 pb., MY 09 – 11 aprox. 450 pb

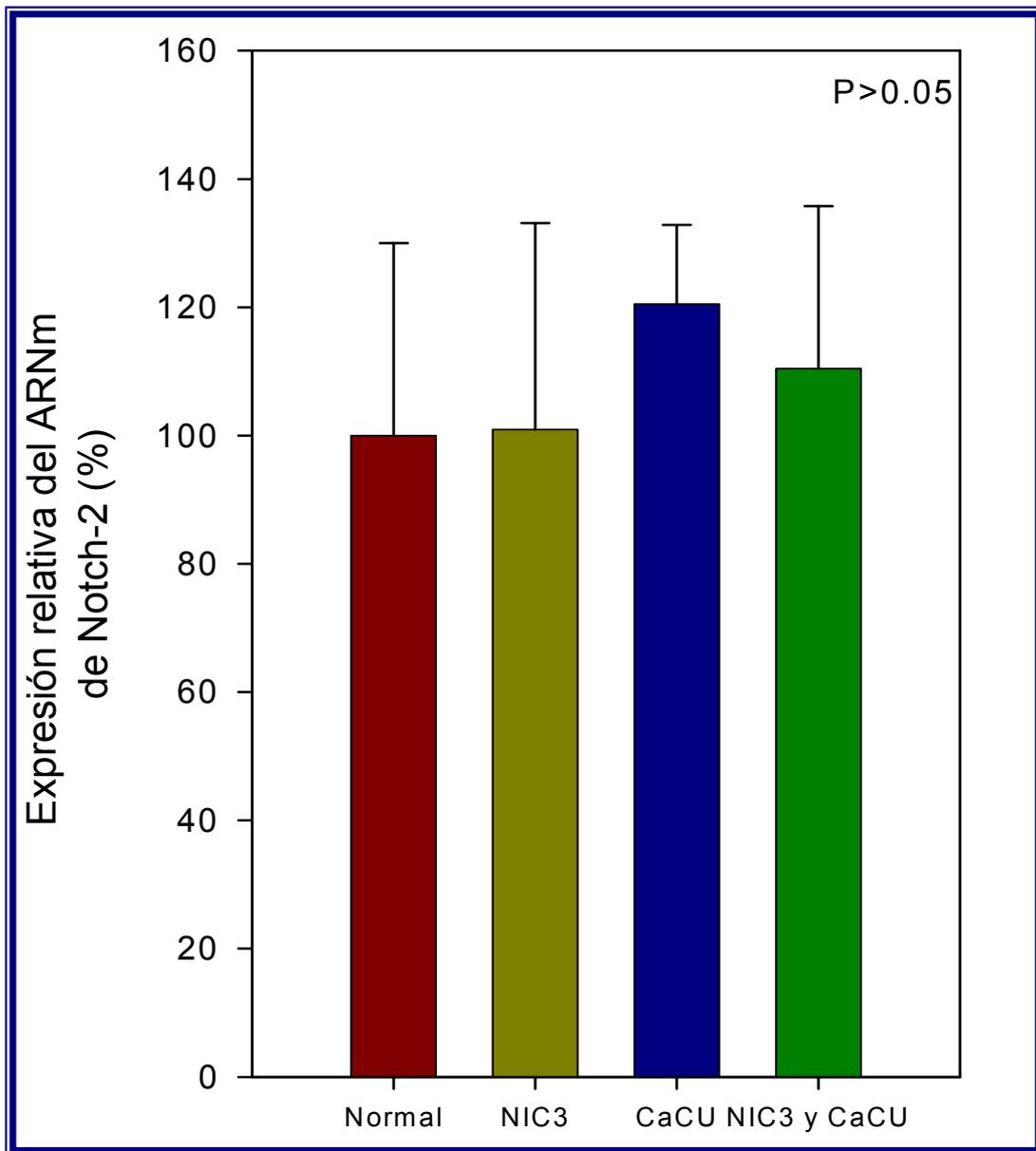


Figura 11. Expresión relativa del ARNm de Notch-2 en diferentes tipos de tejidos normal, NIC3, CaCU invasor. La categoría NIC3 y CaCU agrupa todos los tejidos de lesión analizados.

En el caso de Notch-3 existen diferencias en la comparación de los niveles de este receptor entre tejido normal (1.167 ± 0.0305) y NIC3 (1.29 ± 0.0279), al igual en la comparación de tejido normal y

CaCU invasor (1.26 ± 0.0253) pero estas diferencias no revelan significancia estadística ($p=0.32$) (Figura 12)

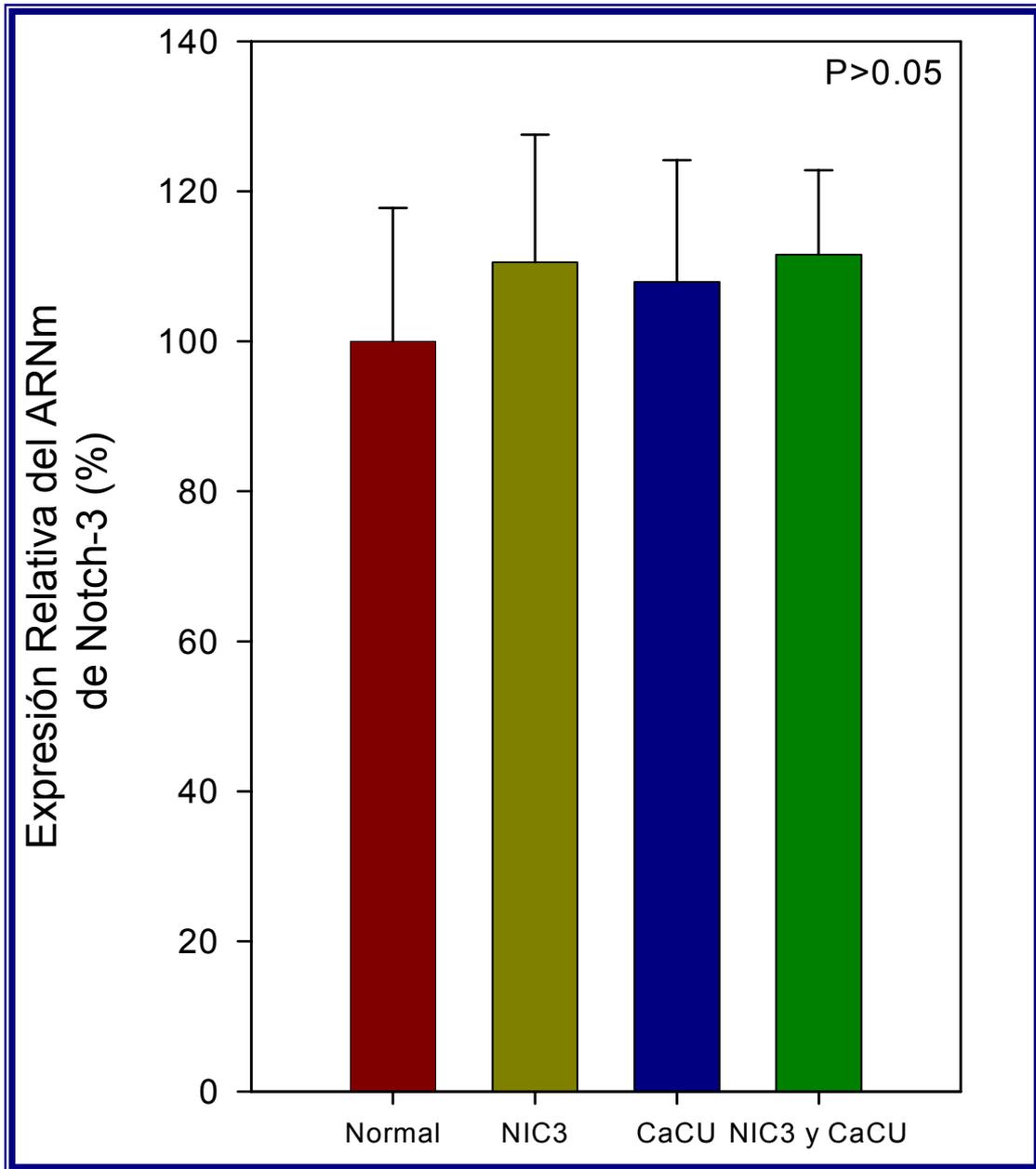


Figura 12. Expresión relativa del ARNm de Notch-3 en diferentes tipos de tejidos normal, NIC3, CaCU invasor. La categoría NIC3 y CaCU agrupa todos los tejidos de lesión analizados.

La expresión de Notch-4 sólo se detectó en tejido de lesión y se observa un aumento en los niveles del mensajero. Se aprecia un

cambio de expresión de NIC3 (0.33 ± 0.072) a CaCU (0.573 ± 0.0262), en comparación de tejidos normales en los que no se detecto expresión.

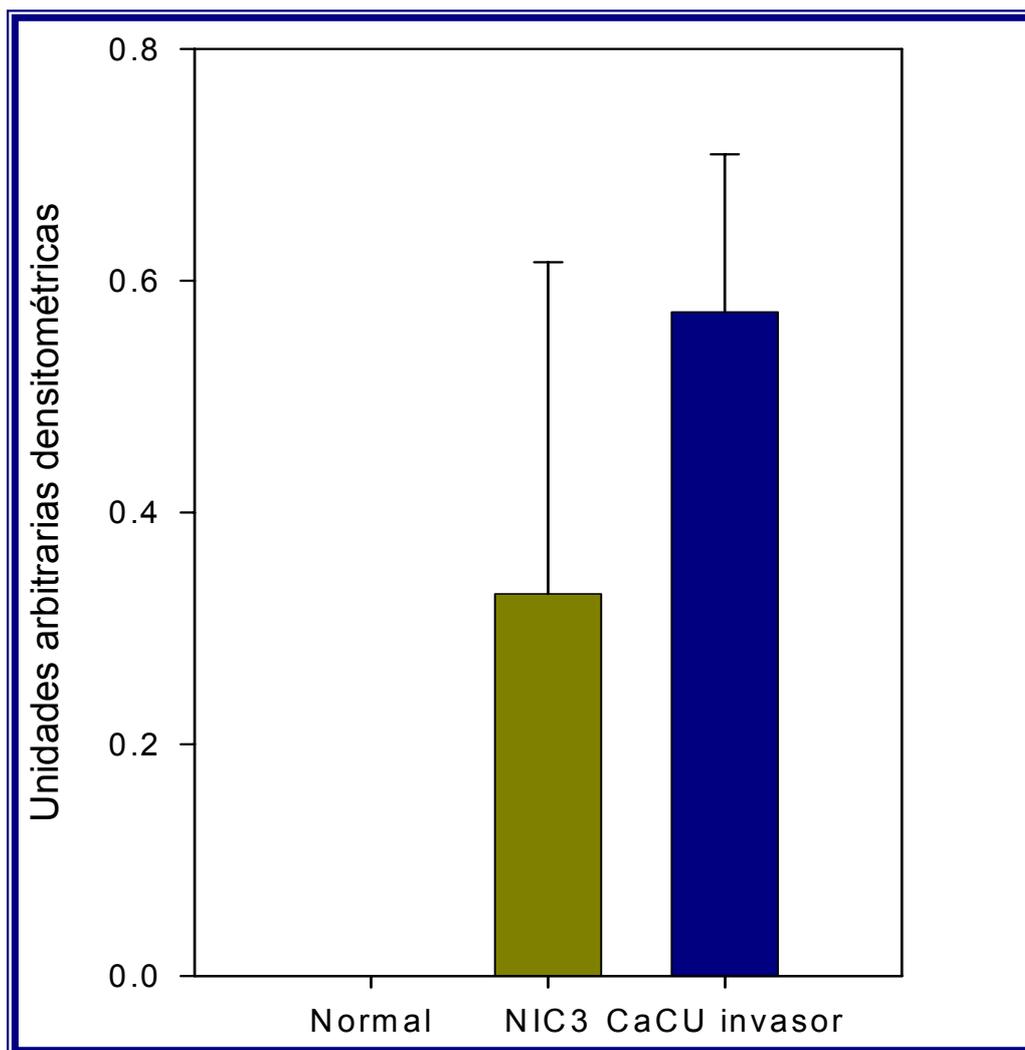


Figura 13. Valores promedio (unidades arbitrarias) de Notch-4 en diferentes tipos de tejidos normal, NIC3, CaCU invador.

IV. DISCUSIÓN

Los datos descritos en este trabajo muestran un patrón de expresión diferente a los reportados por otros autores para muestras de pacientes en estadios NIC3 y CaCU invasor.

Weijzen y cols. 2003⁹, reportaron sobreexpresión del receptor Notch-1 en líneas celulares que expresan E6/E7, pero en los casos aquí analizados no detectamos la expresión de Notch-1. La razón más probable de esta ausencia es la diferencia de muestras utilizadas ya que ellos analizaron líneas celulares establecidas de cáncer cervical y se sabe que estas no son representativas del evento *in vivo* esto en tejidos de lesión (NIC3 y CaCU invasor). En el caso de la ausencia en los tejidos normales, este es el primer trabajo de análisis del receptor en población mestizo-mexicana, y una posibilidad de que la actividad de este receptor varíe de acuerdo a la población estudiada y que sean otros receptores (Notch-2 y/o -3) los que participan en la activación de la vía. Esto se comprobará utilizando técnicas para la detección de proteínas (e. g. Western blot).

En el caso de Notch-2 los resultados obtenidos por nosotros concuerdan con los reportados por Talora y cols. 2002⁴¹, cuya expresión se encuentra aumentada y Notch-1 se observa disminuida o ausente en carcinomas invasores. Se ha reportado que ambos receptores están involucrados en el balance entre el

fenotipo neoplásico y la expresión sostenida de las oncoproteínas E6 y E7.

No existen reportes de la expresión de Notch-3 y Notch-4 en cáncer cervicouterino. Sin embargo está documentada la participación de Notch-3 en el desarrollo de leucemias. Se sabe que Notch-4 participa en el desarrollo de tumores mamarios, e inhibe la diferenciación; también se han asociado polimorfismos del gen en la como factor predisponente para esquizofrenia.

Este trabajo revela la participación de los receptores Notch-3 y Notch-4 en el proceso de transformación de células cervicales; el siguiente paso es identificar de que manera participan o si hay una desregulación de la señalización en condiciones normales contra cáncer.

La relevancia de este trabajo radica en la posibilidad de que tanto los receptores Notch-1 y Notch-2 como Notch-3 y Notch-4 podrían participar en el desarrollo del cáncer cervicouterino ya que se detectó la presencia de transcritos de los receptores en muestras con lesiones NIC3 y CaCU invasor. Es importante mencionar que las diferencias encontradas en este trabajo pueden variar de acuerdo a la población estudiada (e. g. población mestiza mexicana), estadio de la infección, genotipo de VPH y/o curso de otras enfermedades paralelas a CaCU.

En este estudio se encuentra ausencia del receptor Notch-1, de tal manera que se contemplan estudios futuros incluyendo la detección de los cuatro receptores en los diferentes estadios de la

enfermedad, para determinar si la proteína de Notch-1 está presente y para conocer si el ARNm de los receptores aquí encontrados se traduce a proteína, y así poder afirmar que si participan en el desarrollo de neoplasias cervicales.

V. REFERENCIAS

1. Hompling ER; *Cáncer de cérvix invasor; Diagnóstico y tratamiento: en oncología ginecológica*; 2ª edición; 2000;111- 140
2. Torres A, Herrera G, Torres R; *Cáncer de cuello uterino. Panorama actual de su epidemiología y de sus factores de riesgo*; Ginecol Obstet; 2004;72:466-474
3. Lacruz C; *Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001)*; REV ESP PATOL; 2003;36: 5-10
4. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999; 189:12-19.
5. Berumen CJ; *Virus de Papiloma Humano en México. Su asociación con la alta incidencia del cáncer de cerviz*; Gac Med Mex; 2003; 139
6. Stewart WB, Keihues P; *Cervical cancer; In: Cancers of the female reproductive tract. World Cancer Report. World Health Organization; IARC Press; 2003; 215-217*
7. Franco L, Schlecht N, Saslow D; *The epidemiology of cervical cancer*; The Cancer Journal; 2003; 9:348
8. Fawcet DW; *Tratado de Histología*; Interamericana; 1995; 12ª edición; 929
9. Weijzen S, Zoblin A, Braid M, Miele L, Kast M; *HPV-16 E6 and E7 oncoproteins regulate Notch-1 expression and cooperate to induce transformation*; Journal of Cellular Physiology; 2003; 194:356
10. Wolf J, Franco E, Arbeit J, Shroyer K, Crum C; *Innovations in understanding the biology of cervical cancer*; American Cancer Society; 2003; 2064
11. Taja-Chayeb L, Salas-García, Salcedo-Vargas M; *Bases moleculares de la carcinogénesis viral de papiloma y polioma*; Salud Publica Mexico; 1996; 38: 47
12. Grace E. Gray, Robert S. Mann, Efthimios Mitsiadis, Domingos Henrique, Maria-Louisa Carcangiu, Amy Banks, John leiman, David Ish-Horowitz, and Spyros Artavanis-Tsakonas; *Human Ligands of the Notch Receptor*; American Journal of Patology; 1999;vol. 154:785-794
13. Spyros Artavanis-Tsakonas, Matthew D. Rand, Robert J. Lake; *Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development*; Science; 1999; vol. 284:770-776
14. Kimble J, Henderson S, Crittenden S; *Notch/LIN-12 signaling: transduction by regulated protein slicing*; Elsiever Science; 1998; 23:353
15. Eric C. Lai; *Notch signaling: control of cell communication an cell fate; Development*; 2004; vol. 131:965-973
16. Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Honjo T, et al. Physical Interaction betewen a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-Jk/Su(H). Curr Biol 1995; 5:1416-1423.
17. Radtke F, Raj Kenneth; *The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor*; Nature; 2003; 3:1

18. Kadesch T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14:506-512.
19. Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ. Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity* 1998; 9: 777-786.
20. Miele L., and Osborne B. A.; *Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis*; *J. Cell Physiol*; 1999; vol. 181:393-409
21. Wu YJ, Rao Yi; *Fringe: defining borders by regulating the Notch pathway*; *Neurobiology*; 1999; 537
22. Veeraraghavalu K, Pet M, Kumar R, Nair P, Rangarajan A; *Papillomavirus-mediated neoplastic progression is associated with reciprocal changes in Jagged1 and manic Fringe expression linked to Notch activation*; *Journal Virology*; 2004; 78: 8687
23. Sade H, Krishna S, Sarin A; *The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells*; *Journal of Biological Chemistry*; 2004; 279: 2937
24. Moran JL, Johnston SH, Rauskolb C, Bhalerao J, Bowcock AM, Vogt TF. Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Maniac, and Radical fringe genes. *Mamm Genome* 1999; 10:535-541.
25. Spana EP, Doe CQ. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 1996; 17:21-26.
26. Harper JA, Yuan JS, Tan JB, Guidos CJ; *Notch signaling in development and disease*; *Clinical Genetics*; 2003; vol. 64:461-472
27. Nickoloff B. J., Osborne B. A., and Miele L.; *Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell modifying agents*; *Oncogene*; 2003; vol. 22:6598-6608
28. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; 66:649-661.
29. Allenspach E, Maillard I, Aster J, Pear W; *Notch signaling*; *Cancer biology and therapy*; 2002; 1: 466-476
30. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, Van Nort M, HUI CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F; *Notch 1 functions as a tumor suppressor in mouse skin*; *Nat Genet*; 2003; 33:416
31. Politi K, Feirt N, Kitajewski J; *Notch in mammary gland development and breast cancer*; *Cancer biology*; 2004; 14: 341
32. Zlobin A, Jang M, and Miele L; *Toward the rational design of cell fate modifiers: Notch signaling as a target for novel biopharmaceuticals*; *Curr Pharm Biotechnol*; 2000; 1:83
33. Zagouras P, Stifani S, Blaumueller C, Carcangiu M, Artavanis-Tsakonas S; *Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix*; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1995; 92:6414
34. Pradip Fair, Kumaravel Somasundaram, and Sudhir Krishna; *Activated Notch-1 inhibits p53-induced apoptosis and sustains transformation by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes through a PI3K-PKB/Akt-dependent pathway*; *J. Virol.*; 2003; vol. 77:7106-7112
35. Stephanie Latino, Janina Schaper, Meter Beard, and Kenneth Raj; *Notch-1 can contribute to viral-induced transformation of primary human keratinocytes*; *Cancer Research*; 2003; vol. 63:8687-8694

36. Parr C, Watkins G, Jiang G; *The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinopathological parameters in human breast cancer*; *Int Journal of Molecular Medicine*; 2004; 14:779
37. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Mammucari N, Aster JC, Radtke F, Dotto GP; *Activated Notch 1 signaling cooperates with papillomavirus oncogenes in transformation and generates resistance to apoptosis on matrix withdrawal through PKB/AkT*; *EMBO J*; 2001; 20:3427
38. Schnabel Michael, Ina Fichtel, Leo Goteen and Jürgen Schlegel. *Differential expression of Notch genes in human osteoblastic cells. International Journal of Medicine*; 2002; 9: 229-232
39. Santos-Martinez, L., L. Llorente, L. Baranda, Y. Richaud-Patin, B. Torres-Alvarez, B. Moncada, and R. Gonzalez-Amaro Profile of cytokine mRNA expression in spontaneous and UV-induced skin lesions from actinic prurigo patients. *Experimental Dermatology*. 1997 ;6 :91-97
40. Nees Matthias, Joel M. Geoghegan, Peter Munson, Vinayakumar Prabhu, Yun Liu, Elliot Androphy, and Craig D. Woodworth. Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming Growth Factor- β 2 in Cervical Keratinocytes. *Cancer Research*; 2000; 60:4289-4298.
41. Talora C, Sgroi D, Crum C, Dotto P; *Specific down-modulation of Notch-1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation*; *Genes & development*; 2002; 16:2252

VI. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo para extracción de ADN genómico de sangre periférica Kit MO BIO

1. Adicionar 200 µl de sangre en un tubo eppendorf y agregar 20 µl de proteinasa K.
2. Adicionar 200 µl de solución B1
3. Agitar en vortéx por 15 segundos
4. Incubar a 65°C por 10 minutos
5. Centrifugar por 5 segundos para remover las gotas de la tapa del tubo
6. Adicionar 200 µl de solución B2 y agitar en vortéx por 15 segundos
7. Centrifugar por un pulso.
8. Transferir la mezcla a una minicolumna
9. Centrifugar por 1 minuto a 13 000 rpm
10. Desechar el líquido filtrado.
11. Adicionar 500 µl de solución B3
12. Centrifugar por 30 segundos a 13 000 rpm
13. Cuidadosamente desechar el líquido filtrado.
14. Agregar 500 µl de solución B4
15. Centrifugar por 30 segundos a 13 000 rpm
16. Transferir el filtro a un tubo nuevo
17. Añadir 200 µl de solución B5
18. Incubar a 65°C por 5 minutos
19. Centrifugar por 1 minuto a 13 000 rpm
20. Remover cuidadosamente el filtro y descartarlo
21. Etiquetar el ADN obtenido e utilizar o almacenar a -20°C hasta su uso.

Soluciones:

B1: Guanidina HCl/Twen 20

B2: Etanol 100%

B3: Etanol/Guanidina HCl

B4: Etanol/Tris/NaCl

B5: Tris/HCl (10 mM, pH 8)

Anexo 2

Protocolo para extracción de ADN genómico de muestras de tejido cervical (kit MO BIO)

1. En un tubo con 2ml de solución de cuentas adicionar de 1 – 25 mg de tejido.
2. Sujetar horizontalmente al vortex y agitar a velocidad máxima por 10 minutos.
3. Centrifugar por 1 minuto a 10 000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo limpio (volumen aproximado 400 – 450 µl).
4. Adicionar 450 µl de la solución TD1, agitar en vortex durante 5 segundos.
5. Transferir de 600 – 650 µl de la muestra a una minicolumna y centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto. Descartar el líquido filtrado. Adicionar el resto de la muestra a la minicolumna y centrifugar de nuevo a 10 000 rpm por 1 minuto. Descartar el líquido filtrado.
6. Adicionar 400 µl de la solución TD2 y centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto.
7. Descartar el líquido filtrado.
8. Centrifugar de nuevo durante 1 minuto a 10 000 rpm para remover el resto de la solución TD2.
9. Cambiar cuidadosamente la minicolumna a un tubo limpio. Evitando que no se vaya nada de solución TD2 en la columna.
10. Adicionar 50 µl de solución TD3 sobre el centro blanco de la membrana.
11. Centrifugar durante 1 minuto a 10 000 rpm.
12. Repetir el paso 10 y 11, una o dos veces.
13. Descartar la columna. El ADN del tubo está listo para usarse. No se requieren pasos posteriores. Utilizar o almacenar el DNA a – 20 °C.

Anexo 3

Protocolo para la cuantificación de DNA

1. Preparar una dilución con agua destilada y DNA:
499 μ l de agua destilada + 1 μ l de DNA
Dilución 1 : 500
2. Leer en el espectrofotómetro a 260 nm, anotar las absorbancias obtenidas.
3. Calcular la cantidad de DNA obtenida con la siguiente fórmula:
 $(O. D. 260) (\text{factor de dilución}) (\text{coeficiente de extinción}) = \mu\text{g/ml}$
*El coeficiente de extinción para DNA es de 50 $\mu\text{g/m}$
4. Calcular la cantidad de DNA para la reacción de PCR.

Anexo 4

Protocolo de extracción de RNA total Método del Trizol™ Invitrogen

1. Pesar el tejido para verificar si son aproximadamente 100 mg.
2. Poner inmediatamente en nitrógeno líquido.
3. Adicionar 500 µl de trizol®, moler y homogenizar lo mejor posible.
4. Reposar por 5 minutos a 30°C.
5. Añadir 100 µl de cloroformo, agitar por inversión durante 15 segundos.
6. Reposar por 3 minutos a 30°C.
7. Centrifugar a 10 000 rpm por 15 minutos a 5°C o temperatura ambiente.
8. Recuperar el sobrenadante (fase acuosa clara), con cuidado de no traerse la interfase.
9. Adicionar 250 µl de isopropanol, mezclar por inversión y dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 10 000 rpm por 15 segundos a 5°C o temperatura ambiente.
11. Decantar cuidadosamente dejando la pastillita blanca que se forma al fondo del tubo, no siempre es visible.
12. Añadir 500 µl de etanol al 75% preparado con agua libre de RNasas (DEPC), despegar la pastilla para enjuagarla.
13. Centrifugar a 8 000 rpm durante 10 minutos a 5°C o temperatura ambiente.
14. Decantar quitando todo el etanol y dejar secar la pastilla al aire o en la incubadora a 37 – 42°C, hasta que el etanol se evapore, evitando dejar secar la pastilla por completo.
15. Resuspender en 22.5 µl de agua libre de RNasas (DEPC).
16. El RNA total del tubo puede ser procesado o congelado a – 70°C hasta su uso.

Protocolo para cuantificación de RNA total, para calcular la cantidad para transcriptasa reversa

1. Hacer una dilución del RNA total obtenido:
500 µl de agua + 2.5 µl de RNA total (factor de dilución 201)
2. Realizar la lectura en el espectrofotómetro en un rango de 260 a 280 nm.
3. Calcular la cantidad de RNA obtenido con la siguiente fórmula.
(O. D. 260)(factor de dilución)(coeficiente de extinción)= µg de RNA/ml
4. Análisis de la relación entre las absorbancias.
Absorbancias: 260 – Ácidos Nucleicos
280 – Proteínas
La relación entre estas debe ser mayor de 1.6 y menor de 2.0.
Menos de 1.4.- hay mucha proteína (relaciones de 1.2 aún son buenas)
Arriba de 2.0.- RNA degradado.

Anexo 5

Transcriptasa Reversa (RT)

1. Calcular el volumen de muestra necesario para tener 2 µg de RNA total y colocarlo en un tubo para PCR.

2. Añadir la cantidad de agua DEPC necesario para completar 10.8 µl.

3. Preparar el MIX 1:

Oligo dT	1 µl
dNTP mix 10 mM	<u>1 µl</u>
	2 µl

4. Agregar 2 µl del MIX 1 a cada tubo con RNA, e incubar a 65°C por 5 minutos; al término colocarlos inmediatamente en hielo. Centrifugar por un pulso para bajar las gotas que hayan quedado en la tapa.

5. Preparar el MIX 2:

First strand buffer 5x	4 µl
MDDT 0.1	2 µl
RNase OUT (inhibitor)	<u>1 µl</u>
	7 µl

6. Añadir 7 µl de MIX 2 a cada tubo de reacción mezclar suavemente e incubar a 42°C durante 2 minutos.

7. Añadir 0.2 µl de Super Script II (200 U) y mezclar por pipeteo (volumen fina 20 µl).

8. Incubar 10 minutos a 25°C.

9. Incubar 50 minutos a 42°C.

10. Inactivar reacción incubando a 70°C durante 15 minutos
(pasos 8 – 10 programa rt-termociclador)

11. Añadir 1 µl de RNase H de E. coli (2U) para eliminar el resto de RNA. Este paso es indicado para cuando el fragmento blanco es mayor de 1 kb.