



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

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Perfil de expresión a nivel transcripcional en
Cáncer cervicouterino y su relación con la vía de
señalización Notch.**

Tesis que presenta
M.C. Ma. Fabiola León Galván.

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias en Biología Molecular.

Director de Tesis:
Dra. Martha Leticia Santos Martínez.

Co-director de Tesis:
Ana Paulina Barba de la Rosa.

San Luis Potosí, S. L. P. Marzo de 2008.



Constancia de aprobación de la tesis

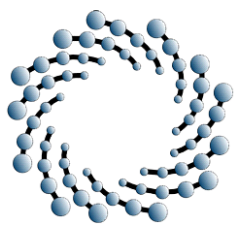
La tesis “**Perfil de expresión a nivel transcripcional en Cáncer Cervicouterino y su relación con la vía de señalización Notch**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ma. Fabiola León Galván** y aprobada el **26 de 02 de 2008** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
(Director de la tesis)

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
(Co-director de la tesis)

Dr. Roberto González Amaro
(Asesor de la tesis)

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
(Asesor de la tesis)



IPICYT

Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio 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 el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 193914.

Hoja en blanco para el acta de examen

*A mis Padres magnificos Martha y Jesús por darme la
vida*

A Dios por darme el alma...

*Por su apoyo incondicional en todos los proyectos de
mi vida*

*A mi hermanita Juanis y mis peques Merlene, Magaly, y
Evelin.*

*A Gabriel por todo su amor, ternura, paciencia
Por compartir su vida conmigo...*

*A mis Amigos Ramón, Alberto, Nelly, Efrén, Toñito,
Hera, Nahomy, Gustavo,
Haydeé, Sergio, Jacinto, Luis Manuel, , Jesús,, Luis
Gerardo, Teresa, Esaú,,
Benjamin, Carlitos, Roger y a todos los que omiti sin
querer...*

Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento a quienes hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

Al CONACyT por la beca otorgada

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

Al Instituto Tecnológico de Celaya.

The Haartman Institute, University of Helsinki, Finland.

A la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

A la **Dra. Leticia Santos** por la dirección de esta Tesis, por brindarme su confianza y por compartir conmigo sus conocimientos.

A la **Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa** por sus enseñanzas, apoyo y confianza, pero sobre todo por brindarme su gran amistad.

Al **Dr. Roberto González Amaro** por su apoyo en momentos difíciles y por sus sabios consejos y el tiempo dedicado a esta Tesis.

Al **Dr. Ramón Gerardo Guevara González** simple y sencillamente por todo y siempre...

Al **Dr. Antonio de León Rodríguez**, por abrirme las puertas de su laboratorio y por todo el apoyo brindado durante estos tres años, por su contribución al mejoramiento de esta Tesis y por su confianza.

Al **M.B Leandro Gabriel Ordoñez Acevedo** por sus sugerencias oportunas y el apoyo invaluable en la realización de esta Tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Molecular y al laboratorio de proteómica y expresión génica.

Contenido

Capítulo	Página
Constancia de aprobación de la tesis	i
Créditos institucionales	ii
Acta de examen	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	V
Lista de Tablas	vi
Lista de Figuras	vii
Anexos	viii
Abreviaturas	ix
Glosario	x
Resumen	Xi
Abstract	Xii

I. Antecedentes.

1. Cáncer cervicouterino.	1
2. Virus de Papiloma Humano (VPH)	3
3. Prevención, diagnóstico y tratamiento de CaCU	5
3.1 Prevención	6
3.2 Diagnostico	6
3.3 Tratamientos actuales de lesiones premalignas y CaCU	8
4. Señalización celular	8
4.1 Señales celulares	9
4.2 Vía de señalización Notch	9
4.3 Genes blancos de Notch	14
4.4 Funciones de la vía de señalización Notch	14
4.5 Relación de la vía de señalización Notch con algunas Enfermedades	14
5. Estrategias para el estudio de la expresión génica Diferencial	16
5.1 Hibridación sustractiva	17
5.2 Sustracción de cDNA bajo condiciones de supresión (SSH)	17
6. Estudios de expresión génica diferencial en CaCU	17

II. Objetivos y Justificación

III. Materiales y Métodos.

1. Obtención del tejido necesario.	22
2. Obtención de DNA	22
3. PCR para el diagnostico y tipificación de VPH	22
4. Extracción de RNA.	23
5. Síntesis de cDNA.	23
6. Hibridación Substractiva bajo Condiciones de Supresión	25

(SSH).	
7. Construcción de la biblioteca substractiva	31
7.1 Almacenamiento y recuperación de células en glicerol.	31
8. Macroarreglos	32
8.1 Marcaje y detección de la sonda.	32
8.2 Preparación de las muestras.	32
9.3 Hibridación	33
9. Análisis tipo northern.	34
10. RT-PCR	39
IV. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	35
1. Diagnóstico y tipificación de VPH	38
2. Extracción de RNA.	
3. Análisis de cDNA de doble cadena.	39
4. Hibridación Substractiva bajo Condiciones de Supresión (SSH).	41
5. Blioteca substractiva.	44
6. Amplificación por PCR de los fragmentos diferenciales.	45
7. Macroarreglos	45
8. Resultados de secuenciación.	49
9. Análisis de los datos de acuerdo a la base de datos Gene Ontology.	61
10. Análisis tipo Northern.	63
11 RT-PCR de los genes Notch-1, 2, 3 y 4.	78
V. Conclusiones	80
VI. Perspectivas	83
VII. Referencias	84
VIII. Anexos	92

Tabla		Página
1	Componentes y factores auxiliares de la vía Notch en diferentes especies.	13
2	Oligonucleótidos para diagnóstico de VPH	23
3	Proporciones de reactivos para la primera hibridación.	26
4	Reactivos para segunda hibridación.	27
5	Preparación de la mezcla de reacción para primer PCR.	28
6	Preparación de la mezcla de reacción para el segundo PCR.	29
7	Reactivos para restricción con <i>EcoRI</i> .	31
8	Oligonucleótidos para amplificar genes Notch.	34
9	Presencia de VPH en las muestras analizadas.	37
10	Resumen de presencia de VPH en diferentes estadios de progresión de CaCU	38
11	Fragmentos inducidos.	49
12	Fragmentos reprimidos.	49
13	Genes Inducidos en CaCU	51
14	Genes reprimidos en CaCU	57
15	Genes en los que se aumenta su nivel de expresión inducidos en CaCU.	59
16	Genes en los que se disminuye su nivel de expresión reprimidos en CaCU.	60
17	Niveles de expresión de los genes en NIC I	68
18	Niveles de expresión en NIC II	69
19	Niveles de expresión de los genes en NIC III.	70
20	Niveles de expresión de los genes en cáncer invasivo.	71
21	Expresión de genes en diferentes grados de progresión de CaCU	77
22	Expresión de genes relacionados con la vía de señalización Notch en diferentes grados de progresión de CaCU.	78

Figura		Página
1	Estadíos de progresión de cáncer cervicouterino.	1
2	Infección y persistencia de VPH en la progresión de cáncer cervicouterino.	3
3	Infección por VPH en la zona de transformación epitelial.	5
4	Estructura de los cuatro receptores Notch en mamíferos.	10
5	Vía de señalización Notch.	11
6	Síntesis cDNA (SMART)	25
7	Hibridación sustractiva.	30
8	Tipificación de VPH en CaCU	36
9	Extracción de RNA	39
10	Número de ciclos óptimos para síntesis de cDNA doble cadena.	40
11	Purificación de Cdna	41
12	Digestión con <i>Rsa</i> I	42
13	Primera amplificación por PCR de SSH.	43
14	Segunda amplificación por PCR de SSH.	44
15	DNA plasmídico digerido con <i>Eco</i> RI	44
16	Amplificación por PCR de los fragmentos diferenciales.	45
17	Sondas marcadas.	46
18	Macroarreglo de genes inducidos en cáncer.	47
19	Macroarreglo de genes reprimidos en cáncer	48
20	Perfil de la expresión génica de acuerdo a aspectos de los procesos biológicos	61
21	Perfil de la expresión génica de acuerdo a componentes celulares.	62
22	Perfil de la expresión génica de acuerdo a aspectos de función molecular.	62
23	Northern de diferentes genes involucrados en CC	63
24	RT-PCR de los genes Notch-1, 2, 3 y 4 en biopsias de cáncer cervicouterino en los diferentes estadíos.	79

Anexos

1. Oligonucleótidos	91
2. Procedimientos	94
3. Soluciones	98

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Agarosa/EtBr	Agarosa teñida con Bromuro de Etidio
Amp	Ampicilina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de suero bovino
CaCU	Cáncer cervicouterino
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
cm	Centímetros
Da	Daltones
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAasa	Enzima que hidroliza el Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's	Nucleótidos
DTT	Ditriotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRI</i>	Enzima de restricción que proviene de <i>E. coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>et al.</i>	Colaboradores
EtBr	Bromuro de etidio
FAO	Organización para la Agricultura y Alimentación
Fi-11-dUTP	Fluoresceína-11-dUTP
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
kpb	Kilo pares de bases
M	Molar (moles por litro)
min	Minutos
mM	Milimolar (10^{-3} moles por litro)
MOPS	Ácido 3-(N-Morfolino)-propanesulfónico
MPM	Marcador de tamaño molecular
N	Normalidad (miliequivalente gramo por mililitro)
NH ₄ Oac 4 M	Acetato de amonio 4 Molar

NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
No.	Número
ng	Nanogramos
RNA	Ácido Ribonucleico
NTES	Regulador de extracción de Ácido Desoxiribonucleico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polientilenglicol
pH	Potencial de iones Hidronio
Poli A	Extremo 3' del ARNm
RNAasa	Enzima que hidroliza el ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA poly A	RNA _m
RNA _t	Ácido ribonucleico de transferencia
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
TAE	Tris Acetato con Ácido Etilendiaminotetraacético
TE	Tris Base con Ácido Etilendiaminotetraacético
TNE 1X	Tris HCl con NaCl y EDTA
Tween 20	Polyoxyethylene sorbitan monolaureate
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Relación volumen-volumen
w/v	Relación peso-volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa

Perfil de expresión a nivel transcripcional en Cáncer Cervicouterino y su relación con la vía de señalización Notch.

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, expresión génica, vía Notch.

Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCU) es la primer causa de mortalidad en mujeres en México, y la segunda a nivel mundial. Entre las causas principales para el desarrollo de cáncer se encuentran la presencia de mutaciones, deleciones, translocaciones e inserciones virales en los genes. El Virus de Papiloma Humano (VPH) está asociado en el 99% de los casos diagnosticados, aunque no es el único factor determinante. El sistema de señalización Notch está implicado en eventos celulares esenciales como el desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis, esta vía está involucrada en varias de enfermedades humanas principalmente en cáncer, se ha reportado que la desregulación de los genes Notch, sin embargo el mecanismo exacto de participación de esta vía para la generación de neoplasia no es claro, se desconoce aún la existencia de componentes que puedan interactuar con la vía y que además pueden estar involucrados en la diferenciación tumoral. Se ha demostrado que dependiendo del nivel de expresión y del contexto celular, los receptores de membrana Notch contribuyen claramente en la resistencia a apoptosis en células tumorales. En este trabajo, se evaluó el perfil del transcriptoma de CaCU para la identificación de los genes que se inducen y/o reprimen en presencia de fenotipo neoplásico y la posible participación que tiene en la regulación de la vía Notch. El estudio se realizó en biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino en los diferentes estadios de la enfermedad (NIC I, NIC II, NIC III y cáncer Invasor).

En resumen, se identificaron 175 genes inducidos, 62 reprimidos, 182 con cambio en el nivel de expresión y 31 genes con expresión constitutiva. De manera notable se identificaron los genes Notch-1, 3 y 4, algunos de sus ligandos (Delta-like-1) y otros genes que recientemente se han reportado en la vía de señalización Notch.

En conclusión, se sugiere que además del VPH como factor determinante del desarrollo de CaCU, se requiere de otros elementos, e.g. la desregulación de los componentes de la vía de señalización Notch y de genes relacionados con esta vía, además de genes oncogénicos.

Transcriptome profile in cervical cancer and its relationship with the Notch signaling pathway.

Key words: *Cervical cancer, expression gene, Notch pathway*

Abstract

The cervical cancer (CC) is the first cause of death in women in Mexico and the second worldwide. 99% of the cases diagnosed with CC are affected by the Human Papilloma Virus (HPV), however other factors are involved. In the last years, there are reports about over expression of the Notch signaling pathway elements in a great variety of a human tumors including CC. However, the exact mechanism of the participation of this pathway is not clear. It is unknown yet the existence of elements that could interact with this pathway and that possibly involved in the tumor differentiation. Among the main causes for the development of CC are the presence of mutations, deletions, translocations, and insertions of viral genes. The Notch signaling pathway is involved in essential cellular events such as development, differentiation, proliferation, and apoptosis. In addition, this pathway has been involved in several human diseases, mainly in cancer.

It has been demonstrated that depending of the expression level and the cellular context, the Notch receptors contribute clearly in the resistances to apoptosis in tumor cells. In this work, we study the transcriptome profile in CC for identification of genes that are induced and /or repressed in the present of a neoplastic phenotype and the possible participation in the Notch via. In this study we used biopsies from patients with CC in the different stages of the disease (CIN I, CIN II, CIN III, and invasive cancer).

We identified 175 induced genes, 62 repressed gene, 182 with a slight but significative change on the level of expression. From the total 31 genes were expressed constitutively. We identified Notch-1, 3 and 4 genes, one ligand (Delta-like-1) and other genes that have recently been implicated in the Notch pathway.

As a conclusion we suggest in this work that HPV is a determinant factor for the development of CC and requires of other regulation elements e.g. deregulation of the components of Notch signaling pathway and genes related to this pathway, in addition to genes oncogenics.

1. Cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino (CaCU) es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial. En nuestro país el CaCU, junto con el cáncer de mama, son las principales causas de muerte en la población femenina, con 4 mil 500 decesos anuales (Muñoz *et al*, 2003). Este tipo de cáncer representa el 13% de las neoplasias femeninas malignas reportadas en México, y es uno de los problemas de salud mas graves en México (Lewis, 2004).

El CaCU es una enfermedad crónico-degenerativa que involucra la proliferación y transformación celular con características morfológicas y metabólicas diferentes a las originales (Muñoz *et al*, 2003). Esta neoplasia es precedida por diferentes estadios pre-cancerosos o displásicos: neoplasia intra-epitelial cervical leve o grado I (NIC I), moderada o grado II (NIC II) y severa o grado III (NIC III o carcinoma *in situ*) y finalmente termina en carcinoma invasor cuando las células neoplásicas del epitelio cervical atraviesan la membrana basal e invaden el tejido subyacente (Schiffman, *et al*, 2007, 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 mitótica (Cortés-Gutiérrez, *et al* 1995).

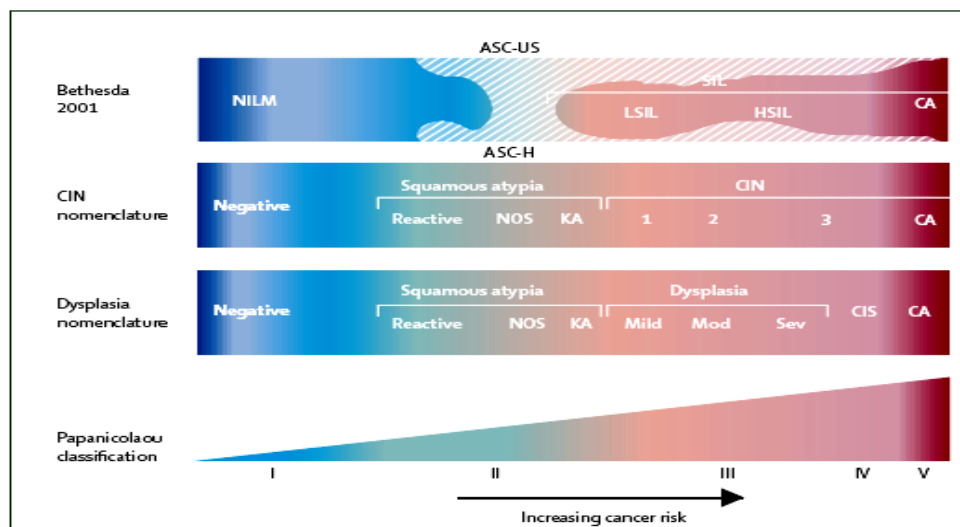


Figura 1. Estadios de progresión de cáncer cervicouterino. (Schiffman, *et al*, 2007).

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 exocérnix. La zona de unión entre estos epitelios se denomina zona de transición escamo-columnar o zona de transformación. Esta zona 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 intraepiteliales, incluyendo la infección por el virus de papiloma humano (VPH). El VPH es el factor de riesgo más establecido para el desarrollo de CaCU (Berumen *et al*, 2003). En estudios epidemiológicos incluyen el comportamiento sexual, número de gestas, enfermedades venéreas, uso de anticonceptivos orales y tabaquismo (Syrjänen *et al.*, 2000).

Se ha reportado la presencia de VPH en el 99% de los casos de CaCU diagnosticados. Este virus del VPH se transmite por vía sexual, y la infección es más frecuente en mujeres jóvenes en su primera década de actividad sexual.

Las infecciones persistentes y pre-cancerosas se establecen, por lo general, dentro de los primeros 5-10 años al menos en el 10% de las infecciones por VPH, el cáncer invasor se desarrolla a lo largo de muchos años, incluso décadas (Figura 2), la tasa máxima se presenta en mujeres de aproximadamente 35-55 años de edad. Cada genotipo de VPH actúa como una infección independiente que potencia el riesgo de cáncer (Schiffman, *et al.*, 2007).

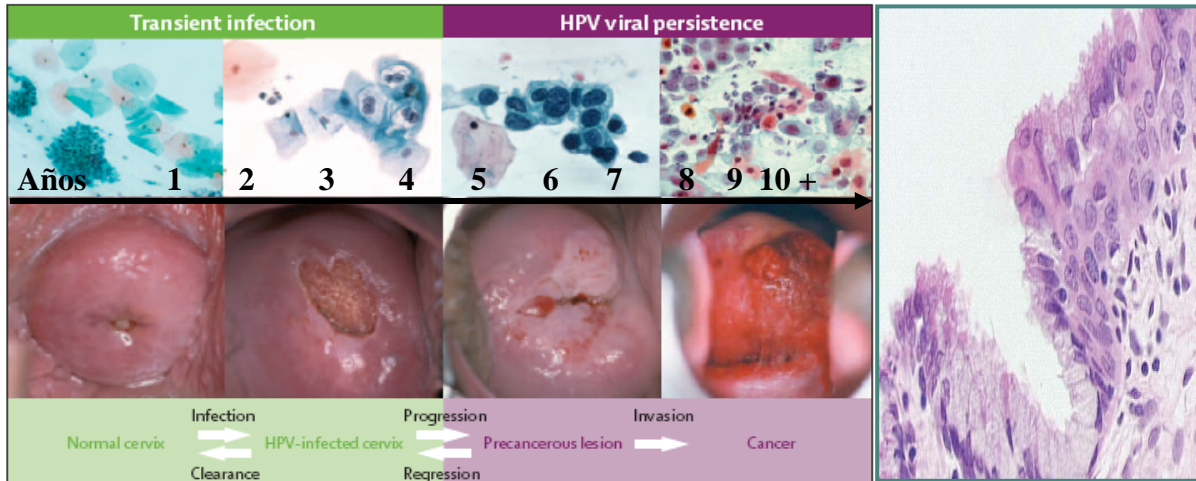


Figura 2. Infección y persistencia de VPH en la progresión de Cáncer cervical. (Schiffman, *et al.*, 2007).

2. Virus de Papiloma Humano.

Los virus de papiloma humano (VPH), son los miembros más estudiados de la familia *Papillomaviridae*, son virus sin cubierta, con cápsides icosaédricas formadas por 72 capsómeros (Zur Hausen, 1999), de 55 nm de diámetro (Shanley, 2002). Son virus de DNA con un genoma circular de doble cadena de aproximadamente 8 Kb (Terai y Burk., 2001).

La organización genómica de los VPH es conservada entre los más de 120 genotipos (Figura 3).

De manera general el VPH tiene la siguiente organización genómica: constan de una región temprana (E, *early*) que codifica de 6 a 7 proteínas tempranas [E6, E7, E1, E2, E4 (E8 y E5)], una región tardía (L, *late*) que codifica 2 proteínas tardías (L1 y L2) y 2 regiones regulatorias: la región larga de control (LCR long control region) y región pequeña no codificante (Seedorf *et al.*, 1985)

Las proteínas E participan en la transformación celular y en la replicación viral, específicamente las proteínas E1 y E2 modulan la replicación del DNA viral y de la regulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7. La proteína E4 se unen a filamentos intermediarios y se cree que facilitan la liberación de las partículas virales y están involucradas en la regulación post-transcripcional (Doorbar, 2000). Los genes tardíos L codifican para las proteínas que constituyen la cápside, El gen L1 codifica la proteína mayor de la cápside, y el gen L2 codifica una proteína

secundaria de la cápside. Los diferentes tipos de papilomavirus comparten al menos del 90% de homología en L1. La región LCR es una región reguladora, contiene el origen de replicación viral, que es parcialmente diferente entre los diversos tipos de VPH (Doorbar, 2003)

De acuerdo a su potencial oncogénico, los VPH se han clasificado en genotipos de bajo y alto riesgo. En los de bajo riesgo se encuentran los tipos VPH-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, y -81; y de alto riesgo u oncogénicos los tipos VPH-16 -18, -31, -33, -35, -39, -45, 52, -56, -58, y -68. Se ha determinado que los VPH tipos 16, 18, 45 y 58 son los más oncogénicos (Syrjänen *et al.* 2000; Clifford *et al.*, 2003).

Los VPH son selectivos del epitelio, los de bajo riesgo provocan transformación benigna que causa verrugas o condilomas y los de alto riesgo pueden conducir a la transformación maligna que lleva al cáncer invasor (Walboomers *et al.*, 1999).

Los VPH de alto riesgo, pueden integrarse al genoma celular y provocar la inmortalización celular, debido a la integración y expresión de sus genes tempranos en el genoma celular, tal como se ha reportado en queratinocitos (Di Paolo, 1993).

La proliferación descontrolada de las células del epitelio cervical se asocia a la integración del genoma viral al genoma celular, en este proceso se interrumpe el marco de lectura del gen E2 provocando su represión. La proteína E2 activa provoca la represión a nivel transcripcional (promotor P97) de los oncogenes virales E6 y E7. La represión del gen E2 se manifiesta en la sobreexpresión del RNA mensajero de estas dos proteínas. Las oncoproteínas E6 y E7 interrumpen la regulación del ciclo celular, E6 reconoce a la proteína supresora de tumores p53 e induce su degradación proteolítica vía proteosoma, previniendo el arresto celular 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 degradación, esto conduce a la célula infectada a un proceso de proliferación e inmortalización (Werness, 1990).

Las mutaciones que afectan los motivos YY1 de la región larga de control del genoma de VPH se han asociado con una integración rápida del genoma viral al genoma celular (Syrjänen *et al.* 2000).

Existen cuatro pasos principales en el desarrollo de cáncer cervical: 1) Infección metaplásica del epitelio cervical en la zona de transformación, 2) Persistencia viral, 3) progresión de la infección epitelial precancerosa cervical, y 4) Invasión a través de la membrana basal epitelial (Figura 3).

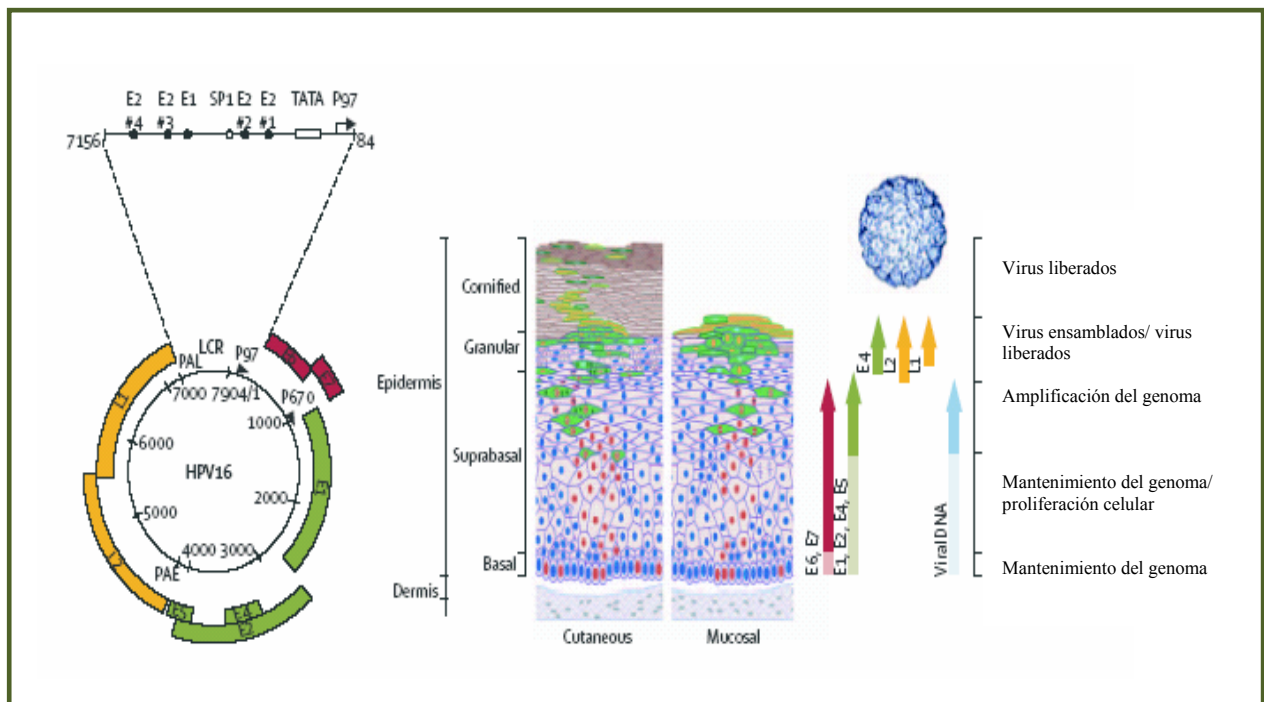


Figura 3. Infección por VPH en la zona de transformación.

3. Prevención, diagnóstico y tratamiento de CaCU.

Los avances en la etiología, diagnóstico y tratamiento del cáncer cérvico uterino, han impactado en la disminución de las tasas de mortalidad por esta patología

(Sanfilippo *et al.*, 2006). Sin duda, la prevención y el diagnóstico temprano son la mejor solución para disminuir la incidencia y mortalidad por CaCU.

3.1 Prevención

La prevención del cáncer cérvicouterino, es complicada debido a que requiere de cambios en el estilo de vida sexual. En este sentido, la prevención está enfocada a realizar acciones orientadas a disminuir los factores y cofactores de riesgo que aumentan la posibilidad de contagio por patógenos (Larios, 2006).

En este contexto, la prevención del cáncer cérvico uterino esta enfocada en dos aspectos:

- Prevención primaria con la aplicación de vacunas profilácticas para evitar la infección por virus papiloma humano tipos 16 y 18.
- Prevención secundaria, referente a la detección temprana de la enfermedad
Un aspecto fundamental es la detección de lesiones intraepiteliales antes de que evolucionen a cáncer invasivo o detectar éste en una etapa temprana (*in situ*).

No obstante los avances en este campo, continúa siendo primordial la educación para la salud y la promoción de un ejercicio de la sexualidad de manera informada, segura, responsable (Sanfilippo *et al.*, 2006).

3.2 Diagnóstico.

Los esfuerzos de prevención del cáncer cérvicouterino en todo el mundo se han centrado en el tamizaje de las mujeres en situación de riesgo, empleando las pruebas de Papanicolaou y el tratamiento de las lesiones precancerosas. El procedimiento de tamizaje se realiza mediante la prueba de Papanicolaou que se desarrolló en los años treinta y se le dio el nombre de su inventor el Dr. George Papanicolaou. Este método permite realizar un diagnóstico citológico de probable lesión cervical, incluye desde la ausencia de lesión, pasando por los cambios inflamatorios no patológicos y todo el espectro de displasias leve, moderada y severa, el cáncer *in situ* y el cáncer invasor, (Tapia *et al.*, 2003).

El objetivo principal de la técnica de Papanicolaou es detectar de manera temprana lesiones precursoras antes de que evolucionen a cáncer, para ser atendidas o para que reciban tratamiento oportuno, tomando en cuenta los lapsos de tiempo de evolución que presentan.

Existen otros métodos de diagnóstico y son: la visualización cervical con ácido acético, pruebas de Shiller, pruebas de biología molecular, colposcopia e histopatología (PPAPC, 2005).

Las pruebas de biología molecular están enfocadas a la detección molecular de VPH, principalmente la carga viral de los tipos 16 y 18 detectada por PCR en tiempo real (Valdez *et al.*, 2007).

3.3 Tratamientos actuales de lesiones premalignas y CaCU.

El tratamiento específico depende de la severidad, extensión y localización de la lesión o lesiones.

Existen dos procedimientos: el de ablación y el de escisión.

- 1) El procedimiento de ablación destruye el tejido anormal por necrosis. El método más utilizado es la crioterapia, y consiste en la aplicación de nitrógeno líquido. Es un procedimiento efectivo en un 80 ó 90% en el tratamiento de lesiones de alto grado. La principal desventaja es que no permite la obtención de muestra histológica para su posterior estudio patológico.
- 2) Procedimiento de escisión, permite obtener especímenes histológicos. Este es más efectivo para tratar lesiones grandes y lesiones endocervicales. La técnica electroquirúrgica de escisión (LEEP por sus siglas en inglés: Loop Electrosurgical Excision Procedure) utiliza un asa de alambre eléctrico fino para remover completamente la zona de transformación afectada en el cuello uterino. Este procedimiento es efectivo en un 90 o 95% en el tratamiento de displasias de alto grado.

Para los casos de cáncer invasor, el tratamiento depende del grado de avance del cáncer. Entre los tratamientos se encuentran la histerectomía, la radioterapia y la quimioterapia o una combinación de ellos (Tapia *et al.*, 2003)

4. Señalización celular.

4.1. Señales celulares.

En todos los organismos multicelulares, la supervivencia depende de una red compleja de comunicaciones intercelulares basadas en la generación de una señal con respuesta específica en ciertas células blanco.

Las señales se definen también como interacciones celulares y se clasifican de la siguiente forma:

La señal se domina endócrina cuando las moléculas señal (hormonas) actúan sobre una célula objetivo distante del sitio de síntesis, por lo general este tipo de moléculas son transportadas a través del torrente sanguíneo desde el sitio de liberación hasta la célula objetivo. En la señal parácrina las moléculas señal liberadas por una célula solo afectan a células objetivo muy cercanas. En las señales autocrinas las células responden a sustancias que liberan por si solas, tal es el caso de muchos factores de crecimiento. Este tipo de señal es en particular común en células tumorales, muchas de las cuales producen y liberan un exceso de factores de crecimiento para estimular su propia proliferación no regulada, proceso que puede llevar a la formación de masas tumorales. Otro tipo son las Señales yuxtacrinas, que son transmitidas a lo largo de la membrana celular a través de proteínas o lípidos que integran la membrana celular y son capaces de afectar tanto a la célula emisora como a las células inmediatamente adyacentes (Lodish *et al.* 1997).

Existe un grupo de vías de señalización que están implicadas en la regulación de diferentes destinos celulares, proliferación, y muerte celular programada (apoptosis) (Bray, 2006).

En este grupo de vías, la señalización Notch juega un papel fundamental en el equilibrio entre la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Runzi *et al.*, 2003).

4.2 Vía de señalización Notch.

El gen Notch fue descubierto en la década de los 80's en *Drosophila melanogaster* y se ha descrito genéticamente conservado en la escala filogenética.

En *D. melanogaster* se ha descrito un solo gen solo gen Notch, en *C.elegans* se han reportado 2 parálogos LIN-12 y GLP-1, mientras que en *Homo sapiens* existen 4 genes Notch (Artavanis-Tsakonas, *et al.*, 1999).

Los genes Notch codifican para receptores transmembranales que constan de los siguientes elementos:

- 1) **Un dominio extracelular (EC):** Contiene secuencias repetidas en tándem, similares a las del factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) y tres repetidos ricos en cisteína (LNR). 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 LNR previenen la activación de la señalización en ausencia del ligando.
- 2) **Un dominio transmembranal (TM):** Se encarga de transmitir la señal al núcleo.
- 3) **Un Dominio Intracitoplásmico (NICd):** Contiene un dominio RAM que posee una alta afinidad de unión a proteínas (factores de transcripción), seis repetidos de ankirina (ANK) necesarias para la transmisión de señales, dos secuencias de localización nuclear (NLS 1 y 2), una secuencia NCR, regiones de respuesta a citocinas, un dominio de activación transcripcional (TAD) y secuencias PEST (región rica en prolina-glutamato-serina-treonina) que tienen propiedades proteolíticas (Figura 4).

El tamaño de los receptores Notch es de 300 Kilodaltones (KDa), su estructura es similar pero presentan las siguientes diferencias (Figura 4):

- 1) En el dominio extracelular de Notch-1 y 2 tienen 36 repetidos EGF, Notch-3 tiene 34 y Notch-4 tiene 29 repetidos.
- 2) El dominio de transactivación no se encuentra presente en los receptores Notch-3 y Notch-4 (Grace *et al.*, 1999; Santos *et al.* 2006).

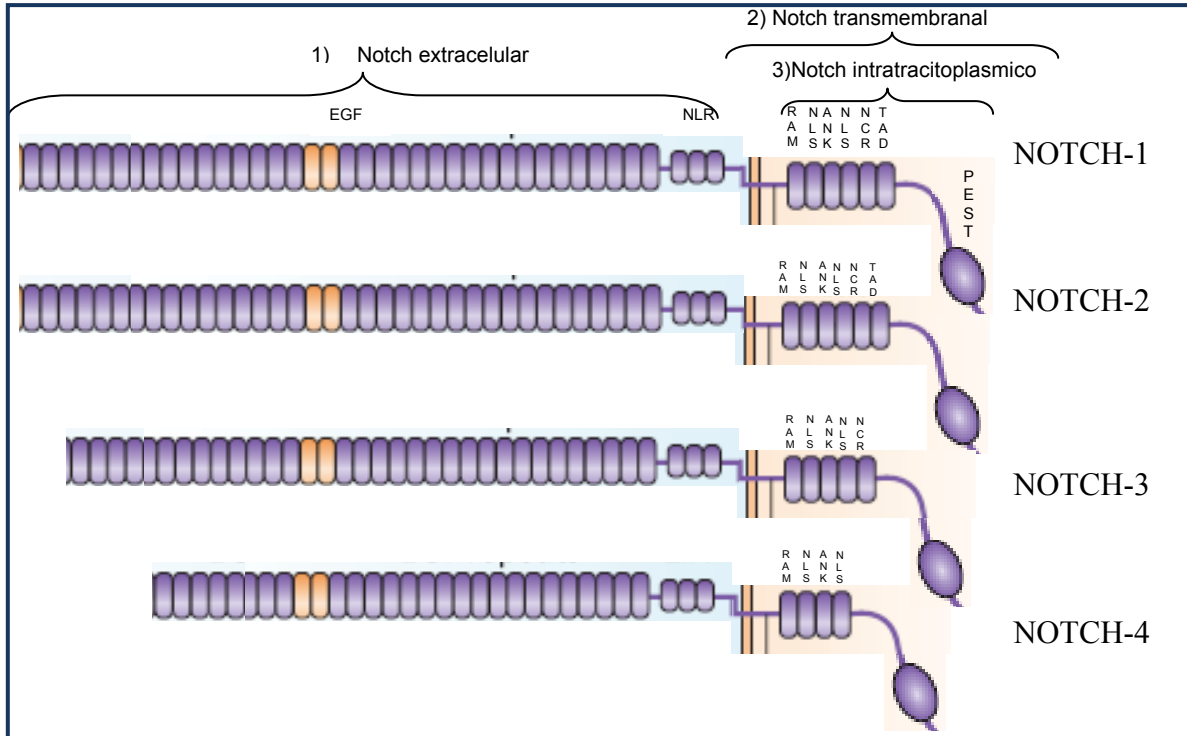


Figura 4. Estructura de los receptores Notch en mamíferos.

- 1) Región extracelular: EGF, LNR,
- 2) Región transmembranal
- 3) Región intracitoplasmica: RAM, NLS1 y 2, ANK, NCR, TAD, PEST.

Las proteínas Notch, están clasificadas como proteínas transmembranales tipo I, son activadas por interacción directa con su ligando expresado en células vecinas (Artavanis-Tsakonas *et al* 1999; Radtke F *et al* 2003), esta interacción promueve dos cortes proteolíticos: el primer corte es catalizado por la familia de ADAM-metaloproteinasas, mientras que el segundo es mediado por gamma-secretasa, una enzima compleja que contiene presenilina, nicastrina entre otros, (Fortini, 2002; Mumm *et al.*, 2000).

El segundo procesamiento proteolítico libera el dominio de Notch intracitoplásmico (NICd, por sus siglas en ingles), que se transloca al núcleo e interactúa a través del dominio RAM con factores de transcripción de la familia CLS (CBF-1/Lag-1/Suppressor of hairless). Al unirse CLS a IC se disocia un complejo represor que incluye una diacetilasa de histonas (hdac-1), y recluta co-activadores nucleares como SKIP y MAML-1 (Mastermind), y acetil transferasas de histonas, lo que hace

a CLS actuar entonces como un activador transcripcional, (Tamura, 1995; Nickoloff, 2003) (Figura 5).

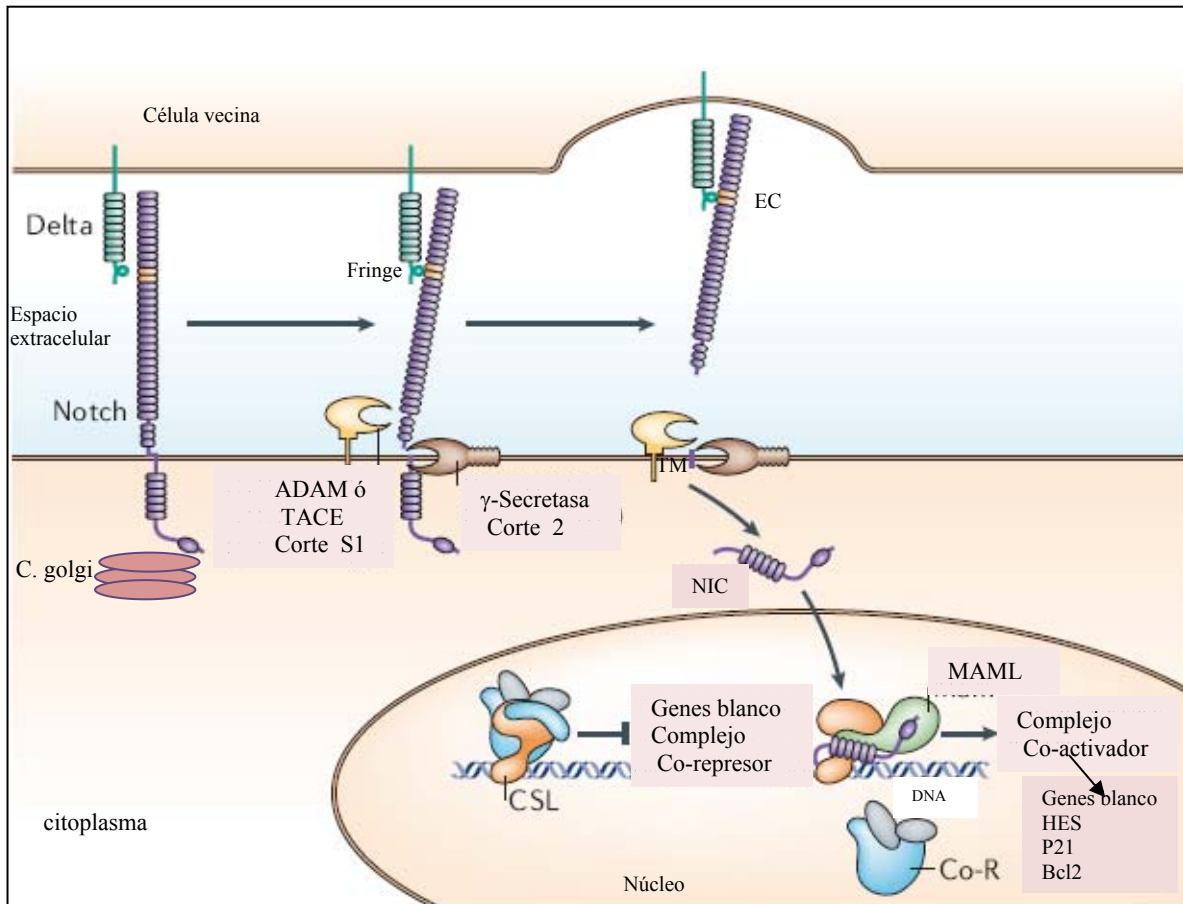


Figura 5. Vía de señalización Notch (Modificado Bray, 2006).

Ligandos de Notch son proteínas transmembranales que estructuralmente, comparten muchas características con los receptores Notch, las modificaciones moleculares que presentan son similares incluyendo el procesamiento proteolítico, (Klug *et al.* 1998; Qui *et al.*, 1999).

Los ligandos de Notch son conocidos como ligandos DSL (Delta y Serrate en *D. melanogaster*, LIN-1 en *C. elegans*). En humanos se han descrito 5 tipos de ligandos de Notch: Delta-like 1,3 y 4, y Jagged-1 y 2 (homólogos de Serrat en *D. melanogaster*) (Gray *et al.*, 1999). Su estructura es conservada y constan de los siguientes elementos: una secuencia señal, una región N-terminal no conservada

de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, un dominio familia específico Delta y/o Serrate (Jagged en humanos), un número variable de repetidos EGF, un dominio transmembranal (TM), y un dominio no conservado intracelular (IC). La expresión de los ligandos de Notch es muy dinámica y contribuye significativamente a diferenciar la actividad de esta vía (Bray, 2006; Grace *et al*, 1999).

El tamaño del complejo nuclear Notch es de aproximadamente 1.5 MDa, involucra NICd y CLS, en este complejo se han asociado polipéptidos de la familia de las mastermind-like (MAML), pero por el tamaño del complejo, es probable que existan otros componentes aún desconocidos (Kadesch *et al*, 2004).

Se ha establecido que los ligandos de Notch interactúan directamente con las proteínas ubiquitina E3 ligasa, Neuralized (neur) y Mind Bomb (Mib) y que esta interacción es importante para la activación del ligando, (Chitnis *et al*. 2006; Le Borgne *et al*. 2005), la falta de alguna de estas proteínas puede inhibir la activación del ligando, provocando su acumulación en la superficie celular e inducir endocitosis, impidiendo de esta manera la unión con el receptor Notch y la subsecuente señalización.

Otras proteínas descritas en la modulación o activación de la vía Notch son las proteínas Fringe, su función es la regulación de la activación de la vía Notch dependiente de la unión receptor-ligando (Veeraraghavalu *et al.*, 2004). Fringe es clasificada como una glucosiltransferasa Se identificó primero en *Drosophila* y posteriormente en mamíferos, reportándose tres variantes de estas proteínas: Manic Fringe, Lunatic Fringe y Radical Fringe (Sade *et a.l*, 2004). Estas proteínas glicosilan a los receptores y a sus ligandos. Específicamente Fringe cataliza la adición de β 1,3-N acetilglucosamina sobre los residuos preexistentes de O-fucosa unidos a las repetidos EGF de los receptores y de los ligandos, acción que evita la unión receptor-ligando y por lo tanto inhibe la activación de la señalización (Figura 5). Esta modulación de la vía de señalización Notch ocurre a nivel extracelular (Moran *et a.l*, 1999). La modulación a nivel intracitoplasmático no es del todo clara, estudios anteriores reportan la participación de las proteínas NUMB que

inhiben la inducción dependiente de la región activa del receptor Notch (NICd), esta regulación es más una acción antagonista a la acción de Notch (Spana *et al.*, 1996; Harper *et al.*, 2003).

En la tabla 1 se presentan los componentes de la vía de señalización Notch (Bray, 2006).

Tabla 1. Componentes y factores auxiliares de la vía de señalización Notch en diferentes especies (Bray, 2006).

Tipo de componente	<i>Drosophila melanogaster</i>	Vertebrados y mamíferos	<i>Ceanorhabditis elegans</i>
Receptor	Notch	Notch 1-4	LIN-12, GLP-1
Ligando	Delta, serrate	Delta 1-4/A-D, Serrate, Jagged 1-2	APX-1, LAG-2, ARG-1, DSL-1
CSL DNA-binding protein	Su(H)	CBF1/RBPkj	LAG
Co-activador	Mastermind	Mastermind1-3	LAG-3
Co-represor	Hairless, SMRTS	SMRT	
gamma-secretasa	Presenilina, nicastrina, APH1, PEN2	Presenilina1-2, nicastrina, APH1, PEN2	SEL-12/presenilina, APH-2/nicastrina, APH-1/PEN-2
Glicosiltransferasa	Fringe	Lunatic Fringe, Radical Fringe, Manic Fringe	
Metaloproteasa, corte de receptor	Kuzbanian, Tace CG7908	ADAM 10, TACE/ADAM 17	SUP-17/Kuzbanian, ADAM-4/TACE
Ring finger E3 (receptor de regulación)	Mind bomb 1	Mind bomb 1-2	
Ring finger E3 (receptor de regulación)	Neuralized	Neuralized 1-2	F10D7.5
HECT dominio 3 (receptor de regulación)	Deltex	Deltex	
F-box E3 (nuclear)	Su(dx), NEDD4	Itch, NEDD4	WWP-1
Numb citoplasmático, inhibidor de Notch	Archipealago	FBW7/SEL10	SEL-10
Numb asociado a cinasas	Numb	Numb, Numb-like	
4-pass proteína transmembranal, regulador positivo	San podo		
Inmunoglobulina tipo C2, molécula de adhesión.	Echinoid		IGMC-1
Represor bHLH, genes blanco	E(spl)Bhlh	HES/ESR/HEY	REF-1
Inhibidor E3 neuralized.	Bearded, Tom, M4		

4.3 Genes Blanco de Notch

Al formarse el complejo nuclear CLS-NICd- Co-activadores nucleares- acetil transferasas de histonas (Tamura, 1995; Nickoloff, 2003), activan la transcripción de genes blanco que principalmente están implicados en diferenciación y proliferación celular. Un ejemplo de estos genes que ha sido bien estudiado es HES: (hairy/enhancer of split) que modula negativamente a genes de la familia achaete-scute, que inducen la diferenciación neuronal (Deftos *et al*, 1998; Miele *et al* 1999; Wu *et al.*, 1999). Otros tipo de genes que son regulados por esta vía de señalización son los implicados en la regulación de la progresión de la fase G1 del ciclo celular (e.g. p21), procesos anti-apoptosis (BCL2, NFkB2), y en la regulación de las síntesis de interlucina (IL-4) e interferones.

4.4 Funciones de la vía de señalización Notch.

Las funciones de la vía de señalización Notch se han descrito en toda la escala filogenética. En *C.elegans* la función de la vía de señalización Notch está involucrada en la proliferación en la línea germinal. En *D. melanogaster* participa en la inhibición de neurogénesis, miogénesis y cardiogénesis, regulación de gliogénesis, linaje neural y hematopoyético. En el humano participa en la regulación de linfogénesis, desarrollo vascular y hepatico, entre otras, además de las descritas también para *D. melanogaster* (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

La desregulación de la vía de señalización Notch está ligada a varios tipos de enfermedades humanas, al igual que otras vías de señalización asociadas al desarrollo y proliferación celular y se ha reportado que perturbaciones en esta vía pueden contribuir a la tumorigénesis (Nickoloff *et al*, 2003).

4.5 Relación de la vía de señalización Notch con algunas enfermedades.

Se ha reportado la participación de los componentes de esta vía en enfermedades humanas, como Alzheimer, síndrome de Alagille, CADASIL, y cáncer en el que destacan leucemias, neuroblastomas, cáncer cervicouterino, de mama, tumores mucoepidermoides, carcinomas renales, cáncer de piel y cáncer pulmonar.

Entre los factores mejor conocidos que pueden alterar esta vía de señalización se encuentran la presencia de mutaciones, deleciones, translocaciones e inserciones virales en los genes de la vía Notch (Radtke *et al* 2003; Santos *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la sobreexpresión de Notch-1 promueve la renovación de células troncales hematoyéticas (Stier *et al.*, 2002).

En leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL), se han detectado mutaciones en el gen Notch-1 y translocaciones en Notch-3 (9:7 (q34.3)), (Radke, 2003), en el 2004 Aster *et al.*, reportaron que mutaciones en TAD de este mismo gen son las responsables de T-ALL.

En células de epitelio mamario de ratón, se ha reportado la inserción de oncoproteínas virales que provocan una ganancia de función de Notch-1 independiente del ligando, (Yanagawa *et al.*, 2000), mientras que en células Reed-Sternberg (linfoma Hodgking) y células mesoteliales (con SV40) la ganancia de función es dependiente del ligando. Esta diferencia se debe a que la inserción promueve la sobreexpresión del ligando, (Joutel *et al.*, 1998).

En cáncer de mama se ha reportado una sobreexpresión de los genes Notch-1 y 2 y una expresión constitutiva de Notch-4, contrario a lo reportado en melanoma donde los niveles de expresión de Notch-1 y 2 disminuyen, en carcinomas de pulmón, riñón, colon, cabeza y cuello se presenta una sobreexpresión de Notch-1. (Allenspach, 2002). En algunos casos la activación constitutiva de la señalización Notch puede causar arresto celular en cáncer de pulmón de células pequeñas, asociado con el bloqueo del ciclo celular en la fase G1, (Sriuranpong *et al.*, 2001), y en cáncer de próstata se ha reportado que la sobreexpresión activa de Notch inhibe la proliferación celular (Shou *et al.*, 2001). Zagouras *et al.* en 1995 reportaron una sobre expresión del gen Notch-1 en cáncer cervicouterino y en carcinomas de células escamosas. Weijzen *et al.* en el 2003 demostraron que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 regulan la expresión y la actividad del gen Notch-1 de manera positiva y además que la regulación es principalmente pero no exclusiva postranscripcional.

Estos hallazgos sugieren la señalización Notch puede ser importante para el mantenimiento del fenotipo neoplásico en carcinomas cervicales que expresan VPH.

5. Estrategias para el estudio de la expresión diferencial.

La tecnología del DNA recombinante facilita el análisis del nivel de mRNA que se está expresando y que dará origen a la proteína, por lo que se ha generalizado la medición del mRNA como indicador del nivel de expresión génica.

Existen varios procedimientos para el análisis del transcriptoma: el análisis de representación diferencial (RDA), despliegue diferencial (DD), escrutinio por hibridación diferencial (DHS), construcción de bibliotecas sustractivas (SLC), hibridación de arreglos convencionales de cDNA, análisis seriado de expresión génica (SAGE), hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH) y Microarreglos.

5.1 Hibridación Sustractiva.

Esta tecnología permite comparar poblaciones de cDNA proveniente de RNAm y obtener clonas de genes que son expresados en una población pero no en otra.

Aunque existen diferentes métodos, la Hibridación sustractiva, presenta ciertas ventajas sobre las otras, la primera es que es relativamente simple, consiste en lo siguiente: Ambas poblaciones de RNAm (control y problema) se convierten a cDNA (que específicamente contiene transcritos expresados diferencialmente en la muestra problema y en la muestra control), ambos cDNA se hibridan y las secuencias que hibridan son removidas, los cDNA no-hibridados representan los genes expresados en la condición problema, pero están ausentes en la condición control. Aunque los métodos tradicionales de hibridación sustractiva han tenido éxito en algunos casos, éstos requieren varias hibridaciones y no detectan mensajeros poco abundantes (Digid y Dinader, 1990; Hará *et al*, 1991).

5.2 Substracción del cDNA bajo condiciones de supresión (SSH).

La substracción de cDNA seleccionados por PCR (Clontech), es un método basado en la amplificación selectiva de secuencias expresadas diferencialmente y elimina las limitaciones técnicas de los métodos convencionales (Diatchenko *et al*, 1996).

En esta técnica, los cDNA se sintetizan a partir de RNAm de las dos condiciones que están siendo comparadas. Los cDNA problema y control se digieren con la enzima *RsaI*, el cDNA problema digerido se divide en dos alícuotas y cada uno se liga a un diferente adaptador. Ambos adaptadores no poseen grupo fosfato, de esta forma, solamente uno de estos une al 5' terminal (los dos adaptadores poseen una región secuencias idénticas para permitir el alineamiento de oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos por PCR), para el cual primero deben rellenarse los extremos).

En la SSH se realizan dos hibridaciones, a partir de las dos alícuotas mencionadas en el párrafo anterior, en la primera hibridación, las muestras se desnaturalizan por calor, lo que permite el alineamiento entre segmentos similares en ambas condiciones. En la segunda hibridación ambas alícuotas de cDNA problema con exceso de cDNA se juntan en una sola en presencia de cDNA control en exceso, de esta forma se lleva a cabo la sustracción de genes constitutivos. Mediante una primer PCR con los oligonucleótidos que se unen a las secuencias similares presentes ambos adaptadores se amplifican los cDNA que representan genes expresados diferencialmente, y posteriormente mediante un segundo PCR con oligonucleótidos anidados, se enriquecen los fragmentos expresados diferencialmente (Diatchenko *et al*, 1996).

6. Estudios de expresión génica diferencial en cáncer.

La progresión del cáncer es una serie de estados histopatológicos dirigidos por la acumulación de alteraciones genéticas que consecuentemente repercuten en cambios en la expresión génica, los cuales pueden dirigir células normales a estados de hiperplasia, displasia, cáncer invasivo e incluso a metástasis (Volstein

et al. 1988). La búsqueda de cambios genéticos se ha desarrollado en diferentes modelos incluyendo cáncer de pulmón, mama, cabeza y cuello, próstata y cervicouterino entre los más estudiados, en este contexto se han identificado genes supresores de tumores y oncogenes. Sin embargo no ha sido suficiente para el entendimiento del desarrollo y progresión de esta enfermedad. La identificación de nuevos genes y vías involucradas en cáncer podrían ser la base para un entendimiento más certero de los procesos biológico-moleculares, y pueden proveer además nuevos blancos para el diagnóstico temprano y facilitar el diseño de nuevos tratamientos (Garnis *et al.*, 2004).

Los estudios de expresión génica en estadíos tempranos y en etapas de progresión de cáncer son relativamente pocos, por lo que aun no existe una asociación entre los cambios histopatológicos y la expresión génica (Baak *et al.*, 2007). En cáncer cervicouterino existen algunos reportes de estudios de expresión génica por medio de varias técnicas, una de las más utilizadas es la tecnología de microarreglos de DNA. Por ejemplo Dencko *et al.* (2000) emplearon la técnica de RDA para estudiar el mecanismo de regulación epigenética de los genes expresados en células de cáncer cervicouterino, considerando como factor de estudio el microambiente celular. En este estudio se detectó la sobreexpresión de los genes HIG1 y HIG2 (Gen inducido por hipoxia) como respuesta a la integración de las oncoproteínas virales E6 y E7, este último dato fue confirmado por análisis en la línea celular SiHa y CaSki (Dencko *et al.* en el 2000).

Wong *et al.* (2003) realizaron un estudio sobre la expresión génica en biopsias de pacientes que recibieron algún tratamiento de radioterapia y quimioterapia, previo al estudio. Para este fin, emplearon la tecnología de microarreglos de cDNA para identificar genes que están implicados en el efecto de los tratamientos que actualmente se emplean en CaCU. Esto con la finalidad de proponer blancos específicos de acción, en su estudio reportaron genes relacionados con el daño al DNA y con proteínas de unión, que presentaron una sobreexpresión notoria entre los tratamientos. También se estudio se identificaron los genes HIG reportados previamente por Dencko *et al.* (2000). Los genes identificados se relacionaron con la expresión del factor de transcripción T-box 19, que incrementa sus niveles

respecto a la células de las pacientes que no se sometieron a ningún tratamiento, concluyendo que el aumento de hipoxia tumoral está implicado en la resistencia a los tratamientos actuales principalmente en la radioterapia (Wong *et al.* en el 2003; Kitahara *et al.*, 2002). Steinau *et al.* realizaron un análisis del perfil del transcriptoma en exfoliados de células de cáncer cervicouterino, empleado la tecnología de microarreglos. Los autores reportaron 26 genes, la mayoría de ellos implicados en las funciones del metabolismo y en los procesos fisiológicos celulares, y comunicación celular. De forma sobresaliente en su estudio reportan la sobre expresión de la enzima ubiquitin-conjugatin E2 variante tipo I, que participa en la degradación de p53 a través de la interacción con la oncoproteína E6 de VPH (Steinau *et al.*, 2005).

Chao *et al.* (2007), reportaron la sobreexpresión de genes, en líneas celulares de cáncer cervicouterino y en tejido neoplásico, mediante microarreglos de cDNA y microarreglos por oligonucleótidos, se enfocaron en la identificación de genes implicados con apoptosis (BIK, TEGT, SSI-3), para proponerlos como genes para inducir apoptosis mediante RNAi. Gidus *et al.* (2007) empleando microarreglos de cDNA, realizó un estudio completo utilizando microdisecciones de epitelio y como control utilizaron células de estroma subyacente de cuello uterino de pacientes en diferentes estadios de progresión de CaCU, dirigiendo su estudio a genes expresados por estadio de progresión, edad y raza. Los genes identificados en NIC I fueron reportados como genes relacionados con proliferación e inmunosupresión, probablemente en respuesta a la infección ocasionada por VPH, en NIC II los genes están implicados con pro-angiogénesis, lo que sugiere la cooperación de señales que interactúan provenientes de células sanas y neoplásicas, Gidus *et al.*, 2007). Lyng *et al.* (2006) mediante microarreglos identificaron la sobreexpresión de genes asociados con el fenotipo metastásico en carcinomas cervicouterinos avanzados.

Otros estudios realizados están enfocados a la evaluación de la expresión diferencial por microarreglos de muestras en diferentes estadios de progresión infectadas por diferentes tipos de VPH (VPH-16, 18, 58), cuyo objetivo es identificar el mecanismo de acción del virus, los genes implicados en

reconocimiento y respuesta al patógeno, para proponer en un futuro tratamientos basados en RNAi . (Salcedo *et al.*, 2007)

II. OBJETIVOS.

Objetivo General.

Estudiar del transcriptoma en cáncer cervicouterino mediante hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión e identificar mecanismos moleculares relacionados a la vía de señalización Notch.

Objetivos específicos.

1. Analizar la expresión genética diferencial en muestras de cáncer cervicouterino en los diferentes estadios NIC I – CaCU Invasor, mediante Hibridación Sustractiva bajo condiciones de Supresión (SSH).
2. Inferir el posible papel de los genes que se inducen y/o reprimen diferencialmente en las diferentes etapas de CaCU y en la vía de señalización Notch.
3. Establecer la relación con los genes diferenciales con la vía de señalización Notch.

Justificación

El cáncer ocupa el segundo lugar como causa de mortalidad del total de fallecimientos en México sólo después de las enfermedades coronarias. A pesar de los programas actuales de salud (SSA, IMSS, ISSSTE), el estado de San Luis Potosí, ocupa el sexto lugar entre los estados con mayor incidencia de cáncer cervicouterino.

Las evidencias presentadas indican que el sistema de señalización Notch está frecuentemente desregulado en cáncer y su regulación podría ofrecer una nueva estrategia terapéutica. Los estudios sobre la vía de señalización Notch han revelado la importancia de su función al controlar las decisiones del destino celular incluyendo eventos en el desarrollo, y diferenciación de células troncales en diversos tejidos. Con el objetivo de regular la señalización Notch u otras vías implicadas. Se ha propuesto encontrar genes involucrados en el desarrollo y progresión de CaCU.

III. MATERIALES Y METODOS

1. Obtención de muestras.

Se obtuvieron biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino de los diferentes grados de lesión (NIC I, NIC II, NIC III y Cáncer Invasor).

De la misma paciente, se tomaron biopsias de la lesión, y biopsias de tejido aparentemente sano de un punto lejano a la lesión.

Las Biopsias fueron proporcionadas por el Dr. Alberto Cuevas, de la Clínica de Displasias del Hospital General Zona 01 del Instituto Mexicano del Seguro Social, San Luis Potosí, S.L.P.

Las biopsias se extrajeron y congelaron inmediatamente en Nitrógeno líquido hasta el momento de su uso y se almacenaron a -80°C .

2. Extracción de DNA.

La extracción de DNA genómico de las biopsias de tejido cervical normal y de tejido lesión se realizó de acuerdo a las instrucciones propuestas en el kit de extracción de DNA genómico Ultra Clean, tissue DNA isolation kit (MO BIO laboratorios, Inc). El DNA obtenido se cuantificó por espectrometría a 260 nm.

3. PCR para el diagnóstico y tipificación de VPH.

La reacción de PCR se realizó utilizando 200 ng de DNA genómico de las biopsias de lesiones y de las biopsias de tejido sano. Mediante la PCR se amplificaron las oncoproteínas E2, E6 y E7 de VPH-16, se incluyó también una reacción de amplificación para los oligos universales MY 09-11, que amplifican cualquier genotipo de VPH (los reactivos para PCR se presentan en el del anexo II).

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron y se analizaron en un fotodocumentador utilizando el Chemi Doc software de Quantity One (Bio Rad). Para el diagnóstico y tipificación de VPH se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos para diagnóstico de VPH.

Gen	5' ----- 3'	Tamaño molecular
E2 VPH-16	S: GACTGGATCCATGGAGACTCTTTGCCAACG A: GACTGAATTCCATCATATAGACATAAATCCAG	900 pb
E6 VPH-16	S: GACCCAGAAAGTTACCACAG A: GACCCAGAAAGTTACCACAG	450 pb
E7 VPH-16	S: ATGACAGCTCAGAGGAGGAG A: TCATAGTGTGCCCATTAACAG	150 pb
MY 09-II	S: TCCATGGTCGTTTCGAACTGCTTAT A: TCGGATTGCGCATTGACGTACGTTATT	500 pb

Para la amplificación se utilizó un Termociclador Bio-Rad y las condiciones utilizadas fueron: un ciclo de 94°C por 1 min, 28 ciclos de 94°C por 1 min, 47°C por 1 min para los genes de VPH-16 y 47 °C para los oligonucleótidos universales, 72°C por 2 min, y un ciclo de 72° por 1 min de extensión final.

4. Extracción de RNA.

El protocolo para la extracción de RNA es el propuesto en el manual RNeasy; (Quiagen). Para la extracción de RNA total se eligió este método ya que posee la ventaja de enriquecer los RNA mensajeros por que tiene la propiedad de aislar mayor cantidad de RNA de menor tamaño.

5. Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA de cadena sencilla se realizó de acuerdo con el manual SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech) y se utilizó la enzima *SUPER SCRIPTII* (Life Technologies), para posteriormente emplearlo en la técnica de Hibridación Sustractiva (Figura 6).

La enzima *SUPER SCRIPTII* , tiene la capacidad de aumentar la probabilidad de que los mensajes sean retro-transcritos completamente, debido a que posee actividad de transferasa terminal, la cual añade nucleótidos de de-oxicitidina al extremo 3' del cDNA, lo que permite que el oligonucleótido SMART II A se acople creando un templado extendido asegurando la retro-transcripción del mensaje completo (Clontech, 2005). La enzima está genéticamente diseñada mediante la introducción de mutaciones puntuales, en lugar de la delección del centro activo de

la *RNAasaH*, por lo que reduce de 10^6 a 10^7 veces actividad *RNAasaH* y las mutaciones selectivas producidas en el centro activo mantienen completa la actividad polimerasa, lo que permite mejorar la calidad y rendimiento de la síntesis de cDNA de cadena sencilla.

El cDNA de cadena sencilla tiene en sus extremos secuencias que sirven como sitios de reconocimiento para que el oligonucleótido PCR IIA (ver secuencia en anexo III), se una y se inicie con la amplificación por PCR generando la cadena complementaria del cDNA (Figura 6). Es necesario determinar el número de ciclos óptimo de PCR necesarios para obtener un cDNA de doble cadena que represente mejor los RNAm presentes en cada condición.

La optimización del número de ciclos óptimo para la amplificación de la segunda cadena es importante debido a que esto asegura que los cDNA se encuentran en su fase exponencial de amplificación.

No se recomienda un sobreciclado o un subciclado de los cDNA que serán sometidos a sustracción debido a que cuando hay un sobreciclado, se alcanza la región *Plateau* de la amplificación, y la producción de cDNA ya no se incrementa, lo que ocasiona un barrido en la región de alto tamaño molecular y un subciclado resulta una concentración pobre de cDNA. Por lo descrito anteriormente fue necesario realizar una serie de diferente número de ciclos de PCR: 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 como se describe en el manual SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech).

Para cada muestra problema y control, se combinaron los dos productos de reacción de PCR (cDNA) en sus ciclos óptimos para cada caso y se realizó su purificación de acuerdo al protocolo propuesto por el manual SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech). Para ello $5\mu\text{L}$ de las fracciones purificadas de cDNA y $2.5\mu\text{L}$ del producto de PCR no purificado, se analizaron en gel de agarosa al 1.2%/EtBr, y se estimó el porcentaje de producto de PCR que permaneció después de la purificación.

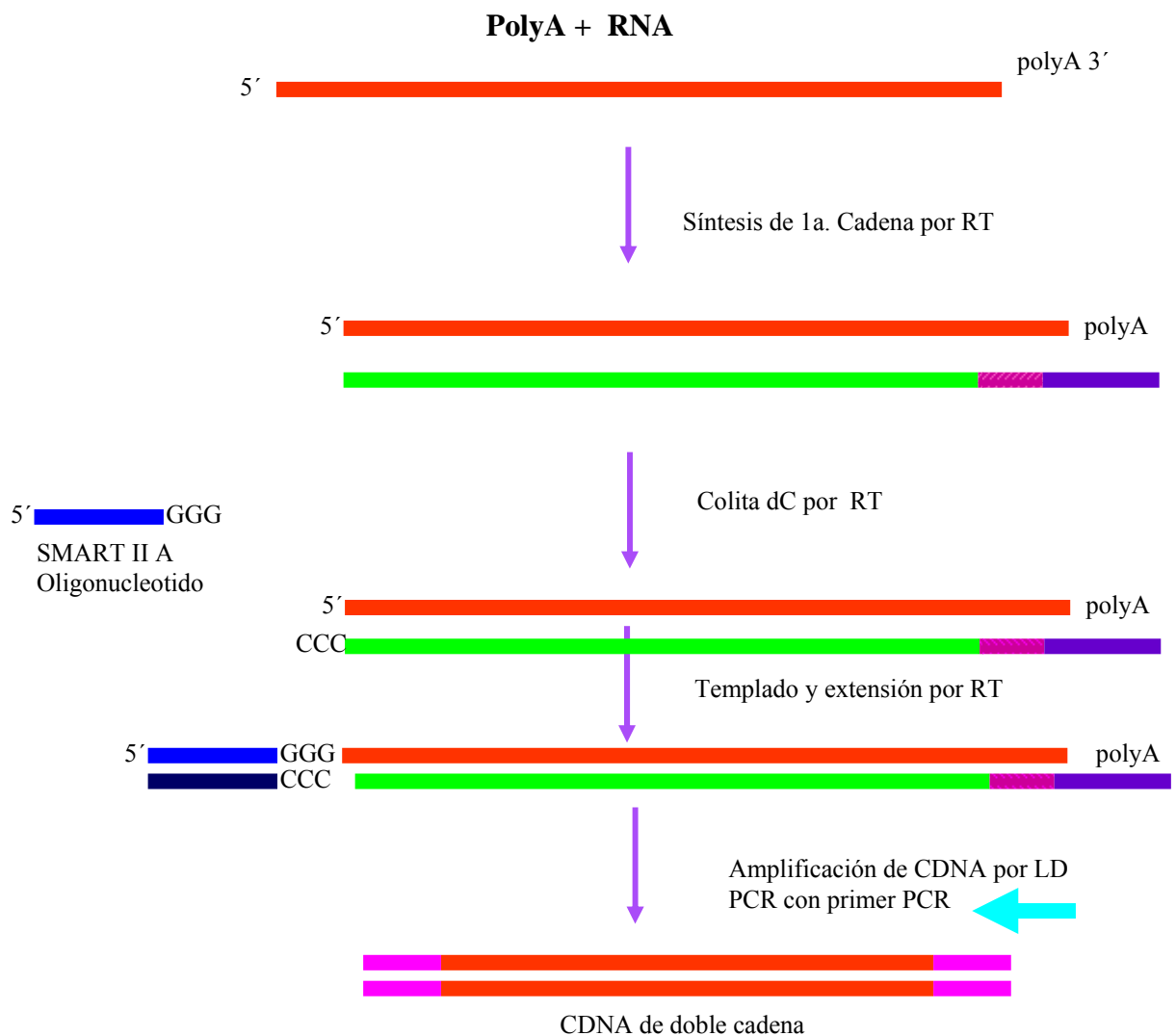


Figura 6. Síntesis cDNA (SMART)

6. Hibridación Sustractiva bajo Condiciones de Supresión (SSH).

Después de purificar el cDNA de doble cadena se realizó la técnica de Hibridación Sustractiva como se describe en el manual Clontech PCR-Select cDNA Subtraction (2005) y su procedimiento se detalla en la Figura 7.

El cDNA de doble cadena de ambas condiciones (tejido lesión y la de tejido sano) se digirieron con la enzima *RsaI* que reconoce cuatro pares de bases, de manera que cada cDNA quedó dividido en múltiples fragmentos (~256pb y sus múltiplos).

Esta parte de la técnica generó fragmentos de cDNA de doble cadena con extremos romos, para permitir la ligación de los adaptadores y la substracción.

. Esta digestión tiene dos ventajas: primero los cDNA cortados en pequeños fragmentos proveen una mejor representación de genes individuales. Segundo, los fragmentos largos de cDNA forman complejos, lo cual no permite la formación de híbridos requeridos para una eficiente hibridación sustractiva.

Al cDNA de doble cadena de la condición problema digerida se ligaron los diferentes tipos de adaptadores (ver anexo 3) para proseguir con la serie de hibridaciones (Subtraction Forward, Subtraction Reverse).

Para la primera hibridación se adicionó un exceso de cDNA control a cada alícuota de cDNA problema ligado con los diferentes adaptadores respectivamente y las muestras se desnaturalizaron para permitir su alineamiento y se siguió el protocolo siguiente:

Para cada muestra cDNA problema ligado con adaptador 1 y cDNA problema ligado con adaptador 2, se combinaron los reactivos de la Tabla 3 en tubos de 0.5 ml en el orden indicado.

Tabla 3. Proporciones de reactivos para la primera hibridación.
(Clontech PCR-Select cDNA Subtraction kit User Manual, 2005).

Componente	Hibridación Muestra 1 (µL)	Hibridación Muestra 2 (µL)
cDNA Control digerido con <i>Rsa</i> I	1.5	1.5
Problema 1-1 ligado con Adaptador 1 (mezcla 1-1)	1.5	-
Problema 1-2 ligado con Adaptador 2R (mezcla 1-2)	-	1.5
Regulador de hibridación 4X	1	1
Volumen Final	4	4

2. Las muestras se centrifugaron brevemente.

3. Se colocaron en un Termociclador a 98 °C por 1.5 min.

4. Se incubaron a 68 °C por 8 h, y posteriormente se llevó a cabo la segunda hibridación. Las muestras se hibridaron por 12 h, la hibridación no debe exceder 12 h.

Para la segunda hibridación los productos de la primera hibridación se mezclaron, y se adicionó cDNA digerido de la condición control y recién desnaturalizado, las muestras de la primera hibridación no volvieron a desnaturalizarse, además fue necesario mantener las muestras dentro del termociclador y se siguió el protocolo siguiente:

1. Se añadieron los reactivos de la Tabla 4 en un tubo estéril:

Tabla 4: Reactivos para segunda hibridación. (Clontech PCR-Select cDNA Subtraction kit User Manual, 2005).

Reactivo	Volumen
cDNA digerido condición control	1 μ L
Regulador de hibridación 4X	1 μ L
Agua estéril	2 μ L

2. Se colocó 1 μ L de esta mezcla en un tubo de 0.5 mL.

3. Se incubó en un termociclador a 98°C por 1.5 min.

4. El cDNA de la condición control desnaturalizado se mezcló el cDNA de la condición control con las muestras de hibridación 1 y 2, es importante garantizar que las dos muestras de hibridación se mezclaran solamente en presencia del control desnaturalizado.

5. La reacción se incubó a 68 °C toda la noche.

6. Se añadieron 200 μ L de buffer de dilución al y se mezcló por pipeteo.

7. La reacción se calentó en un termociclador a 68 °C durante 7 min.

8. Las muestras se almacenaron a – 20° C.

Después de realizar las hibridaciones se realizó una primera reacción de PCR para seleccionar aquella población de moléculas que contenía en sus extremos los dos diferentes adaptadores. Se siguió el protocolo siguiente.

1. Preparar los templados para el PCR:

a) Se colocó 1 μ L de cada cDNA diluido (muestra sustraída paso 8 del protocolo segunda hibridación y la muestra diluida no hibridada).

- b) Se colocó 1 μL del PCR control subtracted cDNA (proporcionado en el paquete).
2. Se preparó la mezcla de reacción para todas las muestra más un tubo adicional, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para primer PCR (Clontech PCR-Select cDNA Subtraction kit User Manual, 2005).

Componente	Cantidad por reacción (μL)	Cantidad por 7 reacciones (μL)
Agua estéril	19.5	156.0
Regulador de PCR 10X	2.5	20
Mezcla dNTP (10mM)	0.5	4
Iniciador 1 para PCR	1.0	8
Mezcla CDNA Polimerasa Advantage 50X	0.5	4
Volumen total	24	192

3. Se mezcló en vortex, y se centrifugó brevemente.
4. Se tomaron 24 μL de la mezcla de reacción y se colocaron en cada tubo preparado en el paso 1.
5. La mezcla se incubó en un termociclador a 75 °C durante 5 min para extender los adaptadores, las muestras no se sacaron del termociclador, este paso rellenó la cadena faltante de los adaptadores y creó sitios para los iniciadores de PCR.
6. Inmediatamente se comenzó con los ciclos de PCR empleando el termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PE 2400 y las condiciones fueron las siguientes. Un ciclo de 94 °C 25 sec, 27 ciclos 94 °C por 10 sec, 66 °C por 30 sec, y 72 °C por 1.5 min
7. Se analizaron 8 μL del producto del primer PCR de cada tubo en gel de agarosa al 2.0 %/EtBr.
8. Se diluyeron 3 μL de cada tubo del primer PCR en 27 μL de agua.
9. Se tomó 1 μL de la dilución anterior y se etiquetó cada tubo apropiadamente.

Después del primer PCR se seleccionó aquella población que contiene en sus extremos adaptadores diferentes, y además por la supresión, las poblaciones de moléculas distintas (no contienen los dos adaptadores) no fueron amplificadas, para enriquecer la fracción de moléculas seleccionadas y disminuir todo el fondo

fue necesario realizar una segunda reacción por PCR empleando oligonucleótidos anidados:

1. Se preparó la mezcla de reacción para del segundo PCR para todos las muestras más un tubo adicional, combinando los reactivos como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de la mezcla de reacción para el segundo PCR (Clontech PCR- Select cDNA Subtraction kit User Manual, 2005).

Componente	Cantidad por reacción (μL)	Experimento para 7 reacciones (μL)
Agua estéril	18.5	148
Regulador de PCR 10X	2.5	20
Nested PCR primer 1 (10 μM)	1	8
Nested PCR primer 2R (10 μM)	1	8
Mezcla dNTP (10mM)	0.5	4
cDNA Polimerasa Advantage 50X	0.5	4
Volumen total	24	192

2. Se mezcló en vortex y se centrifugó brevemente.
3. Se adicionaron 24 μL de la mezcla de reacción a los tubos del paso 9 apartado anterior.
4. Inmediatamente se comenzó con los ciclos de PCR empleando el termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR Systems PE 2400, y las condiciones fueron las siguientes: de 10 a 12 ciclos 94°C por 10 seg, 68°C por 30 seg y 72°C por 1:30 min.
6. Se analizaron 8 μL de cada tubo de reacción en un gel de agarosa al 2 %/EtBr en regulador de corrida TAE 1X.
7. Los productos de reacción fueron almacenados a -20 °C.

Es importante señalar que se hicieron 2 tipos de Hibridaciones Sustractivas, la diferencia se debe a que población de cDNA se ligaron los 2 tipos de adaptadores y esta población con adaptadores es considerada como población problema.

Una hibridación sustractiva comprende aquellos fragmentos de genes diferenciales que se inducen y los adaptadores fueron ligados a la población de cDNA provenientes del tejido con lesión (población problema), a diferencia de la

otra hibridación sustractiva donde los adaptadores se ligaron a la población de cDNA provenientes del tejido sano (ahora se le denomina a esta población problema), aquí se encuentra los fragmentos de genes que se reprimen. En este trabajo se presentan los resultados de ambas Hibridaciones sustractivas.

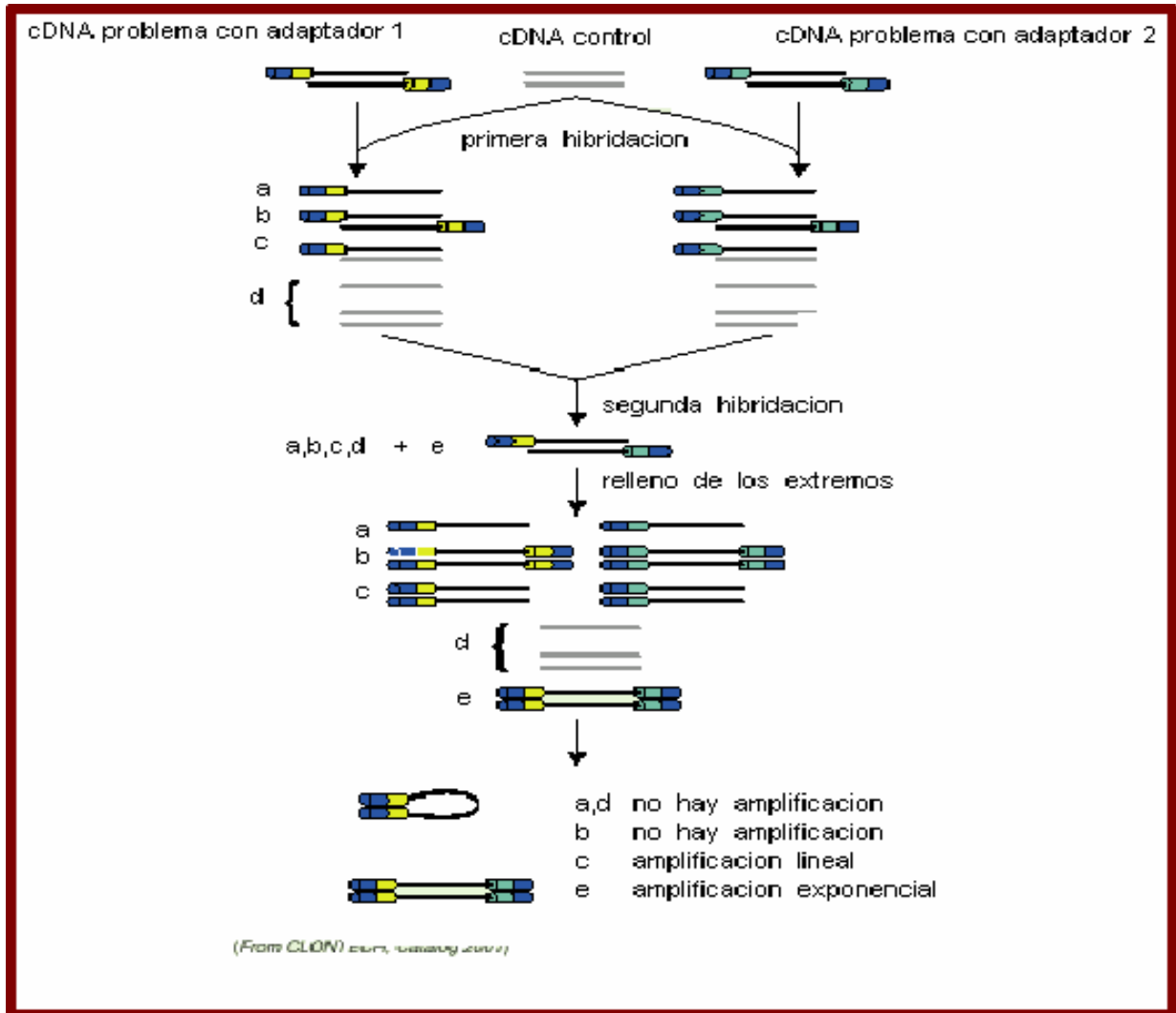


Figura 7. Hibridación sustractiva.

Los productos del segundo PCR de la SSH se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos de aprox. 500-750 pb y de 750-1500 pb fueron cortados del gel y purificados siguiendo el protocolo propuesto en el manual QIAEX II, Qiagen, 2005.

7. Construcción de la biblioteca sustractiva.

Los productos purificados del segundo PCR y el producto total del PCR completo se utilizaron para la construcción del banco sustractivo. Fue necesario clonarlos en el vector PCR-Topo 4 (Invitrogen), y transformar células de *Escherichia coli* TOP 10 F' con el producto de la ligación.

Después de la transformación se realizó el análisis para comprobar la presencia del inserto de interés e integrarlas a la biblioteca sustractiva, el análisis inicia con la extracción de DNA plasmídico: de acuerdo con el manual Qiaprep Miniprep, QIAGEN, 2005. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % / EtBr, para verificar la calidad de la extracción.

Después de extraer el DNA plasmídico de las colonias, se realizó una digestión con la enzima *Eco* RI para comprobar cuales clonas tienen el plásmido + inserto, combinando los reactivos de la Tabla 7.

Tabla 7. Reactivos para restricción con *Eco*RI

Reactivo	Volumen
Agua (dd)	8.0 μ L
DNAp	5.0 μ L
Regulador 10x	1.5 μ L
Enzima <i>Eco</i> RI	0.5 μ L

La digestión enzimática se incubó a 37 °C durante 2 hrs., después se analizó en gel de agarosa al 1.2%

7.1 Almacenamiento y recuperación de células en glicerol.

Las clonas que contenían el inserto de interés se integraron a la biblioteca sustractiva y se almacenaron con glicerol al -80°C (ver anexo II).

8. Macroarreglos

La comprobación de la biblioteca sustractiva se realizó por medio de macroarreglos para identificar las clonas que contengan los fragmentos de genes diferenciales, Para ello se emplearon los paquetes ECF random prime labeling

5751 y ECF signal amplification module 5750, para la detección de ácidos nucleicos (Amersham Pharmacia Biotech, 2005).

8.1 Marcaje y detección de la sonda.

El marcaje de la sonda se hizo como se propone en el protocolo ECF random prime labeling 5751 (Amersham Pharmacia Biotech, 2005). Se realizó a partir de 25 ng-2 µg de cDNA control y problema por separado (sondas).

8.1.2 Comprobación del marcaje de la sonda.

Se preparó una dilución 1/5 de mezcla de nucleótidos 5x en regulador TE. Se colocó 5 µL de sonda marcada cDNA de la condición control y 5 µL de la dilución de la mezcla de oligonucleótidos por separado en una membrana de nylon. Se permitió que las muestras se absorbieran pero que no se secaran y en seguida se lavó con agitación suave en regulador SSC 2x a 60 °C por 15 min.

La membrana se colocó en papel filtro ligeramente humedecido con TE y se observó en UV, la intensidad de la señal de sonda marcada debe ser similar a la dilución 1/5 de la mezcla de nucleótidos.

8.2 Preparación de las muestras para la generación de macroarreglos.

Se diluyeron 10 µL de DNA plasmídico de algunas de las muestras que conforman las genotecas en 20µl de regulador TE y se desnaturalizaron por 5 minutos y en seguida se colocaron en hielo. Se colocaron 2.5 µg de las muestras de cDNA desnaturalizado en el DOT-SLOT. El cDNA se fijó a la membrana con dos pulsos del tiempo óptimo del cross-linker,

8.3 Hibridación

Después de generar el arreglo de las clonas y marcar la sonda de cDNA de la condición control, se realizó la hibridación como se describe a continuación: Se preparó el regulador de hibridación (ver anexo III), y se ajustó a un volumen de 50 mL para 2 membranas. El regulador de hibridación se pre-calentó a 67 °C y después se colocó el arreglo a pre-hibridar por 30 minutos a 67 °C con agitación

suave y constante. Se desnaturalizaron 10 μ L de sonda marcada y se adicionó al regulador de hibridación. Se hibridó toda la noche a 67 °C con agitación constante. Posteriormente se realizaron 3 lavados con solución astringencia (ver anexo III), ambos a 65°C y con agitación suave por 15 min.

La membrana se lavó con buffer A pH. 9.5, a temperatura ambiente y se preparó una dilución de líquido de bloqueo 1:10 en buffer A, y se incubó la membrana por 1 hr. a 37°C y 50 rpm. Protegiéndola de la luz. La Incubación con el anticuerpo (anti-fluoriceína) se preparó como se indica en el anexo III y se incubó a 37°C por 1.5 hr. Se realizaron 3 lavados con Tween al 3% en buffer A de 10 min cada uno a 37° con agitación de 50 rpm, y se realizó un lavado final con buffer A por 30 min a 37°C y 50 rpm.

Se eliminó por completo el buffer A de la membrana y se le agregó el sustrato (CDP-STAR antifluorisceína) sobre la membrana, seguido a esto el plástico se protegió de la luz. Se reveló por quimioluminiscencia, en el fotodocumentador en la opción chemidoc.

9. Análisis tipo Northern blot.

Para confirmar que los genes encontrados mediante SSH se encuentran inducidos o reprimidos tal como se observó los macroarreglos, se realizó un análisis de Northern blot de los genes que participan en el desarrollo de cáncer y que al mismo tiempo estuvieran implicados de alguna forma en la vía de señalización Notch.

Se colocaron 2 μ L de RNA extraído de las biopsias con las que se realizaron las genotecas sustractivas, y al mismo tiempo se checó el RNA de biopsias extraídas de pacientes en diferentes estadios de CaCU. Este análisis se hizo en agarosa desnaturalizante al 1.5% con EtBr.

Se desnaturalizó el RNA con 75 μ L de la mezcla desnaturalizante (ver anexo III) a 68°C por 15 min, y se dejó reposar en hielo 5 min. posteriormente se colocó en la membrana y se fijó con dos pulsos de optimal crosslinker..

La membrana se prehibrido a 60°C por 1hr con agitación suave. (ver buffer de hibridación en anexo III).

Se tomaron 5 µL de la sonda marcada y se ajustó a un volumen de 10 µL con TE estéril. Se desnaturalizó por 5 min. la sonda desnaturalizada se adicionó al buffer de prehibridación. Se dejó hibridando por 12 horas a 60 °C con agitación suave.

Se realizaron 2 lavados de astringencia (ver anexo III), ambos a 60°C y con agitación suave, a partir de aquí todos los lavados se realizaron a temperatura ambiente. La membrana se lavó con buffer A pH. 9.5 y se preparó una dilución de líquido de bloqueo 1:10 en buffer A, y se incubó la membrana por 1 hr. a 37°C y 50 rpm. Protegiéndola de la luz, posteriormente se incubo el anticuerpo (anti-fluoriceína) ver anexo III, se incubó a 37°C por 1.5 hr. Se realizaron 3 lavados con Tween al 3% en buffer A de 10 min cada uno a 37° con agitación de 50 rpm. y se realizó un lavado final con buffer A por 30 min a 37°C y 50 rpm.

Para la generación y detección de señal se eliminó por completo el buffer A de la membrana y se le agregó el sustrato (CDP-STAR antifluorisceína) sobre la membrana, y se protegió de la luz. Se reveló por quimioluminiscencia, en el fotodocumentador en la opción chemidoc.

10. RT-PCR

Para la amplificación de los fragmentos de los genes Nocth se utilizaron los siguientes oligonucleótidos.

Tabla 8. Oligonucleótidos para amplificar genes Notch.

Gene	Secuencia de oligonucleotidos 5' -----> 3'.	Tamaño molecular
Not ch-1	S: GGTCAATGCGAGTGGC A: GGCAGCAAGGCTACTGTG	153 pb
Notch .2	S: ACTATGAAAGAGGCTGAC A: TCATTCCCTTCTATGGCTG	153 pb
Notch . 3	S: ATTCTGCCATAAGGCTGGG A: GGGCAGATGTATGCATTCCCT	247 pb
Notch . 4	S: GGGTCTGACCACTGAGACAC A: CAGTGAGAGCTCTGAGGGTC	115 pb
β -act ina	S: GGGTCAGAAGGATTCTATG A: GGTCTCAAACATGATCTGGG	238 pb

Para realizar la PCR se utilizó 1 µg de cDNA como molde, en presencia de los oligonucleótidos específicos para amplificar los genes de los receptores Notch. Se realizó la mezcla de reacción para un volumen final de 25 µl (ver anexo II).

Las condiciones de amplificación se empleó el termociclador Bio-Rad y las condiciones fueron las siguientes. Un ciclo de 94°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, la temperatura de alineamiento fue de 56°C para Notch-1, 54°C para Notch-2, 57°C para Notch-3 y 60°C para Notch-4 para los cuatro genes el tiempo de alineamiento fue de 1 min, y una extensión de 72°C por 1.30 min, y un ciclofinal de 72°C por 10 min.

Para el caso de β -actina, se corrió con el programa de Notch-2, no mostró diferencia en la amplificación en las otras condiciones, solo apareció una banda del tamaño esperado en todos los caso

La expresión de los genes que se encontraron, se evaluó por análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software Stargrafics 5.0, este análisis de hizo para los macroarreglos y Northern.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se procesaron 16 biopsias de CaCU, dos NIC I, cuatro NIC II, seis NIC III y cuatro cáncer Invasor con sus respectivos controles de tejido sano.

Se realizaron genotecas NIC III y de cáncer invasor, con los productos de estas genotecas mediante macroarreglos se evaluó el nivel de expresión en los diferentes estadios de progresión en cáncer cervicouterino.

1. Diagnostico y tipificación de VPH.

El diagnostico y tipificación de VPH se realizó mediante PCR, en todas las muestras analizadas. En la figura 8 se presenta una amplificación típica de las oncoproteínas virales de VPH-16. La amplificación de E2 de aproximadamente 900 pb, de E6 de 450 pb, y E7 de 180 pb, en el último carril se muestra la amplificación de cualquier tipo de VPH con oligonucleótidos universales MY 09-II en que el fragmento amplificado es de 500 pb aproximadamente.

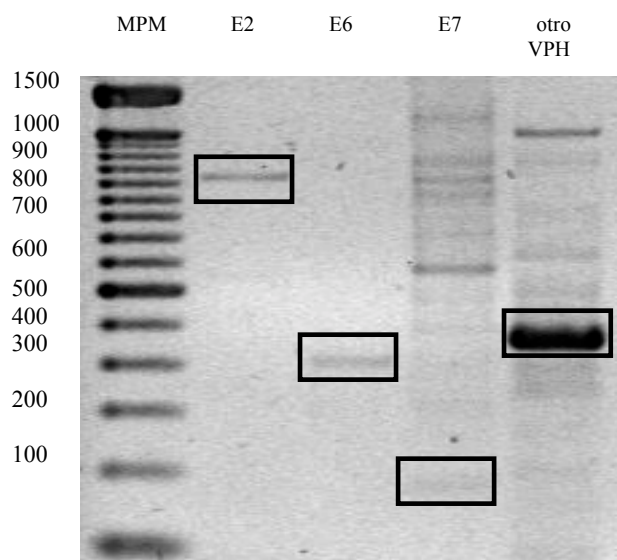


Figura 8. Tipificación de VPH en CaCU.

Carril: 1) MPM 100 pb, Carril 2) E2 VPH, Carril 3) E6 VPH, Carril 4) E7 VPH
Carril 5) MY 09 -II.

En la Tabla 9, se presenta el análisis de presencia de VPH en biopsias de tejido sano y tejido lesión en los diferentes estadios de progresión de CaCU, se muestra que oncogen del VPH fue amplificado, en dos casos (Muestra 9 y 13) la oncoproteína E7 no fue detectada por PCR

Tabla 9. Presencia de VPH en las muestras analizadas.

Muestra No.	Tejido	Grado de Lesión	E2 VPH-16	E6 VPH-16	E7 VPH-16	MY 09-11 universal
01	Normal		-	-	-	-
01	Lesión	NIC I	-	-	-	-
02	Normal		-	-	-	-
02	Lesión	NIC I	+	+	+	+
03	Normal		-	-	-	-
03	Lesión	NIC II	-	-	-	+
04	Normal		-	-	-	-
04	Lesión	NIC II	+	+	+	+
05	Normal		-	-	-	-
05	Lesión	NIC II	+	+	+	+
06	Normal		-	-	-	-
06	Lesión	NIC II	-	-	-	+
07	Normal		-	-	-	-
07	Lesión	NIC III	+	+	+	+
08	Normal		-	-	-	-
08	Lesión	NIC III	-	-	-	+
09	Normal		-	-	-	+
09	Lesión	NIC III	+	+	-	+
10	Normal		-	-	-	-
10	Lesión	NIC III	+	+	+	+
11	Normal		-	-	-	-
11	Lesión	NIC III	+	+	+	+
12	Normal		-	-	-	-
12	Lesión	NIC III	-	-	-	+
13	Normal		-	-	-	-
13	Lesión	Invasor	+	+	-	+
14	Normal		-	-	-	+
14	Lesion	Invasor	-	-	-	+
15	Normal		+	+	+	+
15	Lesion	Invasor	+	+	+	+
16	Normal		-	-	-	-
16	Lesión	Invasor	+	+	+	+

Se detectó la presencia de VPH en el 88% de las biopsias de tejido lesión analizadas, y el 44% correspondía a VPH-16. En NIC I no se detectó la presencia de VPH-16, en NIC II se detectó en el 6.16% de las biopsias, para NIC III y CaCU se detectó en el 18.92% de las muestras analizadas.

En las muestras control (tejido aparentemente sano) se detectó presencia de VPH en el 12% de las muestras, en las cuales el 4% de estas muestras positivas corresponde a VPH-16. Las muestras que presentan VPH corresponden a

pacientes en estadios de progresión de NIC III y CaCU invasor, no se detectó en pacientes con NIC I y NIC II.

En la Tabla 10 se presenta el análisis numérico de la presencia VPH y tipificación de VPH-16 en las muestras analizadas en los diferentes estadios de progresión.

Tabla 10. Resumen de presencia de VPH en diferentes estadios de Progresión de CaCU.

Estadio de progresión	Número de muestras Lesión/sano	Lesión con VPH-16	Lesión con otro VPH	Sano con VPH-16	Sano con otro VPH
NIC I	2	1/2	0/2	0/2	0/2
NIC II	4	2/4	2/4	0/4	0/4
NIC III	6	4/6	2/6	0/6	1/6
Ca. Invasivo	4	3/4	1/4	1/4	1/4

Estos resultados confirman que el VPH-16 es uno de los virus más oncogénicos al encontrarse casi en la mitad de los casos estudiados.

Piña *et al.* (2006) encontraron que en México VPH-16 es el de mayor incidencia seguido por los tipos VPH-58 y 18.

2. Analisis de la integridad de RNA.

De todas las biopsias de estudio, se extrajo RNA de buena calidad, enriquecido en RNA mensajero.

En la Figura 9 se presenta un gel ejemplificando la calidad de la extracción que se obtuvo. Se observa un ligero barrido, por el enriquecimiento del RNAm, esto debido a que éste posee un mayor tamaño molecular, se observan además bandas definidas correspondientes a los ribosomales 28S y 18S. No existen indicios de degradación de RNA, esto es importante porque un RNA de baja concentración ó que se encuentre degradado no puede ser empleado para sintetizar cDNA, por lo que repercutiría en una baja ya que la representación de los RNAm.

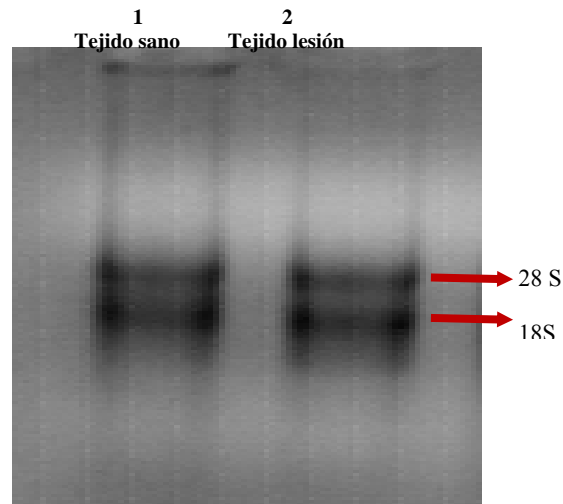


Figura. 9: RNA de las biopsias. Carril 1: tejido aparente sano, Carril 2:tejido lesión.

La cuantificación por OD indicó una concentración 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA en todos los casos.

3. Análisis y detección de cDNA de doble cadena.

La optimización del número de ciclos óptimo para la amplificación de la segunda cadena fue importante debido a que esto aseguró que la síntesis de cDNA se encontraba en su fase exponencial de amplificación

En la determinación de los ciclos óptimos de PCR, en el caso de la condición de tejido lesión se observó que en los ciclos 15, 18, no se observa amplificación, 21 y 24 presentan un subciclado, con fragmentos de menor tamaño molecular al deseado, esto no es recomendable debido a su bajo rendimiento del producto de PCR, en los ciclos 30 y 33 se observó sobreciclados, con fragmentos de menor tamaño molecular, lo que representa una concentración pobre de cDNA, favoreciendo principalmente la amplificación de fragmentos de mayor tamaño. El ciclo 27 presentó un óptimo de representación de los cDNAs provenientes de RNA mensajero, el barrido fue homogéneo comparado con los demás ciclos, en el caso

de la condición con tejido sano la amplificación óptima fue a los 24 ciclos (Figura 10).

Se comparó el cDNA de la condición problema y condición control, y se utilizó como control interno cDNA de placenta de humano que es de mucha utilidad para seleccionar el ciclo óptimo de amplificación. Condiciones de subciclado o sobreciclado harían poco representativo y confiable el análisis posterior de SSH.

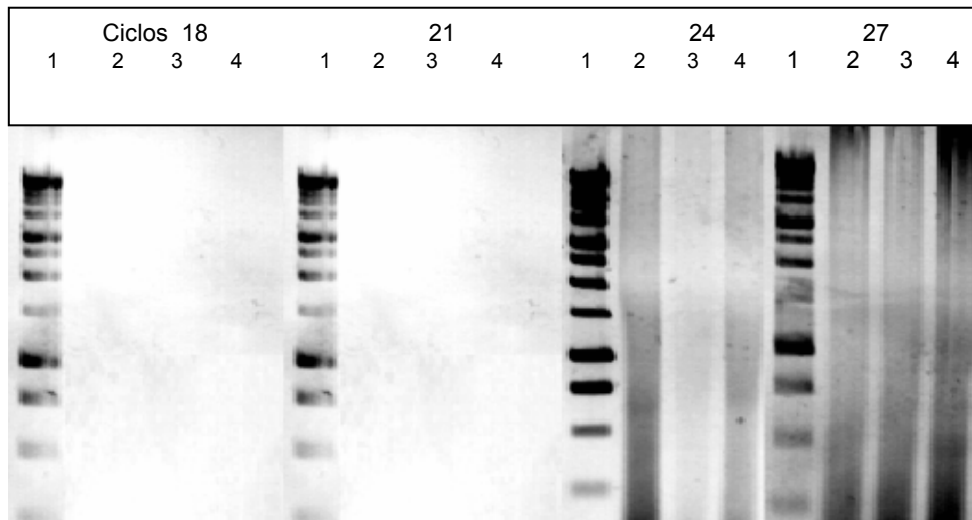


Figura. 10 Número de ciclos óptimos para síntesis de cDNA doble cadena. Carril 1: MPM, Carril 2: Tejado lesión, Carril 3: tejido sano, Carril 4: control del kit

Para determinar el rendimiento y la pureza del cDNA doble cadena, se analizaron 2.5 μ L del producto de PCR no purificado (Muestra A), junto a 5 μ L de las fracciones B, C, D y E de cDNA purificado. Se compararon las intensidades de las muestras A y B, y el porcentaje de producto de PCR que permaneció después de la columna cromatográfica fue del 70% en ambas condiciones del tester y driver (Figura 11 A y B). En ambos casos para los pasos posteriores se utilizó la fracción C.

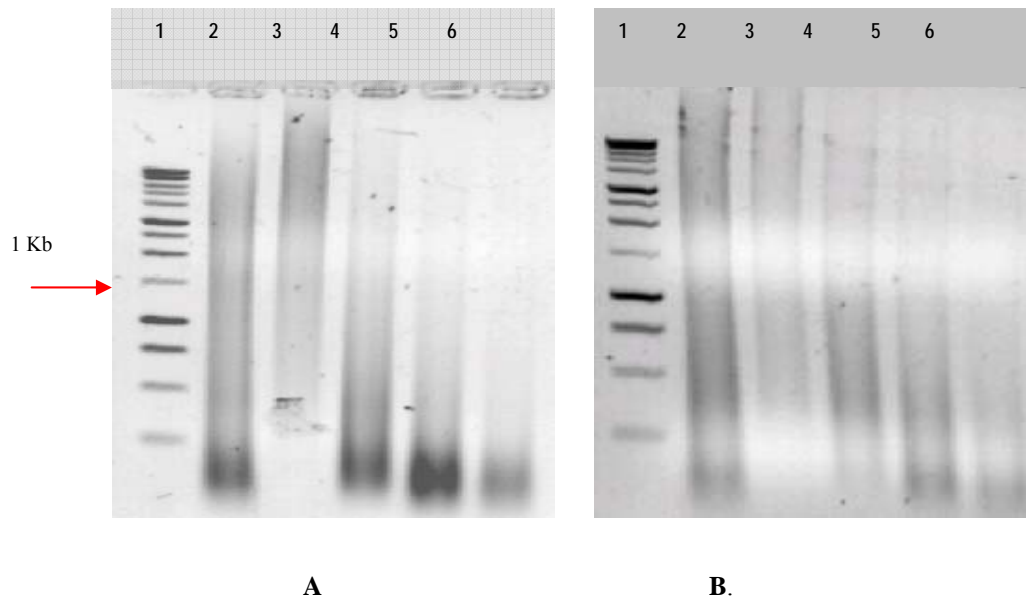


Figura 11. Purificación del cDNA.

A) Purificación del cDNA problema, carril 1: MPM, carril 2: Muestra A no purificado, carril 3: Muestra B (primer fracción purificada), carril 4: muestra C, (segunda fracción purificada). Carril 5: Muestra D (tercer fracción) carril 6: Muestra E (cuarta fracción).

B) Purificación del cDNA control, carril 1: MPM, carril 2: Muestra A no purificado, carril 3: Muestra B (primer fracción purificada), carril 4: muestra C, (segunda fracción purificada). Carril 5: Muestra D (tercer fracción) carril 6: Muestra E (cuarta fracción).

4. Hibridación Sustractiva bajo Condiciones de Supresión.

Mediante una variación a ésta técnica fue posible detectar los genes que se inducen y los genes que se reprimen en diferentes estadios de la enfermedad. Esta variación consistió en la inversión de las muestras control y problema: 1) para detectar los fragmentos de genes que se inducen, la condición problema fue la que provenía del tejido lesión, la condición control, fue la que provenía del tejido sano, y 2) para detectar los fragmentos de genes que se reprimen, la condición problema es la proveniente del tejido sano y la condición control fue el tejido lesión. Es importante señalar que todos los pasos se hicieron por separado para generar cada una de las diferentes genotecas sustractivas.

En el análisis de digestión del cDNA de Doble Cadena con la enzima *RsaI*, se analizaron 5 μ L del cDNA de doble cadena (control y problema) no digerido y 5 μ L de ambos cDNA digeridos con *RsaI* en un gel de agarosa al 1.2 %/EtBr. Se

observó que los cDNA derivado de RNA-poli A aparece de 0.5 a 10 kb, que después de la digestión con *Rsal*, el tamaño del cDNA es más pequeño (0.1-2 kb respecto a 0.5-10 kb). Un aspecto que se consideró fue que en el patrón de restricción no estuviera enriquecido en fragmentos de bajo tamaño molecular, esto daría como resultado fragmentos aislados muy pequeños, que podrían darnos menos información respecto a fragmentos de mayor tamaño molecular. En la Figura 12 se observa que la digestión en ambos casos generó fragmentos desde 250 pb hasta de 1500 pb.

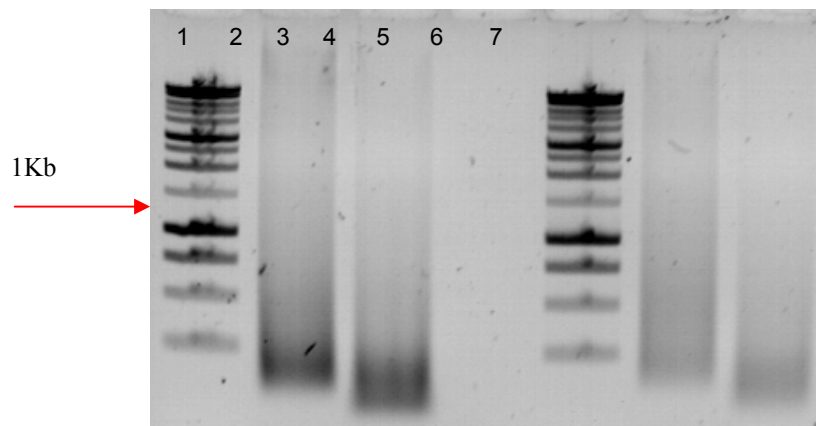


Figura. 12 Digestion con *Rsal*
Carril 1: MPM, Carril 2: cDNA problema, Carril 3: cDNA problema digerido,
Carril 4: nada, Carril 5: MPM, Carril 6: cDNA control,
Carril 7: cDNA control digerido

Se realizaron dos secciones de PCR. En la primer PCR se empleó el iniciador PCR 1 para seleccionar la población generada en la segunda hibridación que tiene en sus extremos las secuencias de los adaptadores. En esta PCR es donde se realizó la supresión de genes constitutivos, únicamente los fragmentos que tenían ambos adaptadores fueron amplificadas.

Se observó la amplificación de los fragmentos diferenciales. La amplificación en el rango de 250-1000 pb, el resultado de la SSH es muy similar al que se observa en el carril 2 de la Figura 13 que es el control interno del kit. (Figura 13 A y B),

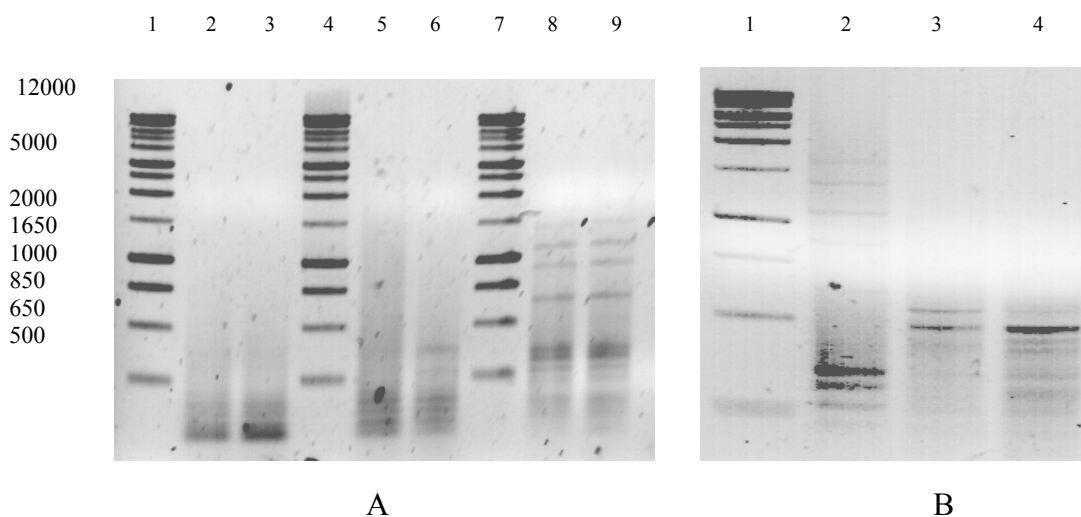


Figura 13. Primera amplificación por PCR de SSH.

A) Primera amplificación por PCR de SSH.

Carril 1: MPM, carril 2 y 3: SSH cDNA control, carril 4 y 5: cDNA condición problema, carril 6 y 7: control no sustraído del Kit.

B) Primera amplificación por PCR de SSH.

Carril 1: MPM, carril 2: SSH cDNA control, carril 3: cDNA condición problema, carril 4: control no sustraído del Kit.

En la segunda amplificación por PCR se emplearon los iniciadores anidados para enriquecer los fragmentos diferenciales, en este paso se amplificaron todos los fragmentos que tienen los diferentes adaptadores en sus extremos, garantizando que todos los fragmentos están únicamente en una condición.

Del producto de esta PCR se analizaron 8 μ L de cada reacción en un gel de agarosa al 2 %EtBr en buffer de corrida TAE 1X.

En la Figura 14 se observa un enriquecimiento de los fragmentos de 250-1500 pb. Se obtuvo un excelente rendimiento en la SSH.

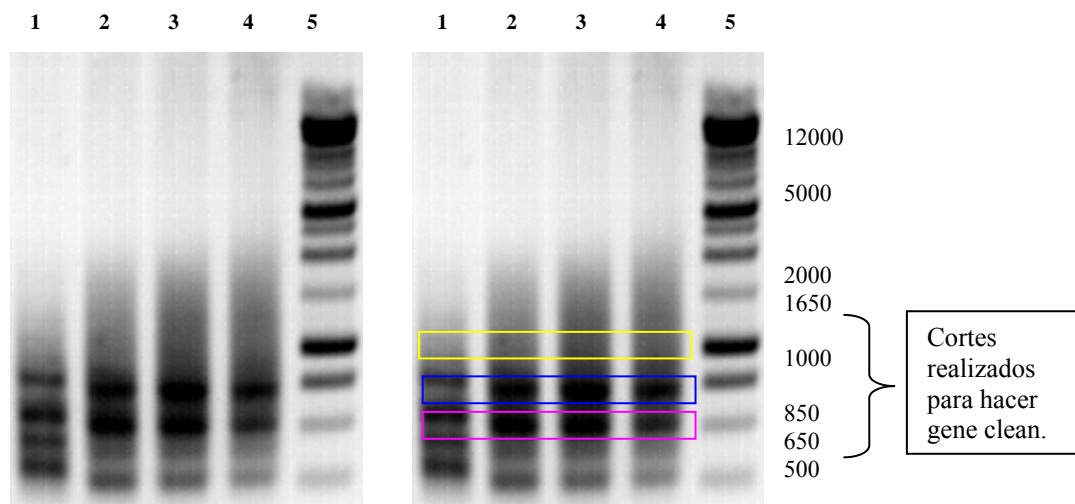


Figura 14. Segunda amplificación por PCR de SSH.
 Carril 1 y 2: cDNA control, Carril 3 y 4: cDNA problema,
 Carril 5: MPM

5. Bibliotecas sustractivas.

El análisis se inicio con la extracción de DNA plasmídico y su posterior restricción con la enzima de restricción *EcoRI*, esta enzima liberó los fragmentos que fueron clonados.

En la Figura 15 se presenta un gel ejemplificando los fragmentos liberados por la digestión con *EcoRI*, se obtuvo una eficiencia de transformación del 95%. Estas clonas con inserto comprobado integran las genotecas sustractivas generadas.

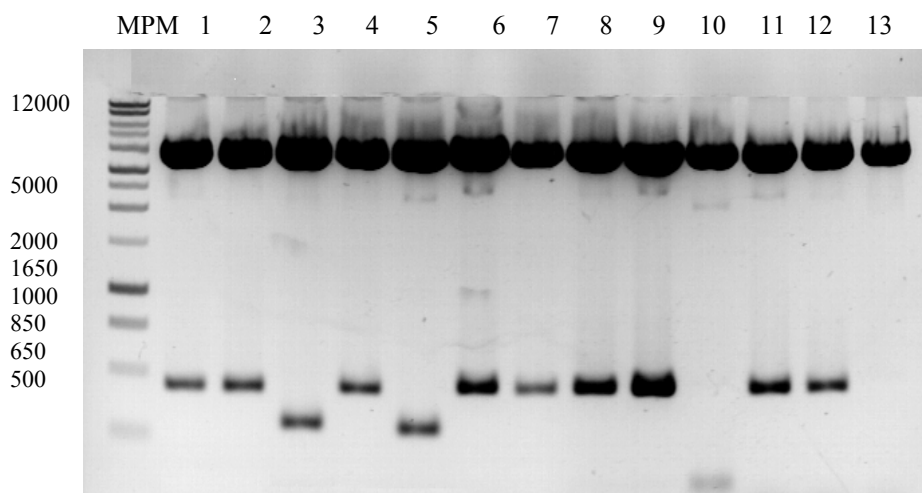


Figura 15. DNA plasmídico digerido con *EcoRI*

Se construyeron 4 genotecas sustractivas de 450 clonas cada una:

1. Genes que se inducen en NIC II.
2. Genes que se reprimen en NIC III.
3. Genes que se inducen en cáncer invasor.
4. Genes reprimidos en cáncer invasor.

6. Fragmentos diferenciales amplificados por PCR, utilizando los oligonucleótidos anidados 1R y 2R de la SSH.

Para asegurar que los fragmentos que conforman las genotecas provienen de la hibridación sustractiva, se realizó PCR de cada una de las clonas con los oligonucleótidos empleados en el último PCR de la SSH (anidados). En la Figura 16 se observa que todas las clonas efectivamente son fragmentos de genes expresados diferencialmente. Los tamaños de los productos de PCR además corresponden a fragmentos obtenidos por restricción del DNA plasmídico.

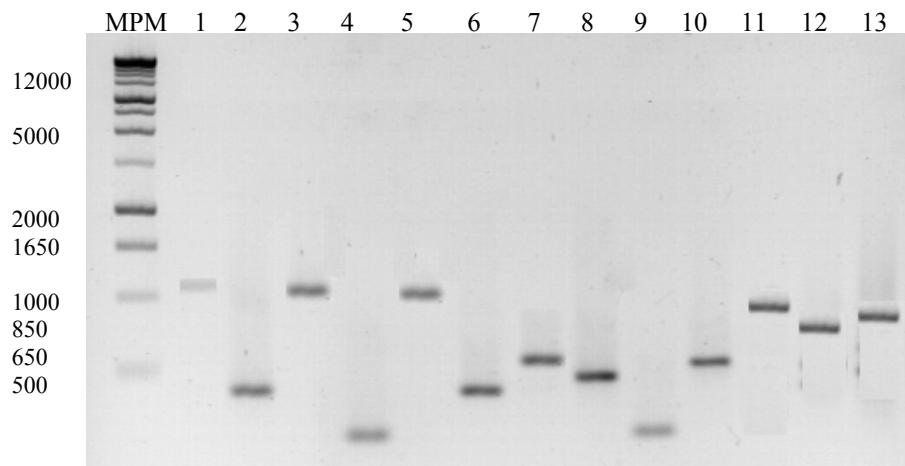


Figura 16. Amplificación por PCR de los fragmentos diferenciales.

7. Microarreglos.

En la Figura 17 se presenta la detección del marcaje de las sondas, se observa que la sonda control y problema ven más intensas en una dilución 1:5 respecto al control del kit donde se cargo 5 μ l sin diluir de los nucleótidos marcados. Se

obtuvo el marcaje esperado cuya marca de las sondas es parecida al control. Con las sondas marcadas adecuadamente se procedió a la construcción de los macroarreglos.

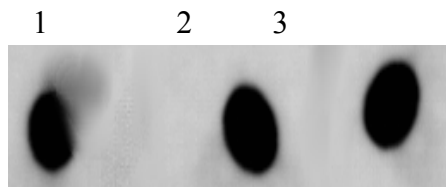


Figura 17. Sondas marcadas.

- 1 control kit 1/5
- 2 sonda c. problema
- 3 sonda c. control

Los macroarreglos de cDNA de genes diferenciales inducidos y reprimidos, fueron construídos a partir de los productos de PCR con iniciadores anidados, esto se hizo con la finalidad de eliminar posibles interferencias del vector pCR TOPO-4 al hibridar los arreglos con las sondas marcadas.

Se colocó ~50 ng/ μ l de los productos de PCR de las 450 clonas de cDNA provenientes de la hibridación sustractiva de cada condición (inducidos y reprimidos). Los controles positivos consistieron en cDNA proveniente de tejido lesión y tejido sano. Los controles negativos consistieron de TE, y también pCR TOPO-4. Con ello se confirmaron los controles negativos para experimentos posteriores.

Las sondas que se utilizaron para hibridar los macroarreglos, fueron cDNAs provenientes de tejido lesión y de tejido sano, ambos marcados con fluoresceína. Los macroarreglos se hicieron por duplicado, y cada réplica se hibridó con la condición control y con la condición problema. En la Figura 18 se presentan un macroarreglo típico de los genes que se inducen y en la Figura 19 uno de los genes que se reprimen, ambos hibridados con las sondas correspondientes. Se realizaron los macroarreglos con todas las clonas de cada una de las genotecas, y de esta forma se evaluó su perfil de expresión en los diferentes

estadios, de las diferentes biopsias sintetizó cDNA y se marco con fluoresceína para evaluar las clonas de las genotecas sustractivas. La cantidad de muestra que se cargo en cada uno de los macroarreglos fue la misma para evaluar genes inducidos y genes reprimidos.

En los macroarreglos de la Figura 18 A se presentan algunas de las clonas de la genoteca de genes inducidos hibridados con la sonda de cDNA del tejido con lesión, y la Figura 19 B presenta las mismas clonas en igual concentración (como se observa en el control positivo (círculo rojo)). Hibridadas con la sonda del cDNA del tejido sano.

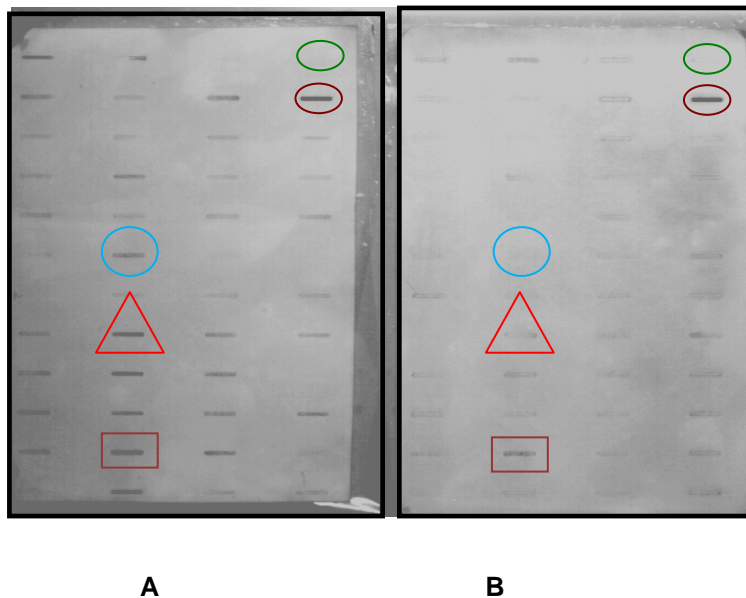


Figura 18. Macroarreglo de los genes que se inducen.

- A. Genes inducidos hibridados con la sonda de tejido lesión.
- B. Genes inducidos evaluados con la sonda de tejido sano.

En los macroarreglos de la figura 18 A se observa que existen genes que se están expresando de forma completamente diferencial, para ejemplificar como se realizó el análisis de expresión se cada clona se presentan tres ejemplos de lo que puede observarse en el macroarreglo: 1) en el caso de la clona marcada en el círculo azul, de la Figura 18 A aparece la banda, pero en la Figura 18 B, no da señal de hibridación, este resultado demuestra que este gen únicamente se expreso en el

tejido lesión, y que es inducido durante el proceso de transformación de una célula sana a célula neoplásica.

En el caso de la clona señalada con el triángulo, se trata de un gen que presenta cambio en el nivel de expresión, este gen está presente de forma constitutiva en una célula normal (tejido sano), y su nivel de expresión se incrementará en células neoplásicas (tejido lesión).

La clona marcada en forma rectangular se trata de un gen que no cambia su nivel de expresión, está presente de igual forma en células normales y en células neoplásicas.

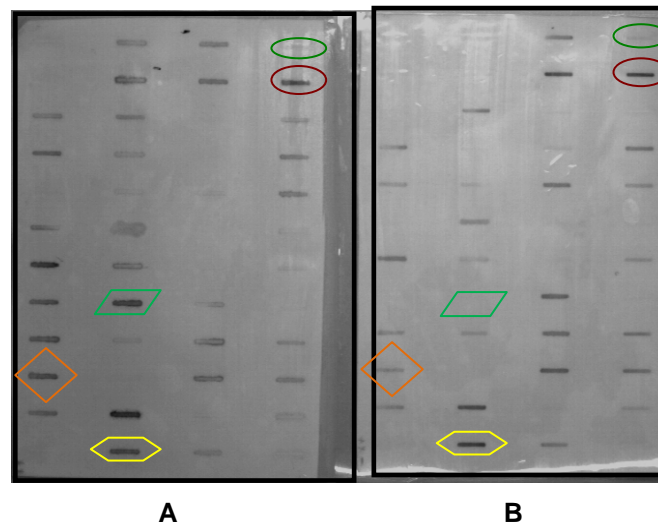


Figura 19. Macroarreglo de genes que se inducen.

- A. Genes inducidos hibridados con la sonda de tejido sano.
- B. Genes inducidos evaluados con la sonda de tejido lesión.

En los macroarreglos de la figura 19 A se colocaron clonas de las genotecas que contienen los genes que se reprimen, en este caso se observa que existen genes que se apagan por completo (represión diferencial), en el macroarreglo se observa: 1) en el caso de la clona marcada en el paralelogramo verde, de la Figura 19 A aparece la banda, pero en la Figura 19 B, no da señal de hibridación, este resultado demuestra que este gen únicamente se expresa en tejido sano, y que su expresión se reprime por completo durante el proceso de transformación de una célula sana a célula neoplásica, por que no está expresado en tejido lesión.

En el caso de la clona señalada con el rombo naranja, se trata de un gen que presenta cambio en el nivel de expresión, este gen está expresado de forma constitutiva en una célula normal (tejido sano), y su nivel de expresión disminuye en células neoplásicas (tejido lesión).

La clona marcada en forma hexagonal se trata de un gen que no cambia su nivel de expresión, está presente de igual forma en células normales y en células neoplásicas.

El análisis de los macroarreglos permitió que de cada una de las clonas se evaluara su nivel de expresión génica, en las tabla 11 y 12 se presenta el resumen de los fragmentos inducidos y reprimidos que se identificaron en cada una de las genotecas elaboradas.

Tabla 11. Fragmentos de transcritos que se inducen.

Tamaño de Fragmento	Número de clonas NIC III	CC invasor.
Alrededor de 1000 pb	59	71
Alrededor de 750 pb	137	149
Alrededor de 500 pb	148	123
Alrededor de 250 pb	60	78
Menores a 250 pb	46	29

Tabla 12. Fragmentos de transcritos que se reprimen.

Tamaño de Fragmento	Número de clonas NIC III	CC invasor.
Alrededor de 1000 pb	23	67
Alrededor de 750 pb	141	123
Alrededor de 500 pb	157	174
Alrededor de 250 pb	74	68
Menores a 250 pb	55	18

8. Resultados de secuenciación.

Con fines prácticos para investigaciones futuras, las clonas fueron re-etiquetadas, con esto también se llevará a cabo más fácilmente el análisis de datos en esta tesis.

En el análisis de los macroarreglos se identificaron 175 genes que se inducen de los cuales 153 fueron secuenciados, 62 genes se reprimen, de estos 32 fueron secuenciados, con cambio en el nivel de expresión se encontraron 182, de los que solo se han secuenciado 29 fragmentos, en las genotecas también se encontró que 31 genes están presentes en ambas condiciones, es decir que están presentes de forma constitutiva. Con respecto a los genes en los que hay cambio en el nivel de expresión, el análisis estadístico (ANOVA), con un valor de $P=0.005$, mostró diferencia significativa entre el nivel de expresión de genes en tejido lesión respecto a tejido sano. También se demostró que en promedio el nivel de expresión cambia (aumenta o disminuye) 2.5 veces respecto a su expresión en tejido sano, los que están por debajo de este valor fueron considerados como expresión constitutiva.

En las Tablas 13 y 14 se presentan los resultados de la secuenciación de genes que se inducen y reprimen respectivamente, y en las Tablas 15 y 16 se presentan los genes con cambio en el nivel de expresión (aumenta y disminuye respectivamente). Se hizo un análisis comparativo en la base de datos del NCBI, todo lo reportado en las tablas tiene un valor de E de $1e-80$, y presentaron de un 70 a 99% de identidad.

Tabla 13. Genes Inducidos en CaCU

Numero de Clona	Pares de bases	Similitud	No. Acceso
FFCC001	359	Homo sapiens family with sequence similarity 110, member A, mRNA(cDNA clone MGC:21792 IMAGE:4181303), complete cds.	BC022238.1
FFCC003	673	Homo sapiens sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans) (SEL1L), mRNA.	NM_005065.3
FFCC004	600	Homo sapiens POU class 6 homeobox 2 (POU6F2), mRNA.	NM_007252.2
FFCC005	293	Culicoides sonorensis gelsolin gene, partial cds.	AY686211.1
FFCC006	300	Platanus x acerifolia mRNA for partial putative Tyl-copia reverse ranscriptase (RT gene) and partial DfRedu pseudogene.	AM397241.1
FFCC008	653	Homo sapiens far upstream element (FUSE) binding protein 1 (FUBP1),mRNA.	NM_003902.3
FFCC009	720	PREDICTED: Homo sapiens far upstream element (FUSE) binding protein 3 (FUBP3), mRNA.	XM_001128545.1
FFCC010	910	Homo sapiens squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 2 (SART2), mRNA.	NM_013352.1
FFCC011	900	Homo sapiens transducin-like enhancer of split 3 (E(spl) homolog, Drosophila) (TLE3), mRNA.	NM_005078.1
FFCC012	1137	Homo sapiens delta-like 1 (Drosophila) (DLL1), mRNA.	NM_005618.2
FFCC013	651	Homo sapiens hypermethylated in cancer 1 (HIC1), mRNA.	NM_006497.2
FFCC014	720	No hay identidad!!!!	
FFCC015	770	Homo sapiens pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1), mRNA.	NM_004219.2
FFCC017	840	Homo sapiens transmembrane protein 22 (TMEM22), mRNA.	NM_025246.1
FFCC019	540	Homo sapiens proliferation-associated 2G4, 38kDa (PA2G4), mRNA.	NM_006191.1
FFCC020	780	Homo sapiens adhesion regulating molecule 1 (ADRM1), transcript variant 1, mRNA.	NM_007002.2
FFCC021	780	No hay identidad	
FFCC023	506	Homo sapiens ankyrin repeat domain 13B (ANKRD13B), mRNA.	NM_152345.3
FFCC024	284	Homo sapiens hedgehog acyltransferase-like (HHATL), mRNA.	NM_020707.2
FFCC026	360	No hay identidad	
FFCC027	600	Homo sapiens BCL2-associated athanogene (BAG1), mRNA.	NM_004323.3
FFCC030	600	No hay identidad	
FFCC032	480	Homo sapiens LRP2 binding protein (LRP2BP), mRNA.	NM_018409.2
FFCC033	660	Homo sapiens nuclear receptor interacting	BC131562.1

		protein 2, mRNA (cDNA clone MGC:148142 IMAGE:40109200), complete cds.	
FFCC034	418	Homo sapiens bromodomain containing 7 (BRD7), mRNA.	NM_013263.2
FFCC035	540	Homo sapiens NLR family, pyrin domain containing 3 (NLRP3), transcript variant 2, mRNA.	NM_183395.1
FFCC037	959	Homo sapiens sonic hedgehog homolog (Drosophila) (SHH), mRNA.	NM_000193.2
FFCC038	600	PREDICTED: Homo sapiens catenin (cadherin-associated protein), delta 1 (CTNND1), mRNA.	XM_001126823.1
FFCC039	526	Homo sapiens serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative)(SPINK7), mRNA.	NM_032566.2
FFCC040	219	No hay identidad	
FFCC041	449	No hay identidad	
FFCC042	318	No hay identidad	
FFCC043	277	No hay identidad	
FFCC044	352	No hay identidad	
FFCC045	257	No hay identidad	
FFCC046	263	No hay identidad	
FFCC047	191	No hay identidad	
FFCC048	267	No hay identidad	
FFCC049	502	No hay identidad	
FFCC050	207	No hay identidad	
FFCC051	502	No hay identidad	
FFCC052	502	No hay identidad	
FFCC053	638	Homo sapiens dentin sialophosphoprotein (DSPP), mRNA.	NM_014208.3
FFCC058	759	Homo sapiens zinc finger protein 134 (ZNF134), mRNA.	NM_003435.3
FFCC059	764	Homo sapiens G protein-coupled receptor, family C, group 6, member A (GPC6A), mRNA	NM_148963.1
FFCC060	301	Homo sapiens defensin, beta 113 (DEFB113), mRNA	NM_001037729.1
FFCC061	520	Homo sapiens caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE (CO1), transcript variant 1, mRNA	NM_001017534.1
FFCC062	601	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 (Kua-UEV), transcript variant 1, mRNA	NM_199203.1
FFCC063	596	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1 (EIF2AK1), mRNA	NM_014413.2
FFCC064	718	Homo sapiens TRIAD3 protein (TRIAD3), transcript variant 2, mRNA	NM_207116.1
FFCC065	538	Homo sapiens family with sequence similarity 40, member B (FAM40B), mRNA	NM_020704.1
FFCC066	856	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor,	NM_001756.3

		clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6 (SERPINA6), mRNA	
FFCC067	540	Homo sapiens hairy and enhancer of split 2 (Drosophila) (HES2), mRNA	NM_019089.3
FFCC068	295	PREDICTED: Homo sapiens similar to TBC1 domain family, member 2B (LOC648189), mRNA	XM_937239.2
FFCC070	682	Homo sapiens glucuronidase, beta-like 1 (GUSBL1), mRNA	NM_001033523.1
FFCC071	419	Homo sapiens golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2-like 1 (GOLGA2L1), mRNA	NM_017600.1
FFCC072	493	Homo sapiens proline-rich protein HaeIII subfamily 2 (PRH2), mRNA	NM_005042.2
FFCC073	1068	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 34 (USP34), mRNA	NM_014709.2
FFCC074	725	Homo sapiens pim-3 oncogene (PIM3), mRNA	NM_001001852.2
FFCC075	850	Homo sapiens BTB (POZ) domain containing 7 (BTBD7), transcript variant 1, mRNA	NM_001002860.2
FFCC076	628	PREDICTED: Homo sapiens ropporin, rhophilin associated protein 1B, transcript variant 2 (ROPN1B), mRNA	XM_940725.2
FFCC077	874	Homo sapiens gamma-glutamyltransferase-like 3 (GGTL3), transcript variant 3, mRNA	NM_178026.1
FFCC078	528	Homo sapiens mortality factor 4 like 1 (MORF4L1), transcript variant 1, mRNA	NM_006791.2
FFCC079	557	Homo sapiens mortality factor 4 like 1 (MORF4L1), transcript variant 1, mRNA	NM_006791.2
FFCC080	559	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 7 (AKAP7), transcript variant alpha, mRNA	NM_004842.2
FFCC081	781	Homo sapiens transcriptional adaptor 3 (NGG1 homolog, yeast)-like (TADA3L), transcript variant 1, mRNA	NM_006354.2
FFCC082	551	Homo sapiens polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J, 13.3kDa (POLR2J), mRNA	NM_006234.4
FFCC083	840	Homo sapiens alkylglycerone phosphate synthase (AGPS), mRNA	NM_003659.2
FFCC084	545	Homo sapiens similar to phosphatidylinositol 4-kinase alpha (LOC375133), mRNA	NM_199345.2
FFCC085	694	Homo sapiens transmembrane channel-like 8 (TMC8), mRNA	NM_152468.3
FFCC086	243	Homo sapiens transmembrane channel-like 8 (TMC8), mRNA	NM_152468.3
FFCC087	600	Homo sapiens transmembrane channel-like 8 (TMC8), mRNA	NM_152468.3
FFCC088	243	Similitude no significativa	
FFCC089	600	Mus musculus early growth response 4(Egr4), mRNA.	NM_020596.2
FFCC090	615	Homo sapiens ADAM metallopeptidase domain 7 (ADAM7), mRNA	NM_003817.1
FFCC091	320	Homo sapiens ADAM metallopeptidase domain 7	NM_003817.1

		(ADAM7), mRNA	
FFCC092	633	Homo sapiens NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 5 (NALP5), mRNA	NM_153447.2
FFCC093	523	Homo sapiens NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 5 (NALP5), mRNA	NM_153447.2
FFCC094	467	Homo sapiens paired box gene 2 (PAX2), transcript variant a, mRNA	NM_003987.2
FFCC098	490	Homo sapiens CD83 molecule (CD83), transcript variant 2, mRNA	NM_001040280.1
FFCC099	840	Homo sapiens CD83 molecule (CD83), transcript variant 2, mRNA	NM_001040280.1
FFCC100	570	Homo sapiens ADAM metallopeptidase domain 7 (ADAM7), mRNA	NM_003817.1
FFCC101	730	Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A5 (UGT1A5), mRNA	NM_019078.1
FFCC102	268	Homo sapiens small proline-rich protein 2B (SPRR2B), mRNA	NM_001017418.1
FFCC103	598	Homo sapiens achaete-scute complex (Drosophila) homolog-like 3 (ASCL3), mRNA	NM_020646.1
FFCC104	624	Homo sapiens family with sequence similarity 101, member A (FAM101A), mRNA	NM_181709.2
FFCC105	850	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 (TNFRSF8), transcript variant 2, mRNA	NM_152942.2
FFCC106	360	Homo sapiens hepatocellular carcinoma-associated gene TD26 (LOC55908), mRNA	NM_018687.3
FFCC107	660	Homo sapiens POU domain, class 3, transcription	NM_000307.1
FFCC108	600	Homo sapiens ecotropic viral integration site 5 (EVI5), mRNA	NM_005665.4
FFCC109	651	Homo sapiens hypermethylated in cancer 1 (HIC1), mRNA	NM_006497.2
FFCC110	712	Xenopus laevis nuclear protein SDK2 (sdk2-a), mRNA.	NM_001087460.1
FFCC111	770	Homo sapiens pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1), mRNA	NM_004219.2
FFCC113	777	Homo sapiens transmembrane protein 22 (TMEM22), mRNA	NM_025246.1
FFCC115	540	Homo sapiens proliferation-associated 2G4, 38kDa (PA2G4), mRNA	NM_006191.1
FFCC116	780	Homo sapiens adhesion regulating molecule 1 (ADRM1), transcript variant 1, mRNA	NM_007002.2
FFCC118	526	Homo sapiens chromosome 18 open reading frame 8 (C18orf8), mRNA	NM_013326.3
FFCC119	610	Homo sapiens MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3 (MYST3), mRNA	NM_006766.2
FFCC120	669	PREDICTED: Homo sapiens mastermind-like 1 (Drosophila) (MAML1), mRNA	XM_001126853.1
FFCC121	786	Homo sapiens scribbled homolog (Drosophila) (SCRIB), transcript variant 1, mRNA	NM_182706.2
FFCC122	720	Homo sapiens claudin 7 (CLDN7), mRNA	NM_001307.3
FFCC123	480	Human papillomavirus type 16 late major	EF547252.1

		capsid protein L1 gene, complete cds.	
FFCC124	657	Homo sapiens apoptosis inhibitor 5 (API5), mRNA	NM_006595.2
FFCC126	722	Homo sapiens metastasis associated 1(MTA1), mRNA	NM_004689.2
FFCC127	840	Homo sapiens selectin E (endothelial adhesion molecule 1) (SELE), mRNA	NM_000450.1
FFCC128	720	Homo sapiens heparanase (HPSE), mRNA	NM_006665.3
FFCC129	715	Homo sapiens TAO kinase 3 (TAOK3), mRNA	NM_016281.2
FFCC130	1016	Homo sapiens MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast) (MOBK1B), mRNA	NM_018221.1
FFCC132	1137	Homo sapiens tumor protein p73-like(TP73L), mRNA	NM_003722.3
FFCC133	966	Homo sapiens tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome) (TP53), mRNA	NM_000546.2
FFCC134	715	Homo sapiens retinoblastoma 1 (including osteosarcoma) (RB1), mRNA	NM_000321.1
FFCC135	840	Homo sapiens protein O-fucosyltransferase 1 (POFUT1), transcript variant 1, mRNA	NM_015352.1
FFCC136	1260	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2 (UBC4/5 homolog, yeast) (UBE2D2), transcript variant 2, mRNA	NM_181838.1
FFCC137	1175	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2 (UBC4/5 homolog, yeast) (UBE2D2), transcript variant 2, mRNA	NM_181838.1
FFCC138	700	Homo sapiens nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6 (NUDT6), transcript variant 1, mRNA	NM_007083.3
FFCC139	1009	Homo sapiens cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1), transcript variant A, mRNA	NM_004379.2
FFCC140	1034	Homo sapiens growth hormone regulated TBC protein 1 (GRTP1), mRNA	NM_024719.1
FFCC141	1910	Homo sapiens dual specificity phosphatase 10 (DUSP10), transcript variant 1, mRNA	NM_007207.3
FFCC142	915	Homo sapiens reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK), mRNA	NM_021111.1
FFCC143	1400	Homo sapiens reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK), mRNA	NM_021111.1
FFCC144	910	Homo sapiens reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK), mRNA	NM_021111.1
FFCC145	1223	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC730675 (LOC730675), mRNA	XM_001126753.1
FFCC146	945	Homo sapiens metallothionein M (MTM), mRNA	NM_175620.1
FFCC147	1329	Homo sapiens mindbomb homolog 1(Drosophila) (MIB1), mRNA	NM_020774.2
FFCC148	1403	Homo sapiens mindbomb homolog 1(Drosophila) (MIB1), mRNA	NM_020774.2
FFCC149	909	Homo sapiens mindbomb homolog 1(Drosophila) (MIB1), mRNA	NM_020774.2
FFCC150	1260	Homo sapiens bone morphogenetic protein 10 (BMP10), mRNA	NM_014482.1

FFCC151	1227	Homo sapiens endothelial differentiation-related factor 1 (EDF1), transcript variant alpha, mRNA	NM_003792.2
FFCC152	1049	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), transcript variant 4, mRNA	NM_139014.1
FFCC153	639	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (CEBPB), mRNA	NM_005194.2
FFCC154	1072	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (CEBPB), mRNA	NM_005194.2
FFCC155	1609	Homo sapiens epiregulin (EREG), mRNA	NM_001432.1
FFCC156	612	Homo sapiens vascular endothelial growth factor A (VEGFA), transcript variant 3, mRNA	NM_001025367.1
FFCC157	1330	Homo sapiens lysyl oxidase (LOX), mRNA	NM_002317.3
FFCC158	1260	Homo sapiens snail homolog 1 (Drosophila) (SNAIL1), mRNA	NM_005985.2
FFCC161	840	Homo sapiens TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 28kDa (TAF11), mRNA	NM_005643.2
FFCC162	1114	Homo sapiens cell division cycle and apoptosis regulator 1 (CCAR1), mRNA	NM_018237.2
FFCC163	1165	Homo sapiens metastasis associated 1 (MTA1), mRNA	NM_004689.2
FFCC164	1176	Homo sapiens adhesion molecule with Ig-like domain 2 (AMIGO2), mRNA	NM_181847.2
FFCC165	1006	Homo sapiens family with sequence similarity 57, member A (FAM57A), mRNA	NM_024792.1
FFCC166	1076	Homo sapiens estrogen receptor 2 (ER beta) (ESR2), transcript variant c, mRNA	NM_001040276.1
FFCC167	1101	Homo sapiens matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) (MMP11), mRNA	NM_005940.3
FFCC168	1087	Homo sapiens cAMP responsive element binding protein-like 2 (CREBL2), mRNA	NM_001310.2
FFCC169	980	Homo sapiens growth arrest-specific 1 (GAS1), Mrna	NM_002048.1
FFCC170	1050	Homo sapiens fatty acid 2-hydroxylase (FA2H), mRNA	NM_024306.2
FFCC171	1400	Homo sapiens procollagen (type III) N-endopeptidase (PCOLN3), mRNA	NM_002768.1
FFCC172	560	Homo sapiens YY1 associated factor 2 (YAF2), transcript variant 1, mRNA	NM_005748.3
FFCC173	978	Homo sapiens v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian) (MYCN), mRNA	NM_005378.4
FFCC174	910	Homo sapiens muscleblind-like (Drosophila) (MBNL1), transcript variant 6, mRNA	NM_207296.1
FFCC175	979	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, (SMARCA2), mRNA	NM_003070.3
FFCC176	776	Homo sapiens SPARC-like 1 (mast9, hevin) (SPARCL1), mRNA	NM_004684.3

Tabla 14. Genes reprimidos en CaCU

Genes reprimidos en CaCU			
No. Clona	Tamaño	Similitud	No. Acceso NCBI
RFCC001	778	Homo sapiens transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha) (TFAP2A), transcript variant 2, mRNA	NM_001032280.1
RFCC002	746	Homo sapiens ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (ENTPD8), mRNA	NM_198585.1
RFCC003	965	Homo sapiens numb homolog (Drosophila) (NUMB), transcript variant 4, mRNA	NM_001005745.1
RFCC004	540	Homo sapiens cell adhesion molecule 4 (CADM4), mRNA.	NM_145296.1
RFCC006	833	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 55 (C20orf55), transcript variant 2, Mrna	NM_207121.3
RFCC007	721	Homo sapiens zinc finger, RAN-binding domain containing 1 (ZRANB1), mRNA	NM_017580.1
RFCC008	755	Homo sapiens CREB regulated transcription coactivator 1 (CRTCL), transcript variant 1, mRNA	NM_001098482.1
RFCC009	778	Homo sapiens hairless homolog (mouse) (HR), transcript variant 2, mRNA	NM_024364.1
RFCC010	960	Homo sapiens hairless homolog (mouse) (HR), transcript variant 2, mRNA.	NM_018411.3
RFCC013	648	Homo sapiens NFKBIL1, ATP6V1G2, BAT1 genes for nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer, ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G isoform 2, HLA-B associated transcript 1 complete cds.	AB202112.1
RFCC014	595	Homo sapiens dual specificity phosphatase 10, mRNA (cDNA clone MGC:74610 IMAGE:6178330), complete cds.	BC063826.1
RFCC015	759	Homo sapiens dual specificity phosphatase 10, mRNA (cDNA clone MGC:74610 IMAGE:6178330), complete cds.	BC063826.1
RFCC016	416	Homo sapiens adenylate kinase 2 (AK2), transcript variant AK2B, mRNA.	NM_013411.3
RFCC017	563	Homo sapiens prohibitin (PHB), mRNA	NM_002634.2
RFCC019	915	Homo sapiens deleted in lung and esophageal cancer 1 (DLEC1), transcript variant DLEC1-S3, mRNA	NM_007337.2
RFCC020	808	Homo sapiens caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase(CASP8),	NM_001080125.1

		transcript variant G, mRNA.	
RFCC021	650	Homo sapiens desmoglein 2 (DSG2), mRNA.	NM_001943.2
RFCC022	989	Homo sapiens matrix-remodelling associated 5 (MXRA5), mRNA.	NM_015419.2
RFCC023	533	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, DARPP-32) (PPP1R1B)	NM_181505.2
RFCC024	580	Homo sapiens CUE domain containing 2 (CUEDC2), mRNA.	NM_024040.2
RFCC025	358	Homo sapiens ADP-ribosylation factor-like 2 (ARL2), mRNA.	NM_001667.2
RFCC026	839	Homo sapiens nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes) NOS2A), mRNA.	NM_000625.3
RFCC027	794	Homo sapiens ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)(RRM2B), mRNA.	NM_015713.3
RFCC028	831	Homo sapiens cell division cycle 2-like 2 (PITSLRE proteins) (CDC2L2), transcript variant 1, mRNA.	NM_024011.2
RFCC029	767	Homo sapiens KIAA1211 protein (KIAA1211), mRNA.	NM_020722.1
RFCC030	787	Homo sapiens endothelin converting enzyme 2, mRNA (cDNA clone MGC:167001 IMAGE:8860334), complete cds.	BC142950.1
RFCC031	692	Homo sapiens PIN2-interacting protein 1 (PINX1), mRNA.	NM_017884.4
RFCC032	681	Homo sapiens transcription termination factor, RNA polymerase I (TTF1), mRNA	NM_007344.2
RFCC033	490	Homo sapiens cyclin I (CCNI), mRNA	NM_006835.2
RFCC034	540	Homo sapiens MAX dimerization protein 4 (MXD4), mRNA.	NM_006454.2
RFCC036	534	Mus musculus histone deacetylase 5 (Hdac5), transcript variant 2,mRNA.	NM_010412.3

Tabla 15. Genes en los que se aumenta su nivel de expresión. Inducidos en CaCU

Numero de Clona	Pares de bases	Similitud	No. acceso
FFCC002	540	metabotropic glutamate receptor B	NM_001011623.1
FFCC016	416	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit (CACNB2), transcript variant 4, mRNA.	NM_201597.1
FFCC018	480	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 12 (MAPK12), mRNA.	NM_002969.3
FFCC022	540	Homo sapiens Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2(RASSF2), transcript variant 2, mRNA.	NM_170774.1
FFCC025	632	Homo sapiens ras homolog gene family, member D (RHOD), mRNA.	NM_014578.2
FFCC028	575	Homo sapiens TGF β -induced factor homeobox 1 (TGIF1), transcript variant 8, mRNA.	NM_174886.1
FFCC029	772	Homo sapiens cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae) (CDC7), mRNA.	NM_003503.2
FFCC031	652	PREDICTED: Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 (PCSK6), mRNA.	XM_001130900.1
FFCC036	720	Homo sapiens mucin 1, cell surface associated (MUC1), transcript variant 1, mRNA.	NM_002456.4
FFCC054	493	Homo sapiens Notch homolog 3 (Drosophila) (NOTCH3), mRNA.	NM_000435.2
FFCC055	559	Homo sapiens Notch homolog 4 (Drosophila) (NOTCH4), mRNA	NM_004557.3
FFCC056	689	Homo sapiens Notch homolog 4 (Drosophila) (NOTCH4), mRNA.	NM_004557.3
FFCC057	700	Homo sapiens Notch homolog 4 (Drosophila) (NOTCH4), mRNA.	NM_004557.3
FFCC069	610	Homo sapiens WNK lysine deficient protein kinase 1 (WNK1), mRNA	NM_018979.1
FFCC095	569	Homo sapiens chloride channel, calcium activated, family member 1 (CLCA1), mRNA	NM_001285.1
FFCC096	655	Homo sapiens chloride channel, calcium activated, family member 1 (CLCA1), mRNA	NM_001285.1
FFCC097	512	Homo sapiens chloride channel, calcium activated, family member	NM_001285.1

		1 (CLCA1), mRNA	
FFCC112	416	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit (CACNB2), transcript variant 4, mRNA	NM_201597.1
FFCC117	1020	Homo sapiens Notch homolog 1,translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1), mRNA	NM_017617.2
FFCC125	1015	Homo sapiens solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 7 (SLC12A7), mRNA	NM_006598.1
FFCC131	1003	Homo sapiens cell division cycle 2-like 1 (PITSLRE proteins) (CDC2L1), transcript variant 9, mRNA	NM_033493.1
FFCC159	990	Homo sapiens solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 4 (SLC12A4), mRNA	NM_005072.3
FFCC160	1323	Homo sapiens cell division cycle 25A (CDC25A), transcript variant 1, mRNA	NM_001789.2

Tabla 16. Genes en los que se disminuye su nivel de expresión. reprimidos en CaCU

RFCC011	1050	Homo sapiens Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)(NOTCH1), mRNA.	NM_017617.2
RFCC012	720	Homo sapiens HLA-B associated transcript 1 (BAT1), transcript variant 2, mRNA.	NM_080598.4
RFCC018	589	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4) (CDKN2A), tr	NM_058197.2
RFCC035	840	Homo sapiens keratin 7 (KRT7), mRNA.	NM_005556.3

En el análisis de secuencias, se encontraron genes que se han descrito otros tipos de cáncer, y que hasta el momento no han sido descritos en cáncer cervicouterino, tales como HIC1, SMARCA, SART 2, PTTG 1, MYCN, DLEC 1. También se encontraron genes que pertenecen a la vía de señalización Notch, como Notch-1, 3, y 4, uno de sus ligandos Delta-like-1, y muchos otros genes que codifican para proteínas que participan de forma indirecta en esta vía de señalización. Otros

genes encontrados están implicados en la vía de las cinasas se encuentran por ejemplo: MAPK-12 y 14, PP2A. Otros genes implicados en control y desarrollo del ciclo celular son cdc7, ciclina D etc, (ver tablas 30, 31, 32 y 33).

De estos grupos de genes se seleccionaron algunos para comprobar el nivel de expresión mediante análisis Northern blot.

9. Análisis de los datos de acuerdo a la base de datos Gene Ontology.

El objetivo de utilizar esta herramienta fue para dilucidar la participación de dichos genes en los procesos principales: funciones celulares, funciones moleculares y componentes celulares. Estos resultados se presentan en forma de porcentaje de genes implicados en cada proceso.

En las Figuras 20, 21, y 22 se presentan los resultados de este análisis, y se concluye que para el caso de genes inducidos su función involucra principalmente procesos biológicos, 19% en metabolismo, 16% de procesos celulares, 16% desarrollo y crecimiento celular, 14% diferenciación celular, 10% respuesta a estímulos, 7% comunicación celular, 4% muerte celular. Con respecto a los genes que se reprimen el 16% está involucrado en comunicación celular, el 13% en respuesta a estímulos y muerte celular. Existe un mayor porcentaje de genes que se reprimen y que están relacionados con la muerte celular respecto a los genes que se inducen (Figura 20 a y b).

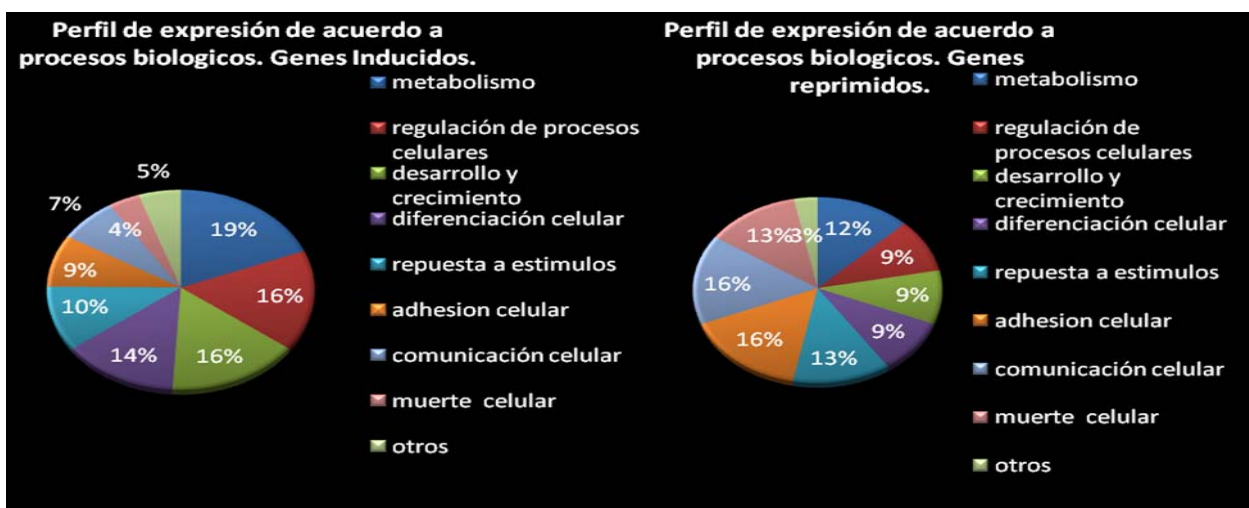


Figura 20. Perfil de la expresión génica de acuerdo a aspectos de los procesos biológicos. A). Genes inducidos. B). genes reprimidos.

En el análisis respecto a los componentes celulares presentados en la Figura 21 a y b, se encontró que de los genes que se inducen 22% corresponde a genes de unión a membrana, 20% región extracelular, 19% complejos proteínicos, 13% matriz extracelular, 7% complejos metil transferasa de histonas, y los que reprimen el 18% forman complejos proteínicos, el 15% involucra algún proceso relacionado con metiltransferasa de histonas, y el 11% está relacionado con matriz extracelular, ribonucleoproteínas, y organelos de unión a membrana.

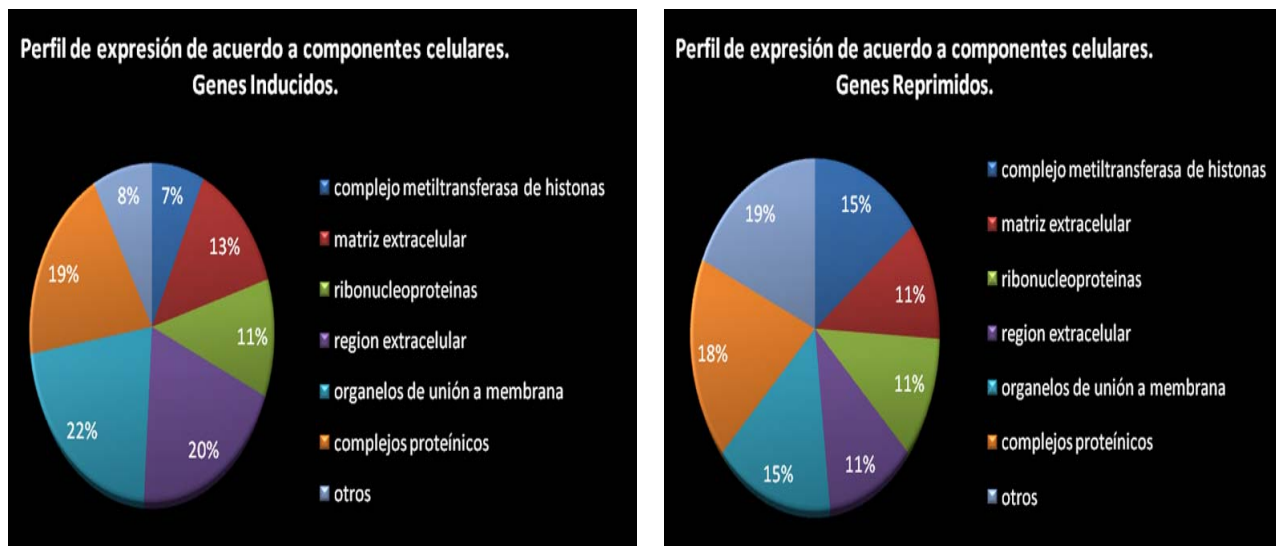


Figura 21. Perfil de la expresión génica de acuerdo a aspectos de los componentes celulares. A). Genes inducidos. B). genes reprimidos.

En cuanto a función molecular, en los genes que se inducen el 15% están implicados en transcripción, 12% participa en la unión célula-célula, el 9% en unión a proteínas y ácidos nucleicos, 10% actividad GTPasa, 6% actividad de factores de transcripción. Respecto a los que se reprimen el 13% en transducción de señales, 15% en actividad de factores de transcripción, entre los más relevantes, (Figura 22 a y b).

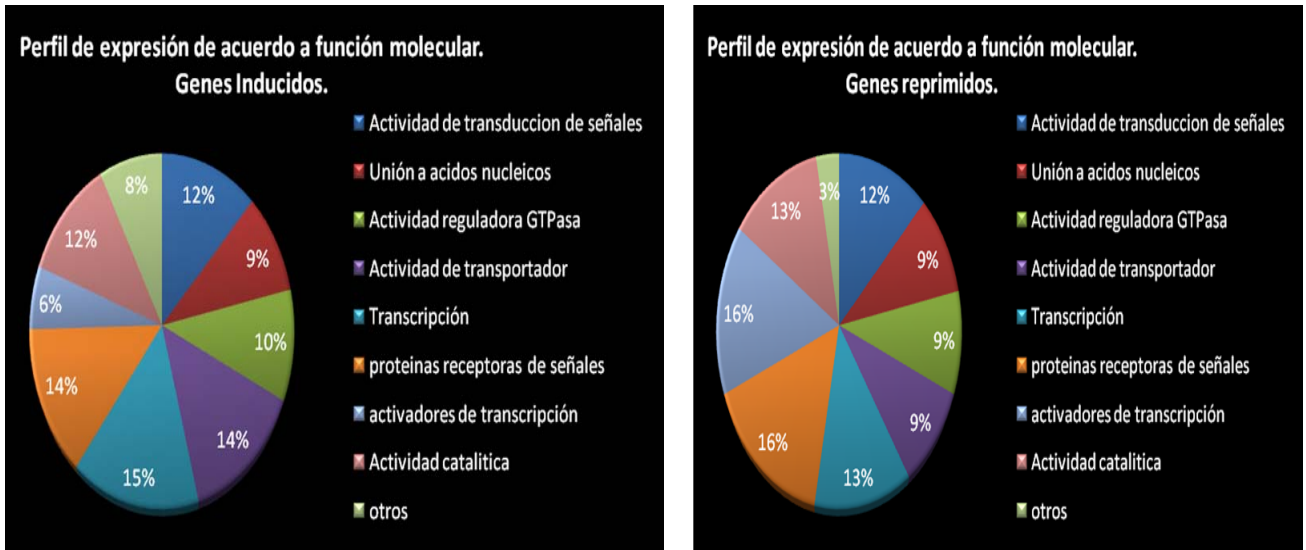


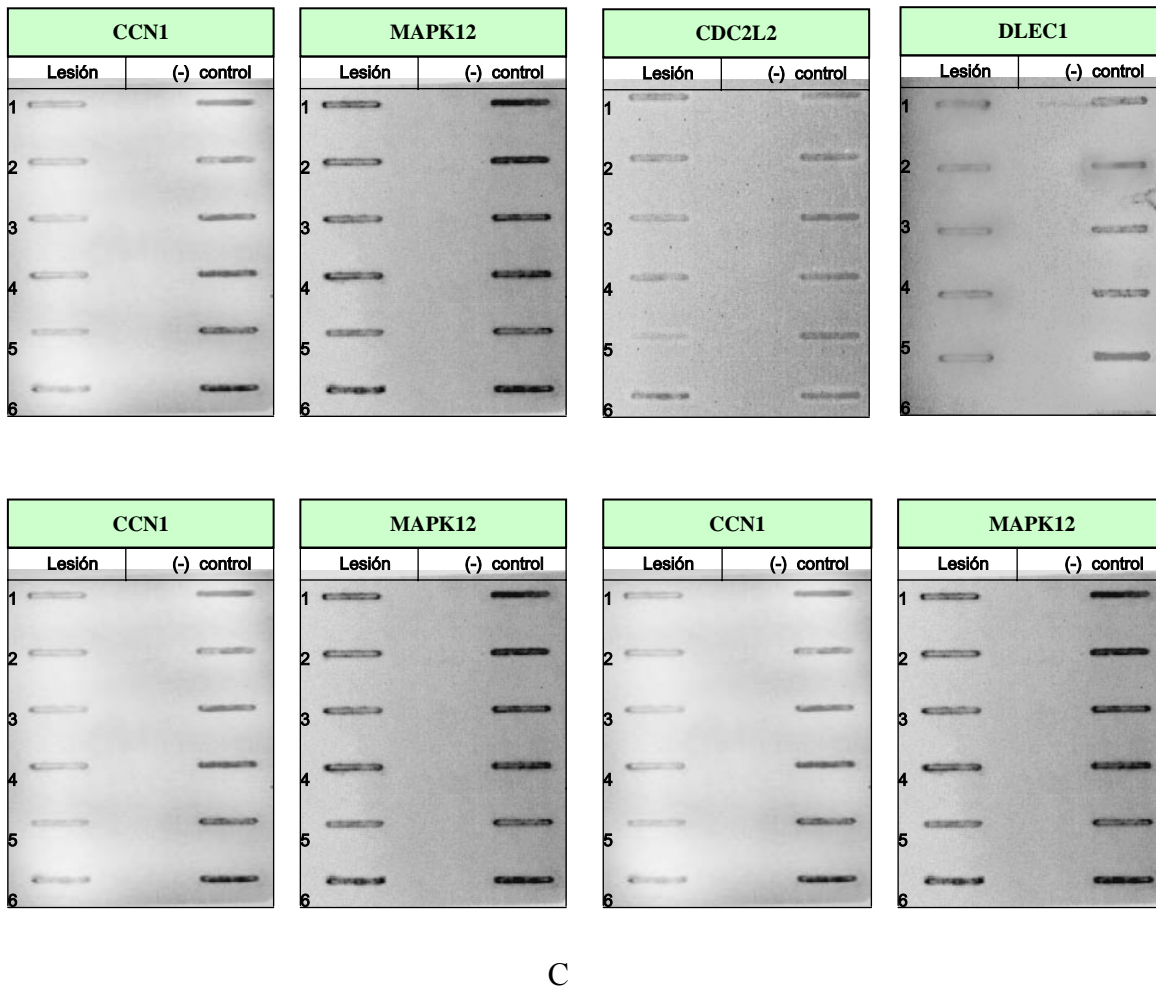
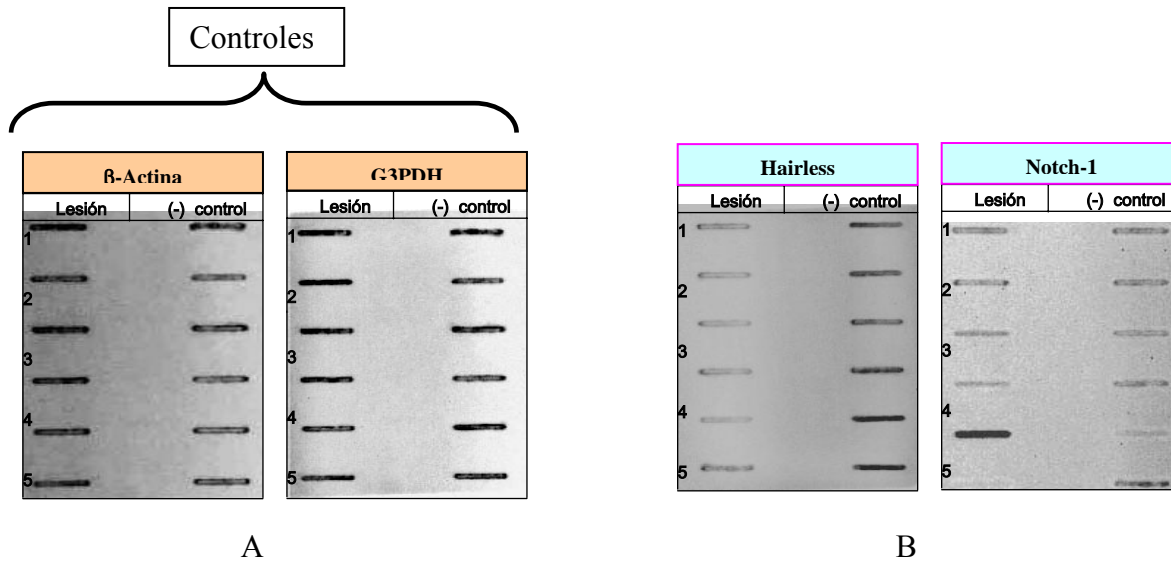
Figura 22. Perfil de la expresión génica de acuerdo a aspectos de su función molecular. A). Genes inducidos. B). genes reprimidos.

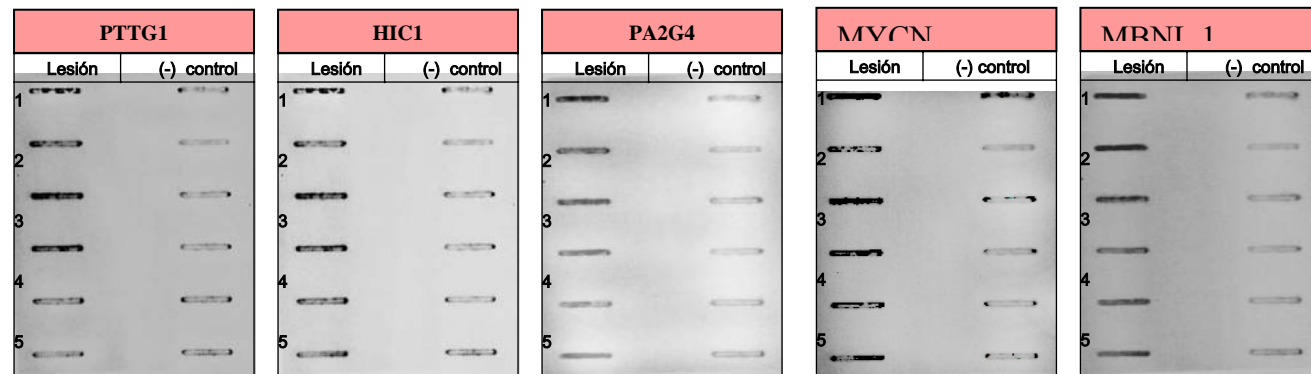
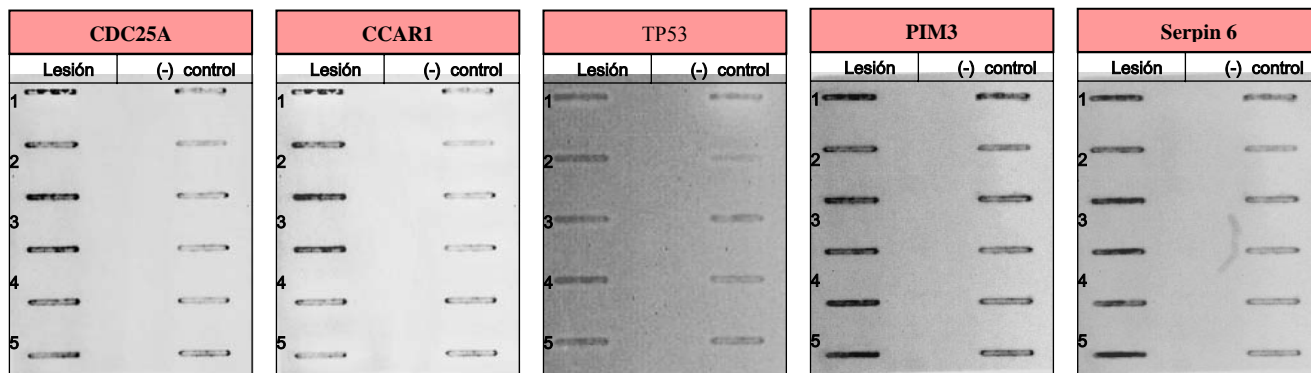
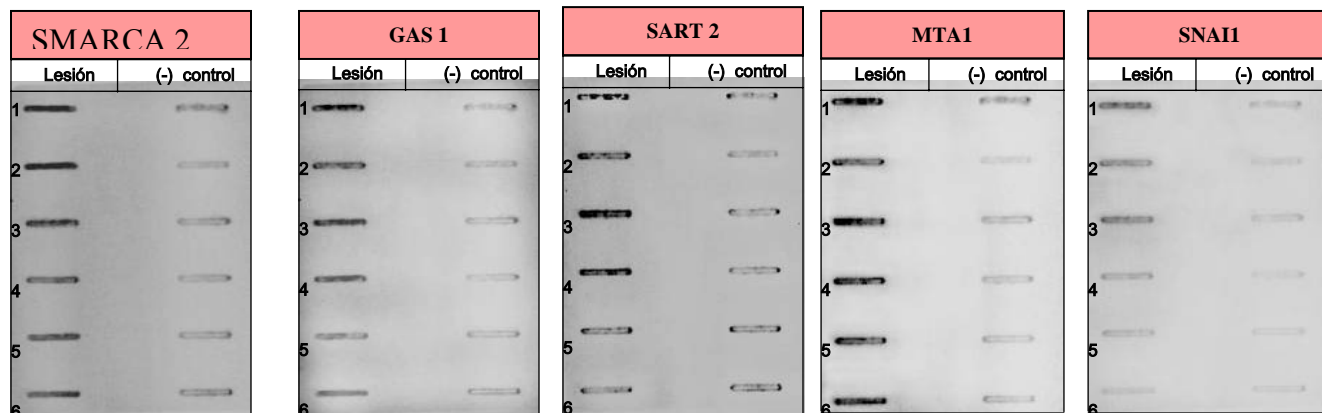
10. Análisis tipo Northern.

Se seleccionaron 35 clonas para validar tanto la SSH como los macroarreglos, para validar su expresión diferencial, estos resultados pueden observarse en la Figura 23.

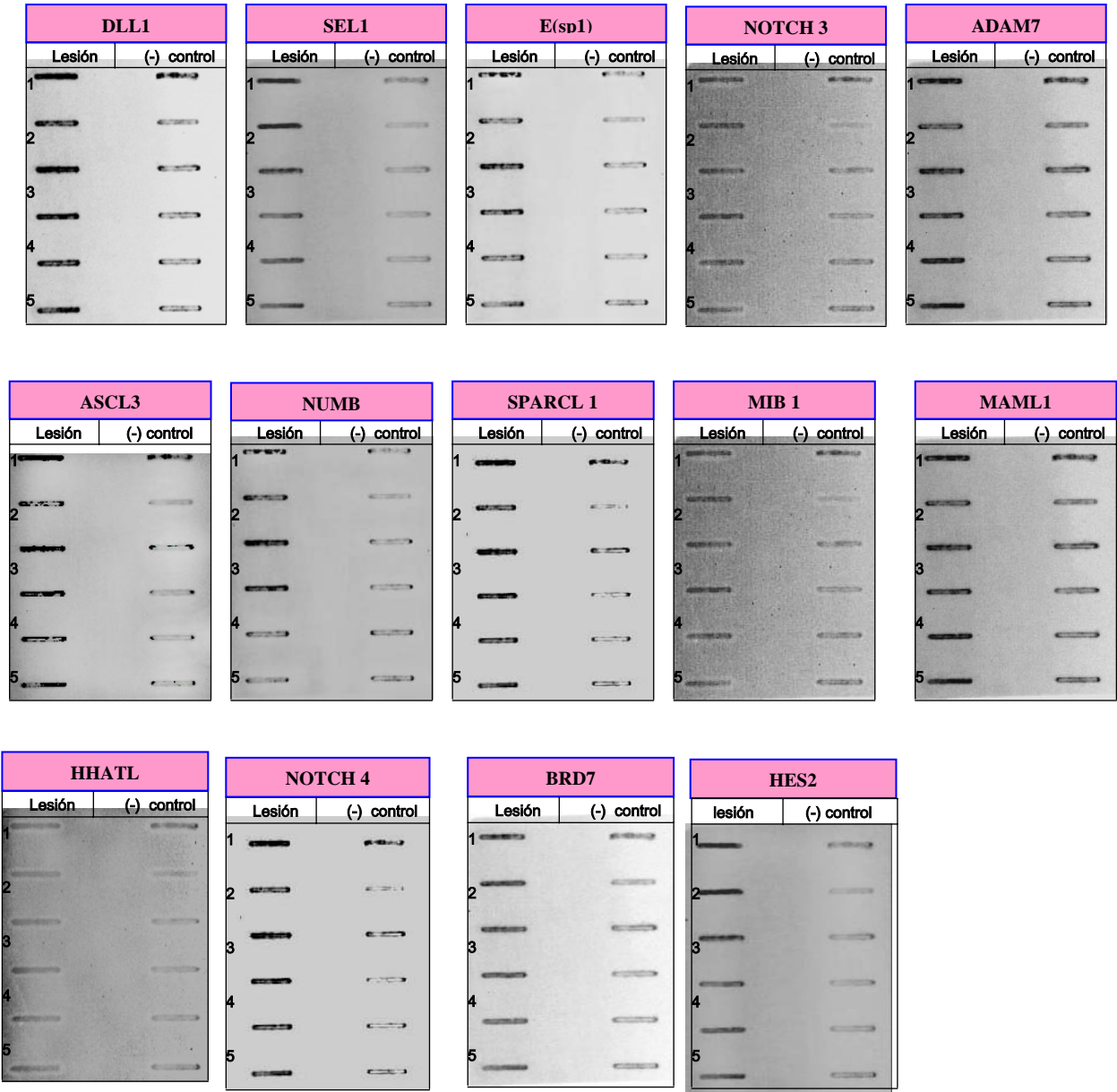
En el ensayo se utilizó RNA control y problema a concentraciones iguales y se transfirieron a membranas de nylon. Se utilizaron clonas con fragmentos de genes marcados con fluoresceína como sondas.

Número	Grado de lesión	Relación
1	NIC I	Up-regulated related Notch
2	NIC II	Down-regulated related with cancer
3	NIC II	Up-regulated related with cancer
4	NIC III	Up-regulated related with cancer
5	NIC III	Up-regulated related with Notch
6	Cáncer Invasivo	Control





D



E

Figura 23. Northern blot de diferentes genes involucrados en CC.

A) Control G3PDH y b-actina, B) Genes inducidos relacionados con la vía de señalización Notch, C) Genes reprimidos relacionados con la vía de señalización Notch, D) Genes inducidos relacionados con cáncer, E) Genes reprimidos relacionados con cáncer.

El análisis Northern mostró cambios en los niveles de expresión de diferentes genes, el análisis varianza (ANOVA), con un valor de $p= 0.0001$ demostrará una proporción de 7 veces mayor en el tejido lesión con respecto al tejido sano.

En el caso de DDL1, SEL 1, E(sp1), ADAM-7, ASCL3, GAS 1, NUMB, SPARCL 1, MIB1, MAML1, BRD 7, SNAI 1, TP53, PIM 3, cmyc, SMARCA 2, Notch-3 y Notch-4 se encontró que su sobre expresión es mantenida en todas las etapas de CC.

MBNL1, se sobre expresa en NIC I y NIC II, pero en NIC III y CC invasor, su sobre expresión empieza a disminuir ligeramente.

MTA, CCRA 1, PTTG 1, HIC 1, PA2G4, Notch 1 también se expresa en todas las etapas, pero su expresión máxima es en NIC III, y se apaga en cáncer invasivo.

DLEC 1, CDC2L2, CCNI, MAPK 12, mostraron muy ligera sobre expresión constante en toda la progresión de CC

CDC25A, SERPINA 6, HES, va incrementando ligeramente su nivel de expresión conforme avanza la lesión.

HHATL, Se encontraron ligeramente reprimidos con respecto a su expresión en tejido sano, Hairless, se encuentran permanentemente reprimido, SART 2, se encontró que se reprimen muy marcadamente hasta NIC III y en CC invasor sube un poco su expresión aunque no alcanza el nivel de expresión constitutiva. Este análisis nos indica que la regulación de los genes involucrados en el desarrollo y progresión del CC, no es tan sencillo como la sobre-expresión y represión de genes en cáncer, sino que dependen del estadio de la lesión, tal vez el mecanismo del desarrollo del cáncer es un proceso de etapas controladas respecto a la expresión de genes, en el que para que se sobre exprese un gen debe bajar su nivel de expresión uno o más genes

10. Análisis estadístico del nivel de expresión de los genes analizados.

Para el análisis de expresión génica en los genes identificados en CaCU, se realizó un análisis de la expresión relativa del nivel de expresión del gen en tejido sano o lesión respecto al control del gen constitutivo, y posteriormente se calculó el valor absoluto de expresión del gen en CaCU respecto al tejido sano.

En las tablas 17, 18, 19 y 20 se presentan estos análisis.

Tabla 17. Niveles de expresión de genes en NIC I

Nombre del gen	LESIÓN			NORMAL			Valor relativo (lesión/normal) ratio	Accesion number NCBI
	Valor absoluto o G3DPH	Valor absoluto o Gen (lesión)	Ratio	Valor absoluto G3DPH	Valor absoluto Gen (Normal)	Ratio		
DLL1	65	198	3.04	60	22	0.366	8.3	NM_005618.2
SEL1	65	191	2.93	60	16	0.266	11.01	NM_005065.3
E(sp1)	65	168	2.58	60	11	0.183	14.09	NM_005078.1
ADAM 7	65	198	3.04	60	25	0.41	7.41	NM_003817.1
ASCL3	65	201	3.09	60	22	0.366	8.44	NM_020646.1
GAS1	65	199	3.06	60	16	0.266	11.5	NM_002048.1
NUMB	65	198	3.04	60	14	0.233	13.04	NM_001005745.1
SPARCL1	65	202	3.10	60	20	0.333	9.30	NM_004684.3
MIB1	65	176	2.70	60	22	0.366	7.37	NM_020774.2
MAML1	65	198	3.04	60	25	0.416	7.30	XM_001126853.1
HES2	65	191	2.93	60	16	0.266	11.01	NM_019089.3
BRD7	65	168	2.58	60	11	0.183	14.09	NM_013263.2
MTA1	65	172	2.64	60	16	0.266	9.92	NM_004689.2
SNAI1	65	131	2.01	60	8	0.133	15.11	NM_005985.2
CDC25A	65	168	2.58	60	6	0.1	25.8	NM_001789.2
CCAR1	65	170	2.61	60	5	0.083	31.44	NM_018237.2
TP53	65	176	2.70	60	80	1.33	2.03	NM_000546.2
PIM3	65	202	3.10	60	24	0.4	7.75	NM_001001852.2
SERPINA 6	65	195	3	60	20	0.333	9.00	NM_001756.3
PTTG1	65	186	2.86	60	11	0.183	15.62	NM_004219.2
HIC1	65	188	2.89	60	9	0.15	19.26	NM_006497.2
PA2G4	65	187	2.87	60	14	0.23	12.47	NM_006191.1
SART2	65	198	3.04	60	21	0.35	8.68	NM_013352.1
v-myc	65	186	2.86	60	25	0.416	6.87	NM_005378.4
MBNL1	65	202	3.10	60	25	0.416	7.45	NM_207296.1
SMARCA 2	65	205	3.15	60	21	0.35	9	NM_003070.3
NOTCH1	65	171	2.63	60	98	1.63	1.61	NM_017617.2
NOTCH3	65	198	3.04	60	180	3	1.01	NM_000435.2
NOTCH4	65	210	3.23	60	26	0.433	7.45	NM_004557.3
DLEC1-S3	65	102	1.56	60	158	2.63	0.593	NM_007337.2
CDC2L2	65	85	1.30	60	133	2.21	0.588	NM_024011.2
CCNI	65	81	1.24	60	136	2.26	0.548	NM_006835.2
MAPK12	65	30	0.461	60	212	3.53	0.130	NM_002969.3
HHATL	65	101	1.55	60	100	1.66	0.933	NM_020707.2
Hairless	65	20	0.307	60	176	2.93	0.104	NM_019089.3

Tabla 18. Niveles de expresión de genes en NIC II

Nombre del gen	Lesión			Normal			Valor relativo (lesión/normal) ratio	Accession number NCBI
	Valor absoluto G3DPH	Valor absoluto Gen (lesión)	Ratio	Valor absoluto G3DPH	Valor absoluto Gen (Normal)	Ratio		
DLL1	65	188	2.89	60	14	0.233	12.40	NM_005618.2
SEL1	65	188	2.89	60	10	0.166	17.40	NM_005065.3
E(sp1)	65	171	2.63	60	11	0.183	14.37	NM_005078.1
ADAM 7	65	182	2.8	60	18	0.3	9.33	NM_003817.1
ASCL3	65	180	2.76	60	8	0.133	20.75	NM_020646.1
GAS1	65	198	3.04	60	8	0.133	22.85	NM_002048.1
NUMB	65	197	3.03	60	11	0.183	16.55	NM_001005745.1
SPARCL1	65	197	3.03	60	14	0.233	13.0	NM_004684.3
MIB1	65	176	2.70	60	14	0.233	11.58	NM_020774.2
MAML1	65	188	2.89	60	19	0.316	9.14	XM_001126853.1
HES 2	65	201	3.09	60	12	0.2	15.46	NM_019089.3
BRD7	65	178	2.73	60	11	0.183	14.91	NM_013263.2
MTA1	65	160	2.46	60	6	0.1	24.6	NM_004689.2
SNAI1	65	131	2.18	60	8	0.133	16.39	NM_005985.2
CDC25A	65	175	2.69	60	5	0.083	32.43	NM_001789.2
CCAR1	65	171	2.63	60	5	0.083	31.68	NM_018237.2
TP53	65	176	2.70	60	80	1.33	2.03	NM_000546.2
PIM3	65	198	3.04	60	21	0.35	8.68	NM_001001852.2
SERPINA6	65	198	3.04	60	18	0.3	10.15	NM_001756.3
PTTG1	65	188	2.89	60	10	0.166	17.4	NM_004219.2
HIC1	65	180	2.79	60	6	0.1	27.9	NM_006497.2
PA2G4	65	187	2.87	60	14	0.23	12.47	NM_006191.1
SART2	65	198	3.04	60	21	0.35	8.68	NM_005378.4
v myc	65	186	2.86	60	25	0.416	6.87	NM_207296.1
MBNL1	65	202	3.10	60	25	0.416	7.445	NM_207296.1
SMARCA2	65	205	3.15	60	21	0.35	9.0	NM_003070.3
NOTCH3	65	198	3.04	60	50	0.833	3.64	NM_000435.2
NOTCH4	65	208	3.2	60	14	0.233	13.73	NM_004557.3
NOTCH1	65	198	2.93	60	89	1.48	2.05	NM_017617.2
DLEC1-S3	65	102	1.56	60	158	2.63	0.59 1.68	NM_007337.2
CDC2L2	65	81	1.24	60	133	2.21	0.56 1.82	NM_024011.2
CCNI	65	81	1.24	60	136	2.26	0.548 1.82	NM_006835.2
MAPK12	65	30	0.05	60	212	3.35	0.1416/7.06	NM_002969.3
HHATL	65	101	1.55	60	97	1.616	0.956 1.03	NM_020707.2
Hairless	65	20	0.307	60	176	2.933	0.104 9.54	NM_019089.3

Tabla 19. Niveles de expresión de los genes en NIC III.

Nombre del gen	Lesión			Normal			Valor relativo (lesión/normal) ratio		Numero de acceso NCBI
	Valor absoluto G3DPH	Valor absoluto Gen (lesión)	Ratio	Valor absoluto G3DPH	Valor absoluto Gen (Normal)	Ratio			
DLL1	65	219	3.36	60	11	0.183	18.3		NM_005618.2
SEL1	65	180	2.76	60	10	0.166	16.62		NM_005065.3
E(sp1)	65	190	2.92	60	11	0.183	15.95		NM_005078.1
ADAM 7	65	198	3.04	60	25	0.416	7.29		NM_003817.1
ASCL3	65	201	3.09	60	17	0.283	10.91		NM_020646.1
GAS1	65	186	2.86	60	16	0.266	10.75		NM_002048.1
NUMB	65	201	3.09	60	15	0.25	12.36		NM_001005745.1
SPARCL1	65	205	3.15	60	15	0.25	12.6		NM_004684.3
MIB1	65	176	2.70	60	14	0.233	11.58		NM_020774.2
MAML1	65	210	3.23	60	19	0.316	10.22		XM_001126853.1
HES 2	65	224	3.44	60	12	0.2	17.23		NM_019089.3
BRD7	65	178	2.73	60	11	0.183	14.91		NM_013263.2
MTA1	65	201	3.09	60	6	0.1	30.9		NM_004689.2
SNAI1	65	156	2.4	60	8	0.133	18.004		NM_005985.2
CDC25A	65	186	2.86	60	6	0.1	28.6		NM_001789.2
CCAR1	65	186	2.86	60	5	0.083	35.75		NM_018237.2
TP53	65	175	2.69	60	91	1.51	1.96		NM_000546.2
PIM3	65	204	3.13	60	23	0.383	8.17		NM_001001852.2
SERPINA6	65	206	3.16	60	20	0.333	9.48		NM_001756.3
PTTG1	65	204	3.13	60	12	0.2	15.65		NM_004219.2
HIC1	65	200	3.07	60	9	0.15	20.46		NM_006497.2
PA2G4	65	192	2.95	60	14	0.233	12.64		NM_006191.1
SART2	65	210	3.23	60	18	0.3	10.76		NM_013352.1
v-myc	65	198	3.04	60	6	0.1	30.4		NM_005378.4
MBNL1	65	190	2.92	60	19	0.316	9.22		NM_207296.1
SMARCA2	65	195	3	60	21	0.35	8.57		NM_003070.3
NOTCH3	65	193	2.96	60	50	0.833	3.55		NM_000435.2
NOTCH4	65	208	3.2	60	12	0.2	16		NM_004557.3
NOTCH1	65	217	3.33	60	78	1.5	2.5		NM_017617.2
DLEC1-S3	65	102	1.56	60	158	2.63	0.59 1.68		NM_007337.2
CDC2L2	65	81	1.24	60	133	2.21	0.561 1.84		NM_024011.2
CCNI	65	81	1.24	60	136	2.26	0.54 1.82		NM_006835.2
MAPK12	65	30	0.461	60	208	3.46	0.133 7.50		NM_002969.3
HHATL	65	101	1.55	60	95	1.58	0.98 1.01		NM_020707.2
Hairless	65	20	0.307	60	176	2.93	0.104 9.54		NM_019089.3

Tabla 20. Niveles de expresión de genes en cáncer invasor.

Nombre del gen	Lesión			Normal			Valor relativo (lesión/normal)		Número de acceso NCBI
	Valor absoluto G3DPH	Valor absoluto gen (lesión)	Ratio	Valor absoluto G3DPH	Valor absoluto gen (Normal)	Ratio	Ratio	Ratio	
DLL1	66	196	2.96	63	14	0.222	13.45		NM_005618.2
SEL1	66	175	2.65	63	10	0.158	16.77		NM_005065.3
E(sp1)	66	171	2.59	63	11	0.174	14.88		NM_005078.1
ADAM 7	66	210	3.18	63	25	0.396	8.03		NM_003817.1
ASCL3	66	195	2.95	63	8	0.126	23.41		NM_020646.1
GAS1	66	160	2.42	63	16	0.253	9.53		NM_002048.1
NUMB	66	190	2.87	63	19	0.301	9.53		NM_001005745.1
SPARCL1	66	188	2.84	63	15	0.238	11.93		NM_004684.3
MIB1	66	176	2.66	63	14	0.222	11.98		NM_020774.2
MAML1	66	208	3.15	63	19	0.301	10.46		XM_001126853.1
HES 2	66	176	2.66	63	12	0.190	14		NM_019089.3
BRD7	66	178	2.69	63	11	0.174	15.45		NM_013263.2
MTA1	66	201	3.04	63	6	0.095	32		NM_004689.2
SNAI1	66	142	2.15	63	8	0.120	17.07		NM_005985.2
CDC25A	66	208	3.2	63	6	0.095	33.68		NM_001789.2
CCAR1	66	176	2.66	63	5	0.079	33.74		NM_018237.2
TP53	66	176	2.66	63	91	1.37	1.94		NM_000546.2
PIM3	66	212	3.21	63	23	0.365	8.79		NM_001001852.2
SERPINA6	66	212	3.21	63	20	0.317	10.12		NM_001756.3
PTTG1	66	160	2.42	63	20	0.317	7.63		NM_004219.2
HIC1	66	188	2.84	63	9	0.142	20		NM_006497.2
PA2G4	66	100	1.51	63	14	0.222	6.80		NM_006191.1
SART2	66	160	2.42	63	18	0.285	8.52		NM_013352.1
v-myc	66	198	3	63	6	0.095	31.57		NM_005378.4
MBNL1	66	194	2.93	63	21	0.333	8.79		NM_207296.1
SMARCA2	66	192	2.90	63	21	0.333	8.73		NM_003070.3
NOTCH3	66	198	3	63	8	0.126	23.80		NM_000435.2
NOTCH4	66	206	3.12	63	6	0.095	32.84		NM_004557.3
NOTCH1	66	4	0.061	63	101	1.68	0.036	27.54	NM_017617.2
DLEC1-S3	66	102	1.54	63	158	2.50	0.616	1.62	NM_007337.2
CDC2L2	66	81	1.22	63	133	2.11	0.578	1.72	NM_024011.2
CCNI	66	81	1.22	63	190	3.01	0.405	2.46	NM_006835.2
MAPK12	66	35	0.530	63	210	3.33	0.159	6.28	NM_002969.3
HHATL	66	101	1.53	63	115	1.82	0.84		NM_020707.2
Hairless	66	20	0.303	63	176	2.79	0.108	9.20	NM_019089.3

Entre los genes expresados en CaCU se identificaron moléculas ya descritas en otros tipos de cáncer, tal es el caso del gen *HIC1* que es un gen que se ha encontrado hipermetilado en carcinoma hepatocelular y en carcinoma de páncreas, *HIC1* pertenece a la superfamilia de moléculas de adhesión y se ha demostrado su participación en una serie de procesos biológicos que incluyen: la tumorigenesis, en la acción de hormonas esteroides, la señalización de integrinas, diferenciación y apoptosis (Gao ZL, *et al* 2007). *PTTG1* (pituitary tumor-transforming 1) se ha detectado en distintos tumores. Se le ha asociado a proliferación, transformación celular, y apoptosis. Sin embargo, las funciones de *PTTG1* especialmente en el papel de daño inducido al DNA no es claro, pero en líneas celulares de cáncer de mama, se ha observado que un incremento en la expresión de este gen disminuye la apoptosis celular, *PTTG1* se ha propuesto como un marcador molecular para el diagnóstico de cáncer de mama (Lai Y, *et al*, 2007).

Se encontró un fragmento de gen que codifica para la proteína p38-2G4 (*PA2G4*). Se ha reportado que es un gen activo en el control y modulación del ciclo celular, *PA2G4* es una proteína de unión a DNA en células tumorales. En macrófagos murinos se ha clasificado como un gen mitogénico inducible nuevo principalmente en las fases G1 y durante la fase S, y desaparece en la transición de S a G2. Su expresión es conservada para los vertebrados (Radomski N, 1995).

Se encontraron también varios factores de transcripción como *CREBL2* (Elemento de respuesta *AMPc* (*CRE*) de la proteína de unión de tipo-2). Este gen se encuentra en una región en el cromosoma 12p13, flanqueada por los genes *ETV6* y *CDKN1B*, y se ha asociado a neoplasias hematopoyéticas, así como de mama, pulmón y cáncer de ovario. *CREBL2* comparte un 41% de identidad con la proteína de unión de la *CRE* (*CREB*) que codifica para el dominio bZip de *CREB*. El dominio bZip dominio consta de unos 30 aminoácidos, involucrados en la unión del DNA, seguido de dedos de leucina implicados en la dimerización de la proteína. Esto sugiere que *CREBL2* codifica una proteína con capacidad de unión al DNA. Se ha reportado que en tumores malignos *CREBL2* presenta deleciones,

lo que sugiere que *CREBL2* puede actuar como un gen supresor tumores (Thomson DM, *et al*, 2007).

Se identificó un gen reportado por su participación en cáncer, *SMARCA*. Existen dos isoformas, Smarca 2 (Brahma) y Smarca 4, este último está relacionado con *BGR1* y alternativamente ocupan el sitio catalítico de los complejos *SWI / SNF* en la remodelación de la cromatina. Smarca 4 forma parte de mapa oncológico humano reportado por Qinghua Cui en el 2007, existen pocos reportes respecto a este gen. Sin embargo desempeña una función clave en la regulación de los genes de transcripción y en el desarrollo embrionario.

Se encontró la inducción permanente de la proteína TP 53 durante toda la progresión de CaCU. Es interesante señalar que durante el análisis de su secuencia se encontró que el fragmento, presenta cambios puntuales (mutaciones) respecto a la secuencia del gen reportada en la base de datos del NCBI.

También es importante mencionar que se encontró la expresión de la proteína viral *L1* perteneciente al VPH tipo 16.

El gen *FUBP* se encontró inducido en CaCu y activa el elemento de unión de la proteína (*FUSE*) y estimula la expresión de *c-myc* en células no diferenciadas, Se ha demostrado que *FUBP* puede funcionar como DNA-helicasa ATP-dependiente, cuya función puede ser la unión a una secuencia de DNA específica para modular transcripción. El factor de transcripción puede actuar recíprocamente con criterio selectivo con una proteína o un complejo macromolecular, lo que influye sobre la transcripción de RNA de mensajero (mRNA) y ciertos pequeños RNA nucleares (snRNAs).

Se ha reportado *FUBP* regula una amplia variedad de proteínas, proteínas ribosomales, factores de transcripción y los modificadores post-transcriptional de mRNA. Otros genes identificados fueron *SART2*: Es una proteína codificada por este gene es un antígeno de rechazo de tumor. Este antígeno posee epítopes tumorales capaces de estimular HLA-A24- y linfocitos T citotóxicos específicos de tumor en pacientes con cáncer y puede ser útil para la

inmunoterapia específica. Este producto génico es localizado en el retículo endoplásmico. Se han reportado en este gene dos isoformas que codifican para la misma proteína.

En el grupo de genes inducidos se identifico la *Serpina 6*: La familia de las serpinas se compone de cientos de proteínas estructuralmente homólogas que están presentes tanto en organismos eucariotas yprocariotas. Entre sus miembros figuran inhibidores de proteasas de serina, en el humanos se han reportado 35 genes que codifican para serpina, y han sido agrupados en 9 subfamilias, que contienen subfamilias dependiendo de la localización cromosómica. Una gran cantidad de estas serpinas se han detectado en el cerebro, y se ha reportado su participación en el desarrollo de tumores cerebrales. Otro tipo de *serpinas* se han reportado en páncreas. Es interesante señalar que en este trabajo se detectó la sobreexpresión de la serpina en todas las etapas de progresión de CaCU.

Cdc-7 es una cinasa es una proteína requerida para la replicación del DNA que está directamente involucrada en el control del ciclo y proliferación celular. Se ha demostrado que actúa en el ciclo celular justo antes del inicio de la replicación y es necesaria para la activación del origen de replicación en la fase S. (Hiroyuki Kumaga, 1999). *Cdc7*, además está implicado en el mantenimiento de la integridad del genoma cuando se expresa en niveles constitutivos, una desregulación de este gen, provoca desordenes en el ciclo celular (Pedro Jares, 2000).

En este trabajo se encuentran además genes relacionados con la vía de señalización Notch entre ellos detectamos cambios en el nivel de expresión de los receptores *Notch-1*, *Notch-3*, y *Notch-4*. Estudios por el grupo de Tsakonas *et al* (1993) reportaron expresión aumentada del receptor *Notch-1* en cáncer cervix. En este trabajo encontramos la expresión aumentada de *Notch-1* en los primeros estadios de cáncer cervical presentando un mayor grado de expresión en NIC III, y disminuyó casi por completo cuando es un cáncer invasivo, (Figuras 27 c y 28 a). En el análisis de secuenciación una de las clonas secuenciadas perteneciente a la genoteca inducida de NIC III, y otra clona de la genoteca de genes reprimidos de

CaCU invasivo mostró similitud también con este gen, se intensificó el estudio de expresión de este gen para descartar un falso positivo de la técnica, de tal forma que este gen fue seleccionado para su confirmación.

En el caso de *Notch-3* y *Nocth-4* se encontró que para ambos receptores se incrementa su expresión desde etapas tempranas de CaCU y mantienen su expresión hasta el estadio de cáncer invasivo. (figuras 27, y 28 c y d). *Notch-4* presentó además un ligero incremento en la progresión de las lesiones. Estos genes han sido descritos en otras enfermedades, su participación en CaCU.

Se identificó también el ligando: Delta-like (*DLL-1*). *DLL-1* es el homólogo humano del ligando Delta de Notch en *Drosophila* y es un miembro de la familia delta/serrate/jagged. *DLL1* desempeña un papel en la mediación del destino celular durante la hematopoyesis. También desempeña un papel en la comunicación célula-célula. Interactúa además con la proteína *MAGI1* y es un miembro perteneciente a la familia *MAGUK* (membrana-associated guanylate kinase), que participan en el ensamblaje de complejos multiproteicos en las regiones de contacto de célula de célula como se ha descrito en la vía de señalización Notch. Se encontraron algunas de sus enzimas proteolíticas como *ADAM-1,7* y *10*.

Pertencen a la familia de metaloproteasas, estas enzimas *ADAM* pueden actuar como desintegrinas y/o metalotropeasas que cortan la región juxtamembranal de proteínas celulares transmembranales y separan la región extracelular, mecanismo que ha sido bien establecido en la vía Notch,

En el caso específico de *ADAM10*, es responsable de llevar a cabo cortes proteolíticos en algunas proteínas de superficie incluyendo heparinas unidas al factor de crecimiento epidérmico, heparina-A2, de forma constitutiva regula los cortes de la alfa y gamma-secretasa en la proteína APP (amyloid precursor protein). Se ha reportado que *ADAM* está involucrada en los cortes de las moléculas de adhesión tipo L1 localizadas en la superficie celular y en la liberación de vesículas membranosas que tienen actividad de proteasas. Se ha encontrado sobre expresada en cáncer de colon inducida por L1-CAM, donde se observó que

cuando se eleva el nivel de ADAM 10 se activa el fenómeno de metástasis tanto en células de colon como en células hepáticas (Gavert N, *et al*, 2007). Se ha propuesto que bloqueando L1-CAM o bien ADAM 10 puede usarse como posible blanco terapéutico contra el cáncer de colon. Se ha reportado además sobre-expresión en carcinoma oral de células escamosas.

Se encontró identidad con un gen que codifica para la proteína *NUMB*, las cuales se ha reportado que inhiben la inducción dependiente de la región activa del receptor Notch (porción intracitoplasmática) en proteínas anti apoptóticas, esta regulación es más bien una acción antagonista a la vía de Notch (Spana EP, *et al.*, 1996 and Harper JA, 2003).

Otros genes identificados son: *Mib* (mind bomb), pertenece a la familia Ubiquitina E3 ligasa, Mib interactúa directamente con los ligandos de Notch, y recientemente se demostró su participación en la unión y activación de Delta o Jagged a Notch. Experimentos realizados en el pez zebra demostraron que alteraciones de Mib resulta en la generación de diversos fenotipos neurológicos, y podría estar implicado en la diferenciación celular en el caso de CaCU. *MAML-1*, es un co-activador nuclear que se activa cuando la región intracitoplasmática de Notch se transloca al núcleo al unirse a factores de transcripción tipo CSL y potencian la activación de genes blanco como *HES* (hairy/enhancer of Split), que pertenece a una familia de factores de transcripción, que modulan negativamente a genes como los de la familia achaete-scute, que inducen la diferenciación neuronal (Hajdu M, *et al*, 2007), y que también se encontró sobre regulado en cáncer cervica. *TLE3*, pertenecen a una familia de proteínas de co-represores que son evolutivamente conservadas, juegan un papel fundamental en el desarrollo celular e Intervienen en diversas vías, incluyendo inhibición lateral, determinación del sexo, y en la formación y desarrollo ventral.

Esta familia de proteínas, contiene dos dominios altamente conservados que son exclusivos de esta familia. Contienen también una región variable que consta de sitios para la unión de *cdc2*, *CKII*. Las proteínas *TLE*, carecen de dominio de unión al DNA, sin embargo son reclutados por proteínas represoras que se unen al DNA y pueden formar grandes complejos co-represores a través de sus dominios

conservados, uno de sus dominios es capaz también de reclutar deacetilasas de histonas lo que sugiere que este es un co-represor de la transcripción.

Para estos datos se hizo un análisis estadístico con el software Stargrafic 5.0, y las diferencias mostradas con respecto al control tejido sano son significativas con un valor de $p= 0.0005$, este mismo análisis se hizo a los genes entre los diferentes grados de progresión, solo algunos presentan diferencia significativa, y se proponen como candidatos para utilizarse como marcadores moleculares para diagnosticar el grado de lesión, los genes que no presentan diferencia significativa, su sobre-expresión es constante en todas las etapas de progresión, pueden servir como blancos terapéuticos.

Se ha descrito mucho sobre la posible regulación de genes en cáncer, Qinghua Cui y colaboradores en el 2007, reportaron el posible mapa bioinformático de regulación en cáncer humano, en el que se agrupa a los genes descritos en cualquier tipo de cáncer en tres regiones principales: región p53, región Ras, y región TGF β . En este mapa aparecen algunos genes reportados en otro tipo de cáncer pero no en CaCU. Como BRCA2, Gelsolin, STAT1, MYT 1, CDC25, entre otros.

En la Tabla 21, se presenta el análisis de los genes relacionados con cáncer

Tabla 21. Perfil de expresión de genes identificados en la progresión de CaCU.

Gen	NIC I	NIC II	NIC III	CaCU Invasivo	Diferencia significativa
HIC 1	19.26	27.29	20.26	20	*
PTTG1	15.62	17.4	15.65	7.63	*
PA2G4	12.47	12.47	12.64	6.80	*
CREBL2	11.5	22.85	15.65	15.22	**
SMARCA	9.0	9.0	8.57	8.73	**
SART2	8.68	8.68	10.76	8.52	**
SERPINA	9.0	10.15	9.48	10.12	**
TP53	1.91	1.96	2.03	2.03	**

* Hay diferencia significativa, $P=0.0005$

** No hay diferencia significativa

En la tabla 22, se presenta el mismo análisis de los genes relacionados con la vía de señalización Notch.

Tabla 22. Perfil de expresión de genes identificados en la progresión de CaCU, relacionados con la vía Notch.

Gen	NIC I	NIC II	NIC III	CaCU Invasivo	Diferencia significativa
Notch-1	1.61	2.05	2.5	- 27.54	*
Notch-3	1.01	3.64	3.55	23.80	*
Notch-4	7.45	13.73	16	32.84	*
DLL-1	8.3	12.40	18.3	13.45	**
ADAM	7.41	14.37	7.29	8.03	**
NUMB	13.04	16.55	12.36	9.53	**
Mib	7.37	11.58	11.58	11.98	**
MAML-1	7.3	9.14	10.22	10.46	**
HES	11.01	15.46	17.23	14	**
TLE3	14.09	14.37	15.95	14.88	**
SEL 1	11.01	17.40	16.82	16.77	**

* Hay diferencia significativa, $P = 0.0005$

** No hay diferencia significativa

11. RT-PCR de los genes Notch-1, 2, 3 y 4.

Para confirmar el análisis Northern se realizaron amplificaciones de los genes Notch-1, 2, 3 y 4. Notch-1 presenta un incremento en el nivel de expresión en los 3 primeros estadios de cáncer cervical y disminuye casi por completo cuando es un cáncer invasor, (Figura 24 a). Contrario a lo que se observó con Notch-1, Notch-2 disminuye su expresión con la progresión de los estadios (Figura 24 b). En el caso de Notch-3 y Notch-4 se encontró que ambos incrementan su expresión desde etapas tempranas de CaCU y mantienen este incremento hasta cáncer invasor. (Figuras 24 c y d). Notch-4 presentó además un ligero incremento conforme avanza la lesión.

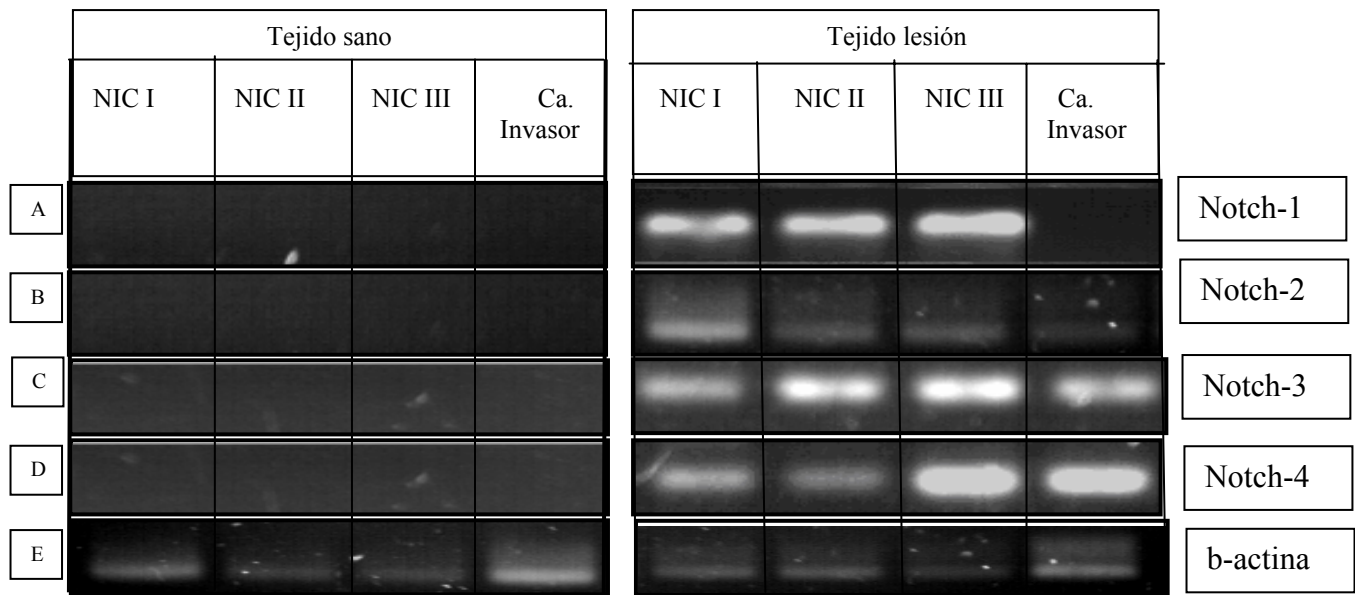


Figura 24. RT-PCR de los genes Notch-1, 2,3 y 4 en biopsias de cáncer cervicouterino en los diferentes estadios.

VI. CONCLUSIONES.

En este trabajo se presentó un perfil del transcriptoma de CaCU en los diferentes estadios de progresión, el transcriptoma está conformado por 1800 fragmentos de genes agrupados en 4 genotecas sustractivas 2 en estadio NIC III, y dos de CaCU invasivo (genes inducidos y genes reprimidos en cada caso) .

En este estudio en las diferentes etapas de progresión se identificaron algunos genes candidatos relacionados con la progresión de NIC I a CaCU invasor.

El estudio mediante macroareglos reveló que 175 genes se encuentran inducidos, 62 genes se encuentran reprimidos, 182 genes presentan cambio ligero pero significativo en su nivel de expresión, y 31 genes presentaron una expresión constitutiva.

Los genes fueron considerados como sobre-regulados o bien como reprimidos si su nivel de expresión en CaCU era de al menos 7 veces respecto a su control tejido sano, y se consideró con cambio en nivel de expresión cuando esta está diferencia fue menor de 2 ordenes de magnitud.

En los genes sobre-regulados la función de 15 genes no ha sido reportada, 52 genes han sido descritos en otro tipo de enfermedades pero se desconoce su participación en cáncer, 16 genes no mostraron identidad con otros genes en el análisis hecho en la base de datos del NCBI, 28 genes se han descrito en otros organismos, y 64 de estos genes se ha descrito alguna función en algún tipo de cáncer.

Con respecto a los que se reprime su nivel de expresión se encontró que 11 genes no han sido descritos en cáncer, y resto está relacionado con otro tipo de enfermedades.

De los genes sobre-regulados se seleccionaron *DDL1*, *SEL1,E(sp1)*, *ADAM7*, *ASCL3*, *GAS1*, *NUMB*, *SPARCL1*, *MIB1*, *MAML1*, *HES2*, *BRD7*, *MTA1*, *SNAI1*, *CDC25*, *CCAR1*, *TP53*, *PIM3*, *SERPINA 6*, *PTTG1*, *HIC1*, *PA2G4*, *SART2*, *v-myc*, *MBNL1*, *SMARCA2*, *Notch-1,3 y 4*; y de los genes reprimidos se seleccionaron *DLEC1-S3*, *CDC2L2*, *CCNI*, *MAPK12*, *HHATL* y *Hairless* para ser evaluados por análisis tipo Northern, se identificaron genes que aumentan su expresión desde etapas tempranas y que aumentan conforme avanza el grado de lesión, tal es el

caso del gen *HES 2* por lo que este gen podría ser un buen candidato para utilizarse como marcador molecular de progresión de CaCU. *HES 2* no se detectó en tejido sano, resultaría interesante evaluar si la proteína codificada por este gen puede detectarse en sangre periférica.

Otro gen candidato para este propósito es *CDC25A* que está involucrado en el desarrollo del ciclo celular, aparte de que puede ser un excelente candidato como marcador molecular, puede ser un posible blanco terapéutico para bloquear el proceso de desarrollo de cáncer.

Serpina 6 solo se expresa en el tejido lesión, este gen es interesante de estudiar y elucidar a fondo que tipo de serpina es la que se está expresando en CaCU, no existen reportes de serpinas en este tipo de cáncer, la identidad que presento con serpina 6 fue del 60 % pero es con el único gen que muestra similitud significativa. Con respecto a los genes implicados en la vía señalización Notch, se encontraron 13 genes (*Notch-1, 3 y 4, DLL1, SEL1, E(sp1), ADAM, NUMB, MIB, MAML1, HES 2, BRD7, SPARCL-1, HHATL, Hairless*) relacionados con esta vía algunos de los cuales aun no se conoce de forma certera como participan en la activación o en la regulación de la vía Notch.

Los genes *Notch-3* y *4* habían sido descritos en algunas enfermedades neurodegenerativas pero no en cáncer cervicouterino, y *Notch-1*, que ya había sido ampliamente en CaCU. En los estudios anteriores realizados por otros autores se describe a *Notch-1* sobre-regulado, Zagouras (2001), describió a este gen como reprimido, pero solo hizo el análisis en CaCU Invasor, este resultado causo polémica porque era totalmente diferente a lo esperado, este trabajo es el primer estudio donde se evalúa el nivel de expresión en los diferentes estadios de progresión de cáncer cervical, donde se confirma la sobre-expresión de *Notch-1* en etapas pre-invasivas, y la represión en un CaCU invasor, este resultado confirma algunas hipótesis propuestas por otros investigadores donde proponen que *Notch-1* participa en el desarrollo del fenotipo neoplásico, pero no es el único responsable, probablemente ayuda a mantener a la célula en arresto celular, en lo que se encienden otros genes, posiblemente *Notch-3* y *4* estén implicados en el mantenimiento de este fenotipo dado que se encuentran sobre-expresados

permanentemente, la expresión de los genes Notch-1 al 4 fue demostrada también por RT-PCR, demostrando además que Notch-2 se encuentra sobre-expresado desde etapas tempranas de CaCU, pero su nivel de expresión disminuye conforme avanza el grado de lesión.

Es posible SMARCA, HIC 1, y PTTG1, puedan estar relacionados también con la vía de señalización Notch dado que estos genes también están implicados en tumorigenesis, diferenciación celular y apoptosis.

En este trabajo, se presentó el perfil del transcriptoma de CaCU en los diferentes estadios de progresión, sienta las bases para estudios posteriores sobre cómo pueden estar interactuando los genes, y sobre la regulación de las diferentes vías en las que se encuentran implicados los genes identificados.

En este trabajo se encontró la presencia de VPH-16, en el 44% de los casos diagnosticados como positivos, la prevalencia de la presencia de VPH fue mayor en las etapas posteriores a NIC II.

Con respecto a la presencia de VPH en tejido sano, se detectó en un 12% de las muestras analizadas, presentándose en pacientes con estadios de NIC III, y mayoritariamente en CaCU Invasivo.

VII. Perspectivas.

1. Secuenciar las clonas faltantes de las genotecas sustractivas.
2. Realizar northern blot y RT-PCR de los genes que faltan por analizar.
3. Obtener genes completos, mediante RACE 5' y 3'.
4. Estudiar más a detalle el tipo de serpina que expresa en CaCU, dado que no han sido descritas en este tipo de cáncer.
5. Hacer análisis de interacción entre las proteínas a las que codifican estos genes por sistema de dos híbridos.
6. Mediante RNA de interferencia probar los posibles genes que pueden servir como blanco terapéutico.
7. Hacer análisis de TMA's con anticuerpos específicos para las proteínas codificadas por los genes identificados en diferentes tipos de cáncer para tratar de establecer la relación de entre genes que participan en el desarrollo de fenómeno de cáncer y aquellos que son tejido específico.

Referencias.

1. Allenspach E, Maillard I, Aster J, Pear W; Notch signaling; Cancer biology and therapy; 2002; 1: 466-476
2. Artavanis-Tsakonas S, Rand Md, Lake Rj. Notch Signaling: Cell Fate Control And Signal Integration In Development. 1999. Science. 284: 770-776.2.
3. Akopyants, S.N.,Fradkov, A., *et al.* 1998. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 13108-13113.
4. Arango Prado MC, et al. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. Rev Cub Oncol 1997;13(2):126-134.
5. Baak JP, Path FR, Hermsen MA, Meijer G, Schmidt J, Janssen EA: Genomics and proteomics in cancer. *Eur J Cancer* 2007, 39:1199-1215.
6. Berumen CJ; Virus de Papiloma Humano en México. Su asociación con la alta incidencia del cáncer de cerviz; Gac Med Mex; 2003; 139.
7. Bos JL. Ras oncogéne in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-89.
8. Bray SJ, 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Reviews, Nature Publishing Group, 7:778-89.
9. Brison O. Gene amplification and tumor progression BBA 1993; 1155:25-41.
10. Chitnis, A. Why is Delta endocytosis required for effective activation of notch? *Dev. Dyn.* 235, 886–894 (2006).
11. Cisneros Mt, Espinosa R, Pineda Be. Mortalidad Por Cáncer De La Mujer Mexicana. *Salud Publica Mex* 1987; 29:299-312.
12. Bonaldo M. de F, Lennon G, Soares M. B., 1996. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res* 6:791-806.
13. Cortés Gutiérrez E. I., M.A. Rojas Alvarado, R. Reyna Hinojosa, R. Garza Chapa, C.H. Leal Garza, 1995. Algunos Factores Epidemiológicos En El Cáncer Cervicouterino.. *Revista Médica IMSS*, 33:177-182.
14. Chung YC, Mukhopadhyay T, Kim J, et al. Discordant p53 primary head and neck cancers and corresponding second upper aerodigestive tract. *Cancer Res.* 1993;53:1676-83.
15. Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of c-DNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 1986; 47:19-28.
16. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S, 2003. Human papillomaviruses types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br. J. Cancer.* 88:63-73.
17. Chakrabaty O, Krishna S, 2003. Molecular interaction of “high risk” human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J. Biosc.* 28:337-48.
18. Chao A., Wang T., Lai Ch., Overview of microarray analysis of gene expression and its applications to cervical cancer investigation. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007 Dec;46(4):363-73.
19. Croce CM, Erikson J, Tsujimoto Y, Nowell PC. Molecular basis of human B and T cell neoplasia. *Adv Viral Oncol* 1987;7:35-50.

20. Croker B, Hart A. Cancer and programmed cell death. *Genome Biol.* 2003;4(5):318.
21. Crowell PI, Chang Rr, Ren Zb, Elson Ce, Gould Mn. Selective Inhibition Of Isoprenylation Of 21-26-Kda Proteins By The Anticarcinogen D-Limonene And Its Metabolites. *J Biol Chem.* 1991; 266:17679-17685.
22. Crowell PI, Elson Ce, Bailey Hh, Elegbede A, Haag Jd, Gould Mn. Human Metabolism Of The Experimental Cancer Therapeutic Agent D-Limonene. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;35(1):31-37.
23. Di Paolo, J.A., Popescu, N.C., Alvarez, L. y C.D. Woodworth, *Crit. Rev. Oncog.* 4, 337-360, 1993.
24. Denko N., Schindler C., Koong A., Laderoute K., Green C., and Giaccia A., Epigenetic Regulation of Gene Expression in Cervical Cancer Cells by the Tumor Microenvironment. *Clinical Cancer Research*, Vol. 6, 480–487, February 2000.
25. Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ. Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity* 1998; 9: 777-786.
26. Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert P. D., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *PNAS* 93:6025-6030
27. Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol Ther.* 2004 Jan;101(1):1-15.
28. Donnalson Anne, Blow J. Julian The Cdc 7/Dbf4 protein kinase:targeted of the S phase checkpoint?. Jares Pedro,. *EMBO, Report*, 2000.
29. Doorbar, J., Elston, R. C., Naphtine, S. & 9 other authors (2000). The E1E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *J. Virol* 74, 10081-10095.
30. Doorbar J, Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N. Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. *Journal of Virology*, oct. 2003, p. 10186–10201.
31. Elegbede Ja, Elson Ce, Qureshi A, Tanner Ma, Gould Mn. Inhibition Of Dmba-Induced Mammary Cancer By The Monoterpene D-Limonene. *Carcinogenesis* 1984; 5:661-4.
32. Eickhoff, B., Korn, B., *et al.* 2001. Normalization of array hybridization experiments in differential gene expression analysis. *Nucl. Acids.Res.* 27: (22):e33.
33. Elegbede Ja, Elson Ce, Tanner Ma, Qureshi A, Gould Mn. Regression Of Rat Primary Mammary Tumors Following Dietary D-Limonene. *J Natl Cancer Inst.* 1986; 76:323-5.
34. 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.
35. Fortini, M. E. γ -secretase-mediated proteolysis in cell surface-receptor signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 673–684 (2002)
36. Gao ZL, Deblis R, Glenn H, Schwartz LM. Differential roles of HIC-5 isoforms in the regulation of cell death and myotube formation during myogenesis. *Exp Cell Res.* 2007 Nov 15;313(19):4000-14. Epub 2007 Jun 2.

37. Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, Barany F, Paty P, Notterman D, Domany E, Ben-Ze'ev A. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res.* 2007 Aug 15;67(16):7703-12.
38. Gius D, Funk MC, Chuang EY, Feng S, Huettnner PC, Nguyen L, Bradbury CM, Mishra M, Gao S, Buttin BM, Cohn DE, Powell MA, Horowitz NS, Whitcomb BP, Rader JS. Profiling microdissected epithelium and stroma to model genomic signatures for cervical carcinogenesis accommodating for covariates. *Cancer Res.* 2007 Aug 1;67(15):7113-23.
39. Cathie Garnis, Timon PH Buys and Wan L Lam Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Molecular Cancer* 2004, 3:9
40. Grace E. Gray, Robert S. Mann, Efthimios Mitsiadis, Domingos Henrique, Maria-Louisa Carcangiu, Amy Banks, John Ieiman, David Ish-Horowitz, and Spyros Artavanis-Tsakonas; Human Ligands of the Notch Receptor; *American Journal of Patology*; 1999;vol. 154:785-794.
41. Grander D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med Oncol.* 1998 Apr;15(1):20-6.
42. Gridley T. Notch Signaling And Inherited Disease Syndromes. *Hum Mol Genet* 2003; 12:R9-13.
43. Hajdu M, Luttun A, Pelacho B, Burns TC, Chase L, Gutiérrez-Pérez M, Jiang Y, Lenvik T, Vas V, Uher F, Sebestyén A, Verfaillie C. Transcriptional characterization of the notch signaling pathway in rodent multipotent adult progenitor cells. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(4):302-10. Epub 2007 Dec 25.
44. Harper JA, Yuan JS, Tan JB, Guidos CJ; Notch signaling in development and disease; *Clinical Genetics*; 2003; vol. 64:461-472.
45. Hiroyuki Kumaga, Noriko Sato, Masayuki Yamada, Daniel Mahony, Wolfgang Seghezzi, Emma Less, Ken-Ichi Arai, and Hisao Masai. *Molecular and Cellular Biology*, July 1999, p. 5083–5095.
46. Hynes RO, Metastatic Potential: Generic Predisposition of primary tumor or Rare, Metastatic Variants-Or Both?. *Cell*, Vol 113, PP 821-823, 2003.
47. INEGI, Estadísticas vitales, Bóveda de Datos 2006.
48. Joutel, A., and Tournier-Lasserre, E. Notch signalling pathway and human diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 9: 619–625, 1998.
49. Kadesch T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14:506-512.
50. Kauffman AM, Backsch C, Schneider A, Durst M, 2002. HPV induced cervical carcinogenesis molecular basic and vaccine development. *Zentralbl Gynakol* 124:511-24.
51. Klueg, K. M., Parody, T. R. & Muskavitch, M. A. Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol. Biol. Cell* 9, 1709–1723 (1998).
52. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Patología Humana*. Capt 6 pp 185-190. Sexta Edicion McGraw-Hill Interamericana, 1997.

53. Lai Y, Xin D, Bai J, Mao Z, Na Y. The important anti-apoptotic role and its regulation mechanism of PTTG1 in UV-induced apoptosis. *J Biochem Mol Biol.* 2007 Nov 30;40 (6):966-72.
54. Le Borgne, R., Bardin, A. & Schweisguth, F. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* **132**, 1751–1762 (2005).
55. Lazo, 1999. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br. J. Cáncer* 80:2008-18.
56. Lewis, 2004. A situational analysis of cervical carcinoma in Latin America and caribbean. Organización paramericana de la salud. Washington D.C.
57. Lugo T, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogéne products. *Science* 1990; 247:1079-82.
58. Lukyanov, A.K., Launer, A.G., *et al.* 1995. Inverted Terminal Repeats Permit the Average Length of Amplified DNA Fragments to Be Regulated during Preparation of cDNA Libraries by Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry.* 229:198-202.
59. Lukyanov K, Diatchenko L, Chenchik A, Nanisetti A, Siebert P, Usman N, Matz M, Lukyanov S., 1997. Construction of cDNA libraries from small amount of total RNA using the suppression PCR effect. *Biochem Biophys Res Com* 230:285-288.
60. Malkin D, Li PF, Strong LC, Fraumeni JF, *et al.* Germ like p53 mutation in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Nature* 1990;250:1233-38.
61. Maltzman Th, Hurt Lm, Elson Ce, Tanner Ma, Gould Mn. The Prevention Of Nitrosomethylurea-Induced Mammary Tumors By D-Limonene And Orange Oil. *Carcinogenesis.* 1989; 10:781-3.
62. Miele L, Osborne B. Arbiter Of Differentiation And Death: Notch Signaling Meets Apoptosis. *J Cell Physiol* 1999; 181:393-409.
63. Milner J, Medcalf A. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type, drives the wild type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991; 65:765-74.
64. Milner, J. J., Cecchini, E and Dominy, J. P. 1995. A Kinetic model for subtractive hybridization. *Nucl. Acids. Res.* 23: (1): 176-187.
65. Mumm, J. S. & Kopan, R. Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* **228**, 151–165 (2000).
66. 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.
67. Muñoz N, Bosch Fx, De Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah Kv, Snijders Pj, Meijer Cj. Epidemiologic Classification Of Human Papillomavirus Types Associated With Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:518-527.
68. Nickoloff Bj, Osborne Ba, Miele L. Notch Signaling As A Therapeutic Target In Cancer: A New Approach To The Development Of Cell Fate Modifying Agents. *Oncogene* 2003; 22:6598-6608.
69. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 2003 Apr;10(4):431-42.
70. Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B., and Bernstein, I. D. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 14: 143–150, 2003.

- 8.
71. Parkin, D. M., E. Laara, C. S. Muir. Estimates Of The Worldwide Frequency Of Sixteen Major Cancers In 1980. *Int. J. Cancer* 1988; 41:184-197.
 72. Pear Ws, Aster Jc. T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma: A Human Cancer Commonly Associated With Aberrant Notch1 Signaling. *Curr Opin Hematol* 2004; 11:426-433.
 73. Pearson PL, Van der Luijt RB. The genetic analysis of cancer. *J Intern Med.*1998 Jun;243(6):413-7.
 74. Piña P, Hernandez D, Lopez G, Perez C, Lozano M, González J, Cruz F, Salcedo M. Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16, 1041–1047.
 75. Planificación de programas apropiados para la prevención del cáncer cervicouterino PPAPCaCU. 3ª edición. Path-OPS. 2005. p7-8
 76. Qi, H. *et al.* Processing of the notch ligand Delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283, 91–94 (1999).
 77. Qinghua Cui, Yun Ma, Maria Jaramillo, Hamza Bari, Arif Awan, Song Yang, Simo Zhang, Lixue Liu, Meng Lu, Maureen O'Connor-McCourt, Enrico O Purisima and Edwin Wang. *Molecular Systems Biology* 3; Article number 152, 2007.
 78. Radtke F, Raj K. The Role Of Notch In Tumorigenesis: Oncogene Or Tumour Suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003; 3:756-767.
 79. Radomski N, Jost E. Molecular cloning of a murine cDNA encoding a novel protein, p38-2G4, which varies with the cell cycle. *Exp Cell Res.* 1995 Oct;220(2):434-45.
 80. Rebrikov, D.V., Britanova, O.V. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucl. Acids.* 2000. Res. 28:20).
 81. Renan MJ: How many mutations are required for Tumorigenesis. Implications for human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-146.
 82. Renan MJ: How many mutations are required for Tumorigenesis. Implications for human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-146.
 83. Rikimaru K, Tadokoro K, Yamamoto T, et al. Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1992;14:8.
 84. Rothenberg ME, Jan YN. Salvador: the persistence of proliferation. *Cancer Cell.* 2002 Sep;2(3):171-3.
 85. Runzi Qi, Huazhang An, Yizhi Yu, Minghui Zhang, Shuxun Liu, Hongmei Xu, Zhenghong Guo, Tao Cheng, and Xuetao Cao. Notch1 Signaling Inhibits Growth of Human Hepatocellular Carcinoma through Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Cancer Research* 63, 8323–8329, december 1, 2003.
 86. 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
 87. Santos L, León MF, Marino E,. "Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer (Notch signaling and new strategies for cancer therapy)". *Salud pública de México.* 2006 ;48 :155-165.

88. Santos Eugenio, *Biología Molecular del cáncer: del laboratorio a la clínica*, 2007, Real Academia de Medicina de Salananca, España.
89. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol*. 2000 Jan;12(1):82-8.
90. Schwab M. Oncogéne amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol*. 1999 Aug;9(4):319-2
91. Spana EP, Doe CQ. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 1996; 17:21-26.
92. Shirasawa, H., A. Tomita, K. Kubota, T. Kasai, S. Sekiya, H. Takamizawa, B. Simizu. Detection Of Human Papillomavirus Type 16 Dna And Evidence For Integration Into Cell Dna In Cervical Dysplasia. *J. Gen. Virol*. 1986; 67: 2011-2015.
93. Schiffman M, CastleP, Jeronimo J, Rodriguez A, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007; 370: 890–907.
94. Shou, J., Ross, S., Koeppen, H., de Sauvage, F. J., and Gao, W. Q. Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res.*, 61: 7291–7297, 2001.
95. Song LI, Vijaya Chaturvedi, Joaquina Mascarenhas, Sanne Weijzen, W. Martin Kast, Leticia Santos, Alfredo Loredó, Todd Golde, Jian-Zhon Qin, Brian J. Nickoloff, And Lucio Miele. Endogenous Notch-1 Inhibits Apoptosis In Cervical Cancer Cells By Non-Transcriptional Activation Of Nf-Kb Via The Pi3 Kinase-Akt Pathway. *Cancer Research* 2005 (Sometido).
96. Sriuranpong, V., Borges, M. W., Ravi, R. K., Arnold, D. R., Nelkin, B. D., Baylin, S. B., and Ball, D. W. Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.*, 61: 3200–3205, 2001.
97. Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., and Scadden, D. T. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal *in vivo* and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*, 99: 2369–2378, 2002.
98. Steinau M., Lee D., Rajeevan M., Vernon S., Ruffin M., and Unger E. Gene expression profile of cervical tissue compared to exfoliated cells: Impact on biomarker discovery. *BMC Genomics* 2005, 6:64.
99. Syrjänen, K., Syrjänen, S. *Papillomavirus Infections In Human Pathology*. J. Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.; 2000.
100. Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Honjo T, Et Al. Physical Interaction Beteen A Novel Domain Of The Receptor Notch And The Transcription Factor Rbp-Jk/Su(H). *Curr Biol* 1995; 5:1416-1423.
101. Tapia Conyer R. Sarti E, Kuri P, Ruíz-Matus C, Velázquez O, et al. “Cancer cervicouterino”. En Roberto Tapia Conyer, editor. *El Manual de Salud Pública*. México: Intersistemas, 2003;pp735-754
102. Thorland Ec, Myers SI, Gostout Bs, Smith Di. Common Fragile Sites Are Preferential Targets For Vph16 Integrations In Cervical Tumors. *Oncogene*. 2003; 22:1225-1237.
103. Thomson DM, Herway ST, Fillmore N, Kim H, Brown JD, Barrow JR, Winder WW. AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylates Transcription Factors of the CREB Family. *J Appl Physiol*. 2007 Dec 6 [Epub ahead of print].

104. Tsuda H, Ohshima Y, Nomoto H, Fujita K, Matsuda E, Iigo M, Takasuka N, Moore Ma. Cancer Prevention By Natural Compounds. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004; 19:245-263.
105. Valdez M, Hernández S, Sánchez M, López- Revilla R. División de Biología Molecular, IPICYT, 78216 San Luis Potosí, SLP. 2º Congreso Nacional de Química Médica
106. Veeraraghavalu K, Pet M, Kumar R, Nair P, Rangarajan A; Papillomavirusmediated neoplastic progression is associated with reciprocal changes in Jagged1 and manic Fringe expression linked to Notch activation; *Journal Virology*; 2004; 78: 8687.
107. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988, 319:525-532.
108. 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.
109. Wattenberg Lw, Coccia Jb. Inhibition Of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone Carcinogenesis In Mice By D-Limonene And Citrus Fruit Oils. *Carcinogenesis.* 1991; 12:115-7.
110. Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S. M., Zlobin, A., Osborne, B. A., Gottipati, S., Aster, J. C., Hahn, W. C., Rudolf, M., Siziopikou, K., Kast, W. M., and Miele, L. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat. Med.*, 8: 979–986, 2002.
111. Weijzen S, Zlobin A, Braid M, Miele L, Kast Wm. VPH16 E6 And E7 Oncoproteins Regulate Notch-1 Expression And Cooperate To Induce Transformation. *J Cell Physiol.* 2003; 194:356-62.
112. Weinberg RA. How cancer Arises. *Scientific American.* 1996;275:62-6.
113. Weng Ap, Nam Y, Wolfe Ms, Pear Ws, Griffin Jd, Blacklow Sc, Et Al. Growth Suppression Of Pre-T Acute Lymphoblastic Leucemia Cells By Inhibition Of Notch Signaling. *Mol Cell Biol* 2003; 23:655-664.
114. Werness, B.A., Levine, A.J. y P.M. Howley, *Science* 248, 76-79, 1990.
115. Wong Y., Selvanayagam E., Wei N., Porter J., Vittal R., Hu R., Lin Y., Liao ., Shih J., Cheung T., Lo K., Yim S., Yip S., Ngong D., Siu N., Chan L., Chan S., and Chung T. Expression Genomics of Cervical Cancer: Molecular Classification and Prediction of Radiotherapy Response by DNA Microarray. *Clinical Cancer Research.* Vol. 9, 5486–5492, November 15, 2003
116. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997; 80 (8 Suppl): 1529-1537.
117. Wu YJ, Rao Yi; Fringe: defining borders by regulating the Notch pathway; *Neurobiology*; 1999; 537
118. Wwww.Ssa.Gob.Mx28. Zlobin A, Jang M, Miele L. Toward The Rational Design Of Cell Fate Modifiers: Notch Signaling As A Target For Novel Biopharmaceuticals. *Curr Pharm Biotechnol.* 2000; 1:83-106.

119. Yang, G.P., Ross, D.T., *et al.* 1999. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*. 27:1571-1523.
120. Yanagawa, S., Lee, J. S., Kakimi, K., Matsuda, Y., Honjo, T., and Ishimoto, A. Identification of Notch1 as a frequent target for provirus insertional mutagenesis in T-cell lymphomas induced by leukemogenic mutants of mouse mammary tumor virus. *J. Virol.*, 74: 9786–9791, 2000.
121. Yokota J, Sugimura T. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J*. 1993 Jul;7(10):920-5.

ANEXO I.
(Secuencias de oligonucleótidos.)

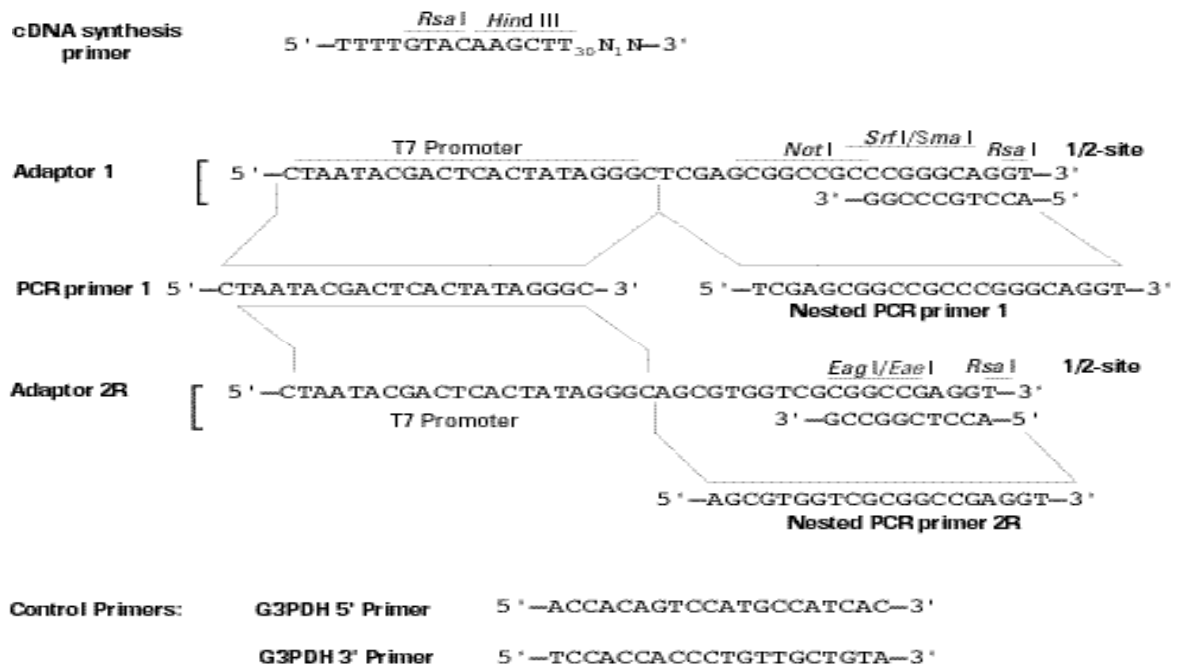
Oligonucleotidos para amplificar VPH.

Gen	5' -----> 3'	Tamaño molecular
E2 VPH-16	S: GACTGGATCCATGGAGACTCTTTGCCAACG A: GACTGAATTCCATCATATAGACATAAAATCCAG	900 pb
E6 VPH-16	S: GACCCAGAAAGTTACCACAG A: GACCCAGAAAGTTACCACAG	450 pb
E7 VPH-16	S: ATGACAGCTCAGAGGAGGAG A: TCATAGTGTGCCCATTAACAG	150 pb
MY 09-II	S: TCCATGGTCGTTTCGAAGTCTTAT A: TCGGATTGCGCATTGACGTACGTTATT	500 pb

Oligonucleotidos para amplificar genes Notch.

Gene	5' -----> 3'	Tamaño molecular
Not ch-1	S: GGTCAATGCGAGTGGC A: GGCAGCAAGGCTACTGTG	153 pb
Notch .2	S: ACTATGAAAGAGGCTGAC A: TCATTCCTTCTATGGCTG	153 pb
Notch .3	S: ATTCTGCCATAAGGCTGGG A: GGGCAGATGTATGCATTCCT	247 pb
Notch .4	S: GGGTCTGACCACTGAGACAC A: CAGTGAGAGCTCTGAGGGTC	115 pb
β -act ina	S: GGGTCAGAAGGATTCCTATG A: GGTCTCAAACATGATCTGGG	238 pb

Oligonucleotidos para PCR de Hibridación sustractiva.



ANEXO II (PROCOLOS)

Extracción de DNA genómico (Ultra Clean, tissue DNA isolation kit,) MO BIO laboratorios

1. En un tubo con 2 ml de solución de cuentas se adicionó 1 mg de tejido.
 2. Se sujetó el tubo horizontalmente al vortex y se agitó a velocidad máxima por 10 min.
 3. Se centrifugó por 1 min. a 10 000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
 4. Se adicionó 450 μ l de solución TD1 y le dió vortex por 5 min.
 5. Se transfirieron 600-650 μ l de la muestra a una minicolumna y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min. se descartó el líquido filtrado y se agregó el resto de la muestra en la columna y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min. se descartó el filtrado.
 6. Se adicionaron 400 μ l de la solución TD2 y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min. se descartó el filtrado
 7. Se centrifugó de nuevo por 1 min a 10,000 rpm para remover el resto de la solución TD2.
 8. La columna libre de solución TD2 se pasó a un tubo nuevo.
 9. Se adicionaron 50 μ l de solución TD3 sobre el centro de la columna y se centrifugó por 1 min. a 10,000 rpm
 11. Este paso se repitió 2 veces.
- El DNA se almacenó a -20 °C

Extracción de RNA (RNeasy Quiagen, 2005)

1. Se tomó la biopsia, por separado se trabajó con la biopsia de tejido con lesión y con la biopsia de tejido sano.
2. En seguida se puso la muestra en un tubo eppendorf estéril previamente tratado con DEPC-etanol, se le adicionó nitrógeno líquido para pulverizar completamente el tejido, teniendo especial cuidado en no dejar que la muestra se descongelara.
3. Se adicionaron 450 μ L de regulador RLT, y se agitó en vortex durante 1 min.
4. Se incubó a 56°C por 4 min.
5. El lisado se pasó directamente a la mini columna QIAShredder y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min. el filtrado se transfirió a un tubo nuevo sin tocar la pastilla formada en el fondo del tubo colector.
6. Se adicionaron 225 μ L de etanol (96-100%) para limpiar el lisado y se mezcló lentamente por pipeteo.
7. La muestra, incluyendo el precipitado en caso de que se haya formado, se pasó a la mini columna RNeasy, y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 s y se descartó el filtrado.
8. Se adicionaron 350 μ L del regulador RW1 a la columna RNeasy, y se centrifugó a 10,000 por 15 s y descartó el filtrado.
9. En un tubo por separado se preparó la siguiente mezcla: 4 μ l de stock de *DNAasal* y 70 μ L de regulador RDD, el mezclado se hizo por inversión del tubo únicamente.

10. Se adicionó la mezcla de *DNAasa* (74 μ L) directamente sobre la membrana de sílica-gel de la columna RNeasy, y se incubó a temperatura ambiente (20-30 °C) por 15 min.
 11. Se adicionaron 350 μ L de regulador RW1 en la columna RNeasy, y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 s, y se descartó el filtrado.
 12. La columna RNeasy se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 μ l de regulador RPE directamente a la columna; y se centrifugó a 10,000 rpm 15 s para lavar la columna, se descartó el filtrado.
 13. Se adicionaron otros 500 μ l de regulador RPE a la columna, para un segundo lavado, y se centrifugó a 10,000 rpm 2 min para secar la membrana de sílica gel.
 14. Este paso es opcional pero si se realizó: transferir la columna RNeasy a un tubo nuevo y centrifugar a 12,000 rpm por 1 min., esto es para eliminar posibles trazas de regulador RPE.
 15. Para la elución de RNA, se transfirió la columna a un tubo nuevo y se adicionó 50 μ L de agua libre de *RNAasas* directamente a la membrana de sílica gel y se centrifugó a 12000 rpm 1 min para fluir.
 16. Como el rendimiento esperado de RNA es $>20 \mu$ g, se repitió el paso de elución (paso 15); adicionando un segundo volumen de agua libre de *RNAasa* y fluir en el mismo tubo.
 17. Para obtener una mayor concentración de RNA total, ésta segunda elución se realizó empleando el eluido del paso anterior, el rendimiento esperado es 15 al 30 % más que el rendimiento obtenido usando solo uno.
- Para comprobar la extracción de RNA total se realizó una electroforesis del producto de la extracción en gel de agarosa desnaturalizante.

Síntesis de cDNA de cadena sencilla.

Se utilizó 1 µg de RNA total como templado, de las condiciones control (tejido sano) y problema (lesión) respectivamente para sintetizar cDNA de cadena sencilla.

1. Para cada muestra control y problema de RNA analizadas y para el control de placenta humana, proporcionado por el paquete, se mezclaron los reactivos mostrados en la tabla 6 en un tubo eppendorf estéril de 0.5 mL respectivamente:

Reactivos para síntesis de cDNA cadena sencilla.

REACTIVO	VOLUMEN
RNA Total	1 µL
3' oligonucleótido II A SMART CDS (10µM)	1 µL
Oligonucleótido SMART II A (10µM)	1 µL
Agua des ionizada	2 µL
Volumen Total	5 µL

2. Se mezcló y centrifugó brevemente.
3. Se incubó la reacción a 70 °C en un termociclador por 2 min.
4. Se centrifugó brevemente para coleccionar los contenidos en la tapa.
5. Se añadieron los reactivos de la tabla 7 a cada tubo de reacción:

Reactivos complementarios para síntesis de cDNA de cadena sencilla.

REACTIVO	VOLUMEN
Regulador de primera cadena 5X	2 µL
DTT (20 mM)	1 µL
dNTP 50X (10 mM)	1 µL
Transcriptasa reversa Super Script II.	1 µL

6. Se mezcló en vortex y se centrifugaron los tubos brevemente.
7. Se incubaron los tubos a 42 °C por 1 hora en un termociclador.
8. Se diluyó el producto de la reacción de primera cadena adicionando 40 µL de regulador TE.
9. Se calentaron los tubos a 72 °C por 7 min y se almacenaron a -20°C.

Síntesis de cDNA de doble cadena.

Se utilizaron tres tubos para cada muestra control y problema. Por lo general cada 100 μL de reacción producen de 1 a 3 μg de cDNA de doble cadena amplificado y purificado, el protocolo se realizó de la siguiente manera:

1. Se calentó el termociclador a 95 °C.
2. Para cada reacción, se empleó una alícuota de 10 μL de cDNA de cadena sencilla, en un tubo de 0.5 μL .
3. Se preparó la mezcla de reacción para todos los tubos, más un tubo adicional, se mezclaron los componentes de la tabla 8 en el orden en que se en listan a continuación:
Para cada reacción:

Reactivos para la síntesis de cDNA de doble cadena.

REACTIVO	VOLUMEN
Agua desionizada	74 μL
Regulador 10X Advantage 2 PCR	10 μL
dNTP 50X (10 mM)	2 μL
Oligonucleótido 5' PCR Primer II A (10 μM)	2 μL
Mezcla Advantage 2 polimerasa 50X	2 μL
Volumen total	90 μL

4. Se mezcló en vortex y se centrifugó brevemente.
5. Se colocaron 90 μL de la mezcla anterior y se adicionaron al tubo del paso 2.
7. Se inició la amplificación por PCR utilizando el programa para el termociclador PE2400: el paquete proporciona las condiciones adecuadas dependiendo del termociclador con que se cuente, en este caso se utilizó el PE 2400.

PE2400

95 °C 1 min

x ciclos*:

95 °C 15 s

65 °C 30 s

68 °C 6 min

Todas las reacciones se sintetizaron hasta 15 ciclos de PCR, dos tubos se almacenaron a 4 °C, y el tubo extra de cada reacción se empleó para determinar el número óptimo de ciclos de PCR, como se describe:

- a) Se transfirieron 15 μL de cada tubo a los 15 ciclos en tubo nuevo
- b) Se corrieron tres ciclos adicionales para un total de 18 ciclos con los 85 μL restantes de la mezcla de PCR, y así sucesivamente hasta llegar a los 35 ciclos.

9. Se adicionaron 2 μL de EDTA 0.5 M a cada tubo para parar la reacción.

10. Cuando el número de ciclos se completó, se analizaron 5 μL de cada muestra en un gel de agarosa al 1.2 %/EtBr .

11. Se transfirieron 7 μL del producto de PCR a un tubo limpio y se etiquetó este tubo como "Muestra A", y se almacenó a -20°C.

Purificación del cDNA de doble cadena.

1. Para cada muestra problema y control, se combinaron los dos de reacción de producto de PCR (cDNA) en sus ciclos óptimos para cada caso.
2. Se añadió el mismo volumen de fenol: cloroformo-alcohol-isoamílico (25:24:1) y se agitó en vortex.
3. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min para separar las fases, la fase acuosa se colocó en un tubo limpio.
4. Se añadieron 700 μL de n-butanol y se mezcló en vortex, la extracción con n-butanol permitió concentrar el producto de PCR en un volumen de 40 a 70 μL .
Nota: Adicionar demasiado n-butanol puede remover toda el agua y precipitar los ácidos nucleicos, si esto ocurre, se debe añadir agua al tubo y dar vortex hasta que la fase acuosa reaparezca.
5. La solución se centrifugó a temperatura ambiente a 14,000 rpm por 1 min.
6. La fase superior se descartó (n-butanol orgánico). El volumen final fue de 40 a 70 μL .
7. La columna CHROMA SPIN-1000 se mezcló por inversión varias veces para resuspender completamente la matriz gel.
8. La columna se colocó en un tubo de 1.5 mL.
11. El regulador de columna colectado se descartó y se añadió 1.5 mL de regulador TNE 1X.
12. Se permitió que el regulador drenara a través de la columna por flujo de gravedad hasta que se observó la superficie de la matriz de gel de la columna.
Nota La marca de la matriz de la columna debe estar en la marca de 0.75 mL. Si la columna contiene menor cantidad de matriz, se descarta la columna y se usa otra.
13. Se descartó el regulador colectado y se procedió con la purificación.
14. La muestra se aplicó en el centro de la membrana.
15. Se añadieron 25 μL de regulador TNE 1X para un primer lavado y después se adicionaron 150 μL , en ambos lavados se permitió drenar el regulador por completo fuera de la columna.
16. La columna se transfirió a un tubo limpio de 1.5 mL.
17. Se añadieron 320 μL de regulador TNE 1X y la fracción resultante es cDNA de doble cadena purificado. Se transfirieron 10 μL de esta fracción a un tubo limpio y se etiquetó como "Muestra B", se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
18. La columna se pasa a un tubo nuevo y se añadieron 75 μL más de regulador TNE 1X, esta fracción se etiquetó como "Muestra C", que en la mayoría de los casos es la que contiene mayor concentración de cDNA, se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
19. Se aplican 50 μL más a la columna 2 veces para obtener dos fracciones mas D y E, para tomarla comparar.
5 μL de las fracciones purificadas de cDNA y 2.5 μL del producto de PCR no purificado (Muestra A), se analizaron en gel de agarosa al 1.2%/EtBr, y se estimó el porcentaje de producto de PCR que permaneció después de la purificación.

Digestión del cDNA de Doble Cadena con la enzima *Rsa*I.

1. Se añadieron los reactivos de la tabla en tubos estériles para la condición control y problema respectivamente:

Reactivos para la digestión de cDNA.

REACTIVO	VOLUMEN
cDNA doble cadena	43.5 μ L
Regulador de restricción de la enzima <i>Rsa</i> I 10X	5.0 μ L
<i>Rsa</i> I (10 unidades/ μ L)	1.5 μ L

2. Se mezclaron por vortex y se centrifugaron brevemente.
 3. Se incubó a 37 °C por 30 min.
 4. Se separaron 5 μ L de la mezcla digerida y se analizó la eficiencia de la digestión.
 5. Se añadieron 2.5 μ L de EDTA/Glycogen 20X para terminar la reacción.
 6. Se añadieron 50 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
 7. Se mezcló por vortex vigorosamente.
 8. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min para separar las fases.
 9. Se removió la capa acuosa superior y se colocó en un tubo limpio de 0.5 mL.
 10. Se añadieron 50 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por vortex
 11. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min para separar las fases.
 12. Se removió la fase acuosa y se colocó en un tubo limpio.
 13. Se añadieron 25 μ L de NH₄Oac 4 M y 187.5 μ L de etanol al 95 %.
- Inmediatamente se realizó la precipitación
14. Los tubos se centrifugaron por 20 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente.
 15. El sobrenadante se removió cuidadosamente.
 16. La pastilla se lavó suavemente con 200 μ L de etanol al 80 %.
 17. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min.
 18. El sobrenadante se removió cuidadosamente.
 19. La pastilla se secó al aire de 5 a 10 min, colocando el tubo invertido.
 20. La pastilla se eluye en 5 μ L de agua y se guardó a -20 °C.
 21. 5 μ L del cDNA de doble cadena no digerido y 5 μ L del cDNA digerido con *Rsa*I se analizaron en un gel de agarosa al 1.2 %/EtBr.

Ligación de Adaptadores.

1. Se diluyó 1 μL de cada cDNA problema digerido con la enzima *RsaI* con 5 μL de agua estéril.
2. Se preparó la mezcla de ligación combinando los reactivos de la tabla 10 en un tubo estéril de 0.5 mL. Se preparó también para un tubo adicional.

Reactivos para ligación de adaptadores.

REACTIVO	VOLUMEN
Agua estéril	3 μL
Regulador de ligación 5X	2 μL
DNA ligasa T4 (400 units/ μL)	1 μL

Nota: El ATP requerido para la ligación está en el kit de la DNA ligasa T4.

1. Para cada muestra problema de cDNA y para el control kit, se combinaron los reactivos de la tabla 11.

Proporciones para las reacciones de ligación.

Componente	Tubo 1: Problema 1-1 (μL)	Tubo 2: Problema 1-2(μL)
CDNA problema diluído	2	2
Adaptador 1 (10 μM)	2	-
Adaptador 2R (10 μM)	-	2
Mezcla de ligación	6	6
Volumen final	10	10

4. Las muestras se mezclaron por pipeteo.
5. Los tubos fueron centrifugados brevemente, y se incubaron a 16 °C toda la noche.
6. La reacción de ligación se detuvo añadiendo 1 μL de mezcla EDTA/Glycogen.
7. Las muestras se calentaron a 72 °C durante 5 min, para inactivar la ligasa.
8. Los tubos se centrifugaron brevemente.
9. Las muestras se almacenaron a -20 °C. hasta la primera hibridación.

Purificación de fragmentos en geles de agarosa.

1. Las bandas de interés fueron cortadas del gel.
2. Se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y previamente pesado.
3. Se adicionaron 3 volúmenes de Buffer QX1 por 1 volumen de gel.
4. Se resuspendió el QIAEX II en vortex por 30 s y se adicionó de acuerdo a la tabla 16.

Volumen de QX1 necesario para cada fragmento de DNA.

2 µg DNA	Adicionar 10 µL de QIAEX II
2-10 µg DNA	Adicionar 30 µL de QIAEX II
Por cada 10 µg adicionales de DNA	Adicionar adicionalmente 30 µL de QIAEX II

5. Los tubos de incubaron a 50 °C por 10 min., se mezclaron por inversión cada dos minutos.
6. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. y el sobrenadante se removió con pipeta.
7. El pellet se lavó con 500 µL de regulador QX1.
8. Se mezcló y se centrifugó 1 min. a 13000 rpm.
9. Se removió el sobrenadante con pipeta.
10. Nuevamente el pellet se lavó con 500 µL de regulador QX1.
11. Se mezcló y se centrifugó 1 min. a 13000 rpm.
12. Se removió el sobrenadante con pipeta.
13. El paquete celular se lavó con 500 µL de regulador PE.
14. Se mezcló y se centrifugó 1 min. a 13 000 rpm.
15. Se removió el sobrenadante con pipeta.
16. El paquete celular se lavó con 500 µL de regulador PE.
17. Se mezcló y se centrifugó 1 min. a 13000 rpm.
18. Se removió el sobrenadante con pipeta.
19. Se centrifugó 1 min. a 13000 rpm.
20. Se removió el sobrenadante con pipeta.
21. La pastilla se dejó secar al aire colocando el tubo invertido por aprox. 30 min.
22. El DNA, se disolvió adicionando 15 µL de agua destilada estéril.
23. Se incubó a 55° C por 5 min.
24. Se centrifugó por 1 min a 13000 rpm.
25. El sobrenadante se pasó a un tubo estéril, este contiene el DNA purificado.
26. Los tubos de colocaron en hielo.
27. Para verificar la calidad de la purificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.0 %/EtBr, empleando 2 µL de los fragmentos de DNA purificados.

Ligación en vector Topo 4 cloning for sequences.

Se mezclaron los reactivos de la tabla y se incubó a 23 °C durante 2.5 min.

Tabla. Reactivos necesarios para la ligación de insertos en el vector pCR-Topo 4.

REACTIVO	VOLUMEN
Producto de PCR, (inserto a clonar)	2µL
Solución Salina	1µL
Agua desionizada estéril	2µL
Vector pCR TOPO 4	1µL
Volumen total	6µL

Transformación en células de *Escherichia coli* TOP 10 F´.

1. Se adicionaron 2 µL del producto de purificación dentro de un tubo de células competentes, el tubo contenía 50 µL,
2. Se colocó el tubo en hielo por 10 min.
3. Se incubó a 42 °C por 45 s.
4. Nuevamente se colocó en hielo por 15 min.
5. Se adicionaron 250 µL de medio SOC.
6. El tubo se incubó a 37 °C por 1 hr a 250 rpm, colocando el tubo horizontalmente.
7. Las células se colocaron en placas con medio LB+Kanamicina 50 mg/mL.
8. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.
9. Se observó el crecimiento, por el tipo de plasmido y células empleadas, se espera que todas las colonias que crecen tienen el plasmido.

Extracción de DNA plasmídico: selección de colonias con el inserto de interés.

1. Se inocularon en 3 mL de medio Luria Bertani (LB) adicionado de ampicilina y kanamicina a una concentración final de 50 µg/mL, se inoculó con una colonia y se incubó toda la noche a 37 °C a 250 rpm.
 2. Al siguiente día, las células se cosecharon por centrifugación a 13, 000 rpm durante 5 minutos, este paso se realiza dos veces, concentrándolas en un solo tubo,
 3. Se descartó el sobrenadante y al paquete celular se le adicionaron 250 µL de la solución P1 que contiene *RNAasa*, se resuspendió en vortex hasta que la suspensión fue homogénea.
 4. Se adicionó 250 µL de la solución de lisis P2 y se mezcló suavemente por inversión 5 veces y se incubó el tubo a temperatura ambiente sin dejar que la reacción ocurriera por más de 5 min.
 5. Se adicionó 350 µL de la solución de neutralización N3 y se mezcló inmediatamente 5 veces por inversión.
 6. Los tubos se centrifugaron a 10, 000 rpm durante 10 min. y después el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico fue transferido, a un tubo nuevo.
 7. Se agregó un volumen de isopropanol (aprox 800 µL) y se dejó reposar 15 min. en hielo.
 8. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min.
 9. La pastilla se lavó con etanol al 70% por vortex.
 10. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min.
 11. Se decantó el sobrenadante, y se esperó que las trazas de etanol se volatilizaran.
 12. El DNA se resuspendió en 50 µL de agua estéril.
- Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % / EtBr, para verificar la calidad de la extracción.

Almacenamiento y recuperación de células en glicerol.

Las clonas que contenían el inserto de interés se integraron a la biblioteca sustractiva y se almacenaron con glicerol al -80°C (ver anexo II).

1. Cada clona se creció en 3 mL medio líquido Luria Bertani (LB) adicionado de ampicilina y kanamicina a una concentración final de $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ para la selección del plásmido
2. Se incubó a $37\ ^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6 unidades de absorbancia.
3. Se transfirieron 0.5 mL de este cultivo a un tubo eppendorf estéril.
4. Se adicionó 0.5 mL de glicerol al 100%, estéril, se mezcló suavemente con la punta de la pipeta.
5. Se almacenaron a -80°C .

Para recuperar las células a partir de los almacenados se siguió el siguiente procedimiento:

1. Los tubos se colocaron en hielo, se tomaron, se toman $50\ \mu\text{l}$ de cultivo celular y se inoculó en 3 mL de medio líquido Luria Bertani (LB) suplementado de ampicilina y kanamicina ($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$).
2. El tubo se regreso a -80°C para evitar que éste se descongele por completo.
3. Se Incubó a $37\ ^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche para obtener las cepas recuperadas.

Marcaje y detección de la sonda.

1. se realizo a partir de 25 ng-2 µg de cDNA control y problema por separado (sondas), se ajusto a un volumen final de mínimo 10 µL o máximo 34 µL con agua destilada o TE.
2. El cDNA se desnaturalizó en un baño de agua hirviendo por 5 minutos, enseguida se colocó en hielo, el volumen debe ser al menos de 10 µL.
3. Se adicionaron los reactivos de la tabla en el orden mostrado:

Marcaje de la sonda.

REACTIVO	VOLUMEN
Agua destilada y estéril para un volumen de reacción final 50 µL	24 µL
Mezcla de nucleótidos	10 µL
Oligonucleótidos	5 µL
DNA desnaturalizado	10 µL (50 ng)
Enzima Klenow 5 units/µL	1µL
Total	50 µL

4. Se mezcló suavemente por pipeteo y se centrifugó brevemente.
5. La reacción se incubó a 37 °C por 3 h en el termociclador.
6. Para terminar la reacción se adicionaron 2 µL de EDTA 0.5 M, y se almacenaron a -20° C, protegidos de la luz.

Mezcla desnaturalizante del RNA

REACTIVO	VOLUMEN
MOPS 10X	6.25 µL
Formamida	31.25 µL
Formaldehído	12.5 µL
RNA 1.5 µg/mL	25 µL

Componentes para reacción de PCR

Componente	Cantidad por reacción (µL)
Agua estéril	19
Regulador de PCR 10X	2.5
Mezcla dNTP (10mM)	0.25
MgCl ₂ (50 mM)	1.25
Primer sentido (10 µM)	0.25
Primer antisentido (10 µM)	0.25
cDNA	1 µg
Taq Polimerasa	0.5
Volumen total	25

ANEXO III
SOLUCIONES Y BUFFERS

Etanol al 70%

Para 400 ml
280 ml Alcohol etílico
120 ml Agua destilada

Hipoclorito de sodio al 0.6%

Para 500 ml
3 ml Hipoclorito de sodio
497 ml Agua destilada

Buffer NTES de lisis (para extracción RNA)

Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 10 mM, SDS 1%

Para 100 ml

Tris HCl 0.1576 g.

EDTA 0.0372 g.

NaCl 0.058 g.

SDS 1 g.

Disolverlos en 100ml de Agua destilada y esterilizar.

Cloruro de Litio 10 M

Para 30 ml
12.71 g. LiCl
30 ml Agua con DEPC

Acetato de Sodio 3M

Para 30 ml
12.24 g. NaOac
30 ml Agua con DEPC

Solución de etanol con DEPC para tratar puntas, tubos, cámaras, morteros y demás material para extracción de RNA

998 ml Etanol
2 ml DEPC (dietil pirocarbonato, inhibidor de nucleasas)
Sumergir el material en esta solución media hora mínimo y enseguida esterilizar para eliminar restos de dietil pirocarbonato.

Agua con DEPC

999 ml Agua destilada estéril

1 ml DEPC

Esta solución al igual que la anterior se deben dejar en agitación toda la noche para lograr disolver el DEPC.

Solución desnaturalizante (separa los diferentes tipos de RNA)

4 μ L MOPS 10X

7 μ L Formaldehído 37 %

20 μ L Formamida

Combinar 25 μ g de RNA aprox. Con la mezcla desnaturalizante.

Desnaturalizar a 55 C por 15 min.

Enseguida poner en hielo por 2 minutos

Centrifugar 1 pulso a 12,000 rpm.

Gel de Agarosa desnaturalizante

Para 80 ml

0.96 g. Agarosa

8 ml MOPS

2.4 ml Formaldehído 37 %

69.6 ml Agua destilada estéril con DEPC

Fundir agarosa con el agua con DEPC.

Enfriar hasta aprox. 40 C.

Agregar MOPS 10X

Agregar Formaldehído

Agregar 1.5 μ L de bromuro de etidio.

Nota: El buffer de corrida MOPS 1X es para gel desnaturalizante.

MOPS 1X: ocupar MOPS 10X y diluir en agua tratada con DEPC hasta alcanzar la concentración 1X.

Regulador de carga para DNA

6X (Para 10 mL)

0.25% Azul de Bromofenol

0.25% Xilen-cianol

30% Glicerol en agua

Medios de cultivo

Caldo LB (1000 mL)

Bacto triptona ó peptona de caseína 10 g

Extracto de levadura	5 g
NaCl (grado reactivo)	10 g

Disolver en 950 ml de agua destilada, aforar a 1000 ml y ajustar el pH a 7.0, esterilizar a 15 lb/plg² durante 15 minutos

Agar LB (1000 mL)

Bacto triptona ó peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl (grado reactivo)	10 g
Agar	15 g

Disolver en 950 ml de agua destilada, aforar a 1000 mL y ajustar el pH a 7.0, esterilizar a 15 lb/plg² durante 15 minutos

Antibiótico 5 mL (Almacenado a una concentración final de 50 mg/mL)

Kanamicina	0.25 g
Agua destilada estéril	5 mL

Electroforésis en geles de agarosa al 1 %

Agarosa	1 g
TAE 50X	2 ml
Agua destilada	97 ml

TAE 50X

Tris (base)	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA a una concentración de 0.5 M y pH 8.0	100 ml

Regulador de carga para ADN

Naranja G	0.25 %
Xilencianol	0.25 %
Ficoll	0.15 %

Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico

(25: 24: 1)

Regulador TE

(Tris pH 7.6 10 mM, EDTA 1mM)

Regulador TNE 1X

(Tris HCl pH 8 10 mM, NaCl 10 mM, 0.1 mM EDTA)

El regulador de hibridación

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
SSC	5x
SDS	0.1% (w/v)
Líquido de bloqueo diluido	1/20
Sulfato Dextran (mv 5000)	5% (w/v)

Solución de lavado de astringencia

LAVADO 1		LAVADO 2		LAVADO 3	
SSC	1X	SSC	0.5X	SSC	0.125X
SDS	0.1%	SDS	0.1%	SDS	0.1%

Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer

Leticia Santos, MC, Dra en C,⁽¹⁾ María Fabiola León-Galván, MC,⁽¹⁾
Erika Nahomy Marino-Marmolejo, QBP.⁽¹⁾

Santos L, León-Galván MF, Marino-Marmolejo EN.
Vía de señalización Notch y nuevas estrategias
para el tratamiento de cáncer.
Salud Publica Mex 2006;48:155-165.

Resumen

La vía de señalización Notch desempeña un papel fundamental en las diferentes etapas del desarrollo celular como la proliferación, crecimiento, diferenciación y apoptosis. Estudios recientes han demostrado que, dependiendo del nivel de expresión y del contexto celular, los receptores de membrana Notch contribuyen en la resistencia a apoptosis en células tumorales. Estos descubrimientos sugieren que componentes de la vía de señalización Notch son un blanco potencial para el desarrollo de terapias más efectivas contra el cáncer. Esta revisión describe la función de la vía Notch y nuevas estrategias utilizadas en la modulación de su señal.

Palabras clave: Notch, cáncer, agentes terapéuticos; México

Santos L, León-Galván MF, Marino-Marmolejo EN.
Notch signaling pathway and new strategies
in cancer treatment.
Salud Publica Mex 2006;48:155-165.

Abstract

The Notch signaling pathway plays a crucial role at different stages of cell development, such as proliferation, growth, differentiation, and apoptosis. Recent studies demonstrate that depending on the expression level and cellular context, the Notch receptors play a role in apoptosis resistance in malignant cells. These findings suggest that Notch signaling components may be a potential target in the development of new cancer therapies. This review describes the function of the Notch pathway and new strategies in the modulation of its signal.

Key words: Notch; cancer; therapeutic agents; Mexico

La vía de señalización Notch está involucrada en el control de diversos eventos durante el desarrollo de las células eucarióticas como son la proliferación, el crecimiento, la migración, la diferenciación y la muerte celular programada (apoptosis).

Thomas Hunt Morgan describió al sistema Notch, por primera vez, en 1917, como responsable de la neu-

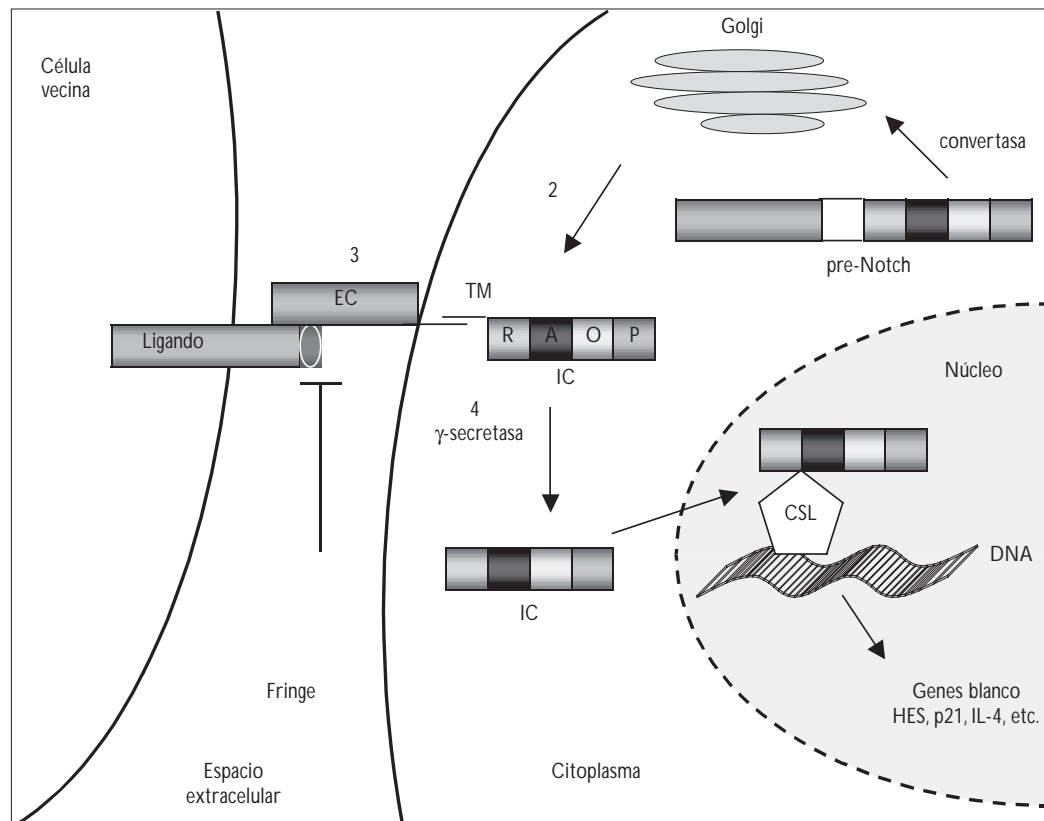
rogénesis y la especificación del ectodermo en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*).¹ En 1914 Dexter y colaboradores descubrieron la primera mutación del gen Notch. En 1919 Mohr y colaboradores lo caracterizaron al detectar una deficiencia funcional de la proteína Notch, que provoca la aparición de surcos (*notches*) en los bordes de las alas de *D. melanogaster*. En 1940

(1) División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, S.L.P., México.

Poulson demostró que la pérdida del gen es letal en embriones. Posteriormente, en 1970, Wright encontró que las mutaciones del gen Notch-1 inducen la formación de una estirpe neurogénica en células que estaban destinadas a ser epidérmicas.^{2,3} A mediados de los años ochenta, los grupos de Artavanis-Tsakonas y Young clonaron y expresaron independientemente el gen que consiste en un receptor con un solo dominio transmembranal.^{4,5} A la fecha, se han identificado varios genes del receptor Notch en diversas especies, incluyendo la humana y en ratón, en las que se conocen cuatro genes que codifican a sus correspondientes proteínas Notch-1 al -4.

Vía de señalización Notch

Los genes Notch codifican receptores transmembranales de aproximadamente 300 kilodaltones (kDa), cuya estructura está altamente conservada. Los productos de cada gen se expresan como un solo polipéptido precursor (pre-Notch, figura 1) que es procesado proteolíticamente por una convertasa en el aparato de Golgi, dando lugar a un precursor heterodimérico. Este último se ancla posteriormente en la membrana y consiste en una subunidad extracelular (*extracellular subunit*, EC) y una subunidad transmembranal (*transmembrane subunit*, TM) que está unida a la región



Notch se sintetiza en forma de precursor inactivo (pre-Notch) y su procesamiento en el complejo de Golgi (paso 1) es a través de hidrólisis generada por la enzima convertasa similar a Furina. El producto de esta reacción es la formación de las subunidades IC, TM y EC que se reensamblan posteriormente en la membrana plasmática (paso 2) como un complejo heterodimérico activo. La unión de Notch y su ligando (paso 3) proveniente de una célula vecina, induce el procesamiento de Notch (paso 4) por la proteína Presenilina-1 (parte del complejo enzimático gama-secretasa) liberando la subunidad intracelular IC. La translocación de IC al núcleo y su unión a factores de transcripción de la familia CSL (paso 5) da como resultado la activación de la expresión de genes específicos, esto es, los factores de transcripción HES, IL-4, NFkB, etcétera

Pre-Notch, polipéptido precursor de Notch; EC, subunidad extracelular; IC, subunidad intracelular; TM, subunidad transmembranal; R:RAM-23, sitio de alta afinidad de los factores de transcripción; A, repeticiones de Ankirina necesarias para la transmisión de señales; O:OPA, región rica en glutamina; P:PEST, región rica en prolina-glutamato-serina-treonina; CSL: CBF-1/ Lag-1/ Suppressor of Hairless

FIGURA 1. PROCESAMIENTO DEL RECEPTOR NOTCH Y MECANISMO DE ACCIÓN

intracitoplásmica (IC). La región EC contiene varias repeticiones en su secuencia de aminoácidos, similares a la del factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), constituyendo las repeticiones 11 y 12 el principal sitio de unión a su ligando proveniente de otra célula.

Cuando el receptor Notch lleva a cabo la unión con su ligando en otra célula (figura 1) la subunidad transmembranal TM es procesada proteolíticamente, generando un fragmento intracelular (*intracellular subunit*, IC) que se transloca al núcleo e interactúa con factores de transcripción de la familia CLS (CBF-1/ Lag-1/ Suppressor of Hairless)⁶ a través del dominio RAM23 de IC. Al unirse CBF-1 a IC se disocia un complejo represor que incluye una diacetilasa de histonas (HDAC-1) y recluta coactivadores nucleares como SKIP y MAML1 (mastermind), lo que hace a CBF-1 actuar, entonces, como un activador de la transcripción.⁷

Los cuatro receptores Notch en mamíferos (Notch 1-4) tienen estructuras muy similares entre sí, con diferencias esenciales en las porciones extracelular y citoplásmica. Los receptores Notch-1 y -2 contienen 36 repeticiones “EGF-like” en sus dominios EC, mientras que Notch-3 contiene 34 y Notch-4 solamente 29. A nivel del dominio IC tienen las siguientes diferencias: Notch-1 contiene un dominio de transactivación fuerte (TAD, por sus siglas en inglés), mientras que en Notch-2 su TAD es débil y en Notch-3 y -4 no está presente.⁸

Los ligandos del receptor Notch en invertebrados son conocidos como Delta y Serrate para *D. melanogaster*, en tanto que para *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) se conoce LAG-1; a estos ligandos se les ha llamado colectivamente DSL. Otros ligandos en *C. elegans* son LAG-2, APX-1, ARG-2 y F16B12.2. En mamíferos se conoce un grupo de homólogos de Delta denominados “Delta-like”; y llamados Jagged (JAG) para Serrate. En total se conocen cinco ligandos en mamíferos denominados JAG1, JAG2 y H-Delta-1, -3, y -4 (DLL1, DLL3, y DLL4).⁹ En 1999, Qi y colaboradores encontraron, además, una forma soluble de Delta en *Drosophila*, lo que sugiere que Notch puede mediar la comunicación entre células no contiguas.^{3,10} Las diferencias estructurales en esta familia de ligandos son el número y el espaciamiento de las repeticiones a nivel del dominio extracelular y la presencia de un dominio rico en cisteína localizado corriente abajo de las repeticiones EGF, específicamente en los ligandos Ser, JAG1 y JAG2.⁸

Las proteínas moduladoras de la unión receptor-ligando a nivel extracelular son las proteínas “Fringe” en *Drosophila* y sus homólogos en mamíferos, “Lunatic Fringe, Radical Fringe, y Maniac Fringe”.^{11,12} Además, se han identificado proteínas que modulan la degradación/procesamiento de Notch a nivel intra-

celular; en *C. elegans* se conocen las proteínas Sel-1 y Sel-10,¹³ y en *Drosophila*, la proteína Numb que actúa regulando negativamente la señalización al unirse con la región intracelular de Notch.¹⁴

Por último, los genes blanco de Notch incluyen factores de transcripción represores pertenecientes a las familias de proteínas HES (*hairy and enhancer of Split*) y HRT/HERP/Hey (familia “*basic helix-loop-helix-Orange*”), IL-4, p21, etcétera (cuadro I). Sin embargo, aún no es claro cuál(es) de esos genes es/son el/los responsables de los efectos fenotípicos de la señal Notch. Algunos ejemplos de la participación de Notch es la inhibición del desarrollo neuronal, ya que parece ser que los genes blanco Hes1 y Hes5 median muchos o quizás todos los efectos producidos por Notch.¹⁵ En el caso del desarrollo del páncreas el blanco de Notch es el gen HES-1; en el desarrollo cardíaco el gen Hey2; y en el desarrollo vascular los genes Hey1 y Hey2. Notch ejerce, además, un doble papel en un modelo de cultivo celular (3T3-L1): la activación de HES-1 induce adipogénesis, mientras que al bloquear la activación de HES-1 se inhibe la diferenciación de 3T3-L1. Por último, se ha informado que el gen IL-4 es un blanco directo de Notch y explica la capacidad que tiene de promover el fenotipo Th2 de las células T de ayuda.¹⁶

En el cuadro I se muestran los elementos principales del sistema de señalización Notch y sus homólogos en distintas especies.¹⁷

Localización y función de Notch

Los estudios realizados sobre la función y localización de los receptores Notch están enfocados, primordialmente, en el receptor Notch-1, mientras que aún no se ha dilucidado el papel que desempeñan el resto de los receptores. La señalización Notch está implicada en la neurogénesis, hematopoyesis y vasculogénesis. Específicamente, Notch-2 en la morfogénesis dental, probablemente Notch-3 en neurogénesis y adipogénesis, y Notch-4 en el desarrollo vascular, renal y hepático.^{3,18-20}

Los patrones de expresión de Notch en el desarrollo del embrión de *Drosophila* son bastante complejos y dinámicos. La proteína Notch se expresa, de manera amplia, en la fase temprana del desarrollo del embrión y subsecuentemente su expresión se restringe a grupos de células no comprometidas o proliferativas. En el adulto, la expresión persiste en los tejidos regenerativos de ovarios y testículos.^{3,21-24} Estudios de Notch-1 en *Xenopus* muestran que sus patrones de expresión son muy similares a *Drosophila*, sobre todo en extirpes celulares terminalmente no diferenciadas y proliferativas. Durante el desarrollo, los tejidos con mayores niveles de expresión incluyen el cerebro, los ojos y el

Cuadro I
PRINCIPALES COMPONENTES DEL SISTEMA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH*

Componente	Organismo		
	Mamíferos	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
Receptores (Notch)	Notch-1 (TAN-1)		LIN-12
	Notch-2		GLP-1
	Notch-3		
	Notch-4		
Ligandos	Delta-like1 (DLL1)		LAG-2
	Delta-like3 (DLL3)		APX-1
	Delta-like4 (DLL4)		ARG-2
	Jagged 1 (JAG1)		F16B12.2
	Jagged 2 (JAG2)		
Factores de transcripción	CBF1 (RBPJK)	Supresor de Hairless [Su(H)]	LAG-1
	RBPL		
Genes blanco de Notch producto de la activación de transcripción	<i>p100/NF_Β</i>	<i>p21</i>	genes <i>bHLH</i>
	HES	IL-4	Single-minded
	Hey	PPAR	Mastermind
	Hey2	Ciclina D1	Vestigial
	GATA-2	<i>NFκB</i>	<i>Wingless</i>
Moduladores de Notch	Lunatic Fringe	Fringe	Sel-1
	Maniac Fringe	Numb	Sel-9
	Radical Fringe	Disheveled	Sel-10
		Notchless	
		Deltex	

* Adaptado de Lai, 2004 (referencia 17)

tubo neural.^{25,26} Estudios en mamíferos muestran que los niveles de expresión de sus homólogos correspondientes comienzan tardíamente durante su desarrollo embrionario. Las proteínas se expresan como patrones dinámicos en tejidos que llevan a cabo la determinación del destino celular o la aceleración de la proliferación.²⁷⁻³¹ Notch se expresa, en la fase inicial de la embriogénesis en mamíferos, en los tejidos que constituyen al mesodermo pre-somita y el neuroepitelio del embrión en desarrollo. La expresión de Notch-1 se visualiza a lo largo de todo el mesodermo pre-somita, en particular, en áreas densas a nivel del borde anterior del mesodermo. Se encontró que dicha expresión disminuye una vez que los somitas se han formado por completo e indica la posible función de Notch-1 en la diferenciación de las células precursoras de los somitas. Patrones similares del ligando Delta se observan en el desarrollo de ratón.³¹⁻³³

En 2004, Balde y colaboradores caracterizaron la expresión específica de Notch-1 utilizando un arreglo de 59 tipos de tejidos normales humanos. Se demostró que Notch-1 se expresa a altas concentraciones en una amplia variedad de tejidos en el epitelio estratificado de la epidermis y en capas suprabasales intermedias de las mucosas de la cavidad oral, esófago, ectocérvix y vagina. Se observaron niveles intermedios a bajos en linfocitos de algunos tejidos linfoides periféricos, particularmente en centros germinales de nódulos linfáticos.³⁴

La función de la señalización Notch involucra una gran variedad de procesos celulares incluyendo el mantenimiento de células troncales, especificación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis, por lo que posee efectos pleiotrópicos en diferentes órganos. Los tres efectos principales son: a) el mantenimiento de las células troncales o precursoras en un estado no diferenciado; b) la influencia en las

decisiones del destino celular, ya sea a través de la vía lateral o bien por una vía inductora dependiente de la cantidad de receptor-ligando expresado en la membrana, y c) la habilidad de influenciar la diferenciación y la progresión del ciclo celular.^{8,35} Ejemplo de ello es el sistema nervioso, en el cual Notch promueve la diferenciación de varios tipos celulares de la glia incluyendo astrocitos, células de Schwann, células de Müller y células radiales.³⁶

La señalización Notch juega un papel excepcionalmente interesante en la diferenciación de la epidermis, ya que al parecer tiene una función opuesta a los efectos antes descritos. En queratinocitos, la señalización Notch estimula la expresión de marcadores de diferenciación y reduce la proliferación celular a través de la activación de Notch-1. Estudios en ratones apoyan un modelo de Notch-1 en piel que promueve la diferenciación celular en vez de suprimirla y, adicionalmente, estos ratones son más susceptibles al desarrollo de tumores a nivel basal.^{37,38}

En el sistema inmune, Notch se encuentra involucrado en el proceso de maduración de las células T en el timo que expresarán los receptores CD4 o CD8, además del receptor TCR. Durante este proceso, las células doblemente negativas (CD4⁻CD8⁻) expresan altas concentraciones de Notch-1; después, las células doble positivas (CD4⁺CD8⁺) presentan una disminución de Notch-1, y posteriormente, su concentración es intermedia en las células maduras que son positivas para CD4⁺ o CD8⁺. Estos datos sugieren que Notch-1 desempeña un papel clave en la determinación tanto del linaje CD4/CD8, en la determinación de la expresión del receptor TCR ab vs. gd, así como también en la regulación de la muerte celular de células T.^{39,40}

Notch y enfermedad

Los componentes de la vía Notch están involucrados en una gran variedad de enfermedades humanas, siendo la más frecuente el cáncer. Entre las causas principales se encuentran la presencia de mutaciones, deleciones, translocaciones e inserciones virales en sus genes.

Estudios durante el desarrollo embrionario del ratón han revelado la conexión entre mutaciones de los genes Notch y la presencia de síndromes de enfermedades congénitas humanas, como se describe a continuación.

El gen humano *notch-1* se detectó por primera vez en el subtipo de leucemia linfoblástica aguda de las células T (T-LLA, por sus siglas en inglés) al producirse una translocación cromosomal (7;9)(q34;q34.3).⁴¹ Este rearrreglo origina la expresión de Notch-1 con las porciones TM e IC y excluye la porción EC. Hallazgos

recientes describen que más de 50% de los casos con T-LLA presentan mutaciones activantes que involucran específicamente al dominio de heterodimerización extracelular o del carboxilo terminal del dominio PEST de *notch-1*.⁴²

Otros ejemplos de mutaciones incluyen la tetralogía de Fallot, que involucra una mutación puntual (G274D) y expresa al ligando *JAG-1* en sentido erróneo. Esta enfermedad se caracteriza por estenosis y atresia pulmonar, y ausencia de la válvula pulmonar. El síndrome de Alagille se debe a diferentes mutaciones en *JAG-1* y provoca al menos 72% de codones de terminación prematuros. Desarrolla anomalías en el hígado, corazón, ojos y esqueleto, principalmente. La disostosis espondilocostal (o síndrome de Jarcho-Levin), es un defecto de segmentación vertebral múltiple con alteraciones costales ocasionado por mutaciones en el ligando *DLL3* y provoca su expresión en forma truncada.⁴³ Finalmente, *CADASIL* (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*), es una enfermedad cerebrovascular hereditaria que ocasiona un declive cognitivo y demencia. Se trata de una enfermedad vascular sistémica que afecta pequeños vasos y se transmite de forma autosómica dominante. La enfermedad está ligada a una mutación del gen *Notch-3* en el punto cromosómico 19p13, proteína relacionada, además, con la diferenciación de los adipocitos durante el desarrollo.⁴⁴

Implicaciones de Notch en cáncer y apoptosis

En consideración a que la señalización Notch controla críticamente las decisiones del destino celular en numerosos tejidos y en diversos tiempos de la diferenciación, es razonable pensar que cualquier desregulación de la función de Notch pudiera estar involucrada con el desarrollo de cáncer.

En los últimos años se ha notificado sobreexpresión de componentes de la vía Notch en una gran variedad de carcinomas humanos, incluyendo leucemias, neuroblastomas, cáncer cervicouterino (CaCu), cáncer de mama, tumores mucoepidermoides, carcinomas renales, cáncer de piel y cáncer pulmonar, entre otros.

La leucemia T-LLA, que expresa la forma truncada de Notch-1, tiene como resultado la expresión constitutiva y activa de Notch-1 y acarrea el arresto de los linfoblastos T durante la maduración en el estadio en que las células CD4⁺CD8⁺ son doble positivas. Este evento correlaciona perfectamente el desarrollo de T-LLA, ya que potencialmente Notch-1 posee una actividad transformante para permitir la sobrevivencia de las células doble positivas que, de otra manera, esta-

rían destinadas al suicidio celular (apoptosis).^{42,45} Experimentalmente se observa que Notch-1 (antes conocido como TAN-1, *translocation-associated Notch homologue*), sostiene una interacción directa entre su porción IC y el factor transcripcional Nur77 en el núcleo, dando lugar a la inhibición de la apoptosis en hibridoma de células T (línea DO11.10).⁴⁶ Asimismo, la expresión del fragmento IC de Notch inhibe la apoptosis inducida por dexametasona en células de linfoma y en hibridomas de células T. Se ha sugerido que la proteína SGR3, un regulador de la transcripción que participa en la remodelación de la cromatina en procesos de desarrollo, proliferación y diferenciación celular, es blanco de la señalización Notch al conferir resistencia a glucocorticoides en timocitos.⁴⁷

En 1998, Deftos y colaboradores observaron la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en una línea celular de linfoma tímico (AKR1010) al inducir la expresión de la forma activa de Notch-1.⁴⁰

Otros estudios *in vitro* han detectado, además, genes truncados de Notch-1 y Notch-2 (en la subunidad IC) que le atribuye una actividad transformante a células de riñón de rata.⁴⁸

Alteraciones que causan la desregulación de la vía Notch en otras especies son, por ejemplo, la inserción del virus de leucemia murina Moloney (M-MLV) en la región transmembranal del gen *Notch-1*, o bien la excisión e integración del virus de leucemia felina (FeLV) en el extremo 3' del gen *Notch-2*. Ambos cambios pro-

ducen ganancia de la función de ambos receptores y, como consecuencia, efectos antiapoptóticos.^{49,50}

Por otra parte, también se ha documentado mutagénesis insercional en el genoma de ratón del retrovirus MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) en tumores mamarios. El sitio de integración más frecuente, *int-3*, está localizado dentro de la región del gen *Notch-4*. La expresión de la oncoproteína *int-3/Notch-4* transforma a células epiteliales mamarias en ensayos murinos.³⁵

Las evidencias antes descritas indican que el sistema de señalización Notch se encuentra íntimamente relacionado con la tumorigénesis y la apoptosis; sin embargo, existen pruebas sustentadoras de que esta vía no es solamente oncogénica, sino que, además, funciona como un supresor de tumores. Tal es el caso en cáncer cervicouterino (CaCu), como se describe a continuación. En el cuadro II se resumen las funciones potenciales de Notch en cáncer.⁵¹

Cáncer cervicouterino y Notch

Dado que el sistema de señalización Notch permite mantener a las células un estado proliferativo o indiferenciado, se piensa que su papel en cáncer es prevenir la respuesta de las células neoplásicas a la señal de diferenciación. Ya que las oncoproteínas virales contribuyen al proceso de tumorigénesis, el elemento faltante para llevar a cabo la transformación celular es la desregulación de Notch.

Cuadro II
FUNCIONES POTENCIALES DE LA SEÑALIZACIÓN NOTCH EN CÁNCER*

Función	Mecanismo	Contexto celular
Oncoproteína	Ganancia de función independiente de ligando	Células pre-T Línea celular RKE
	Ganancia de función dependiente de ligando	Epitelio mamario murino (vía inserción retroviral) Células Reed-Sternberg (linfoma Hodgkin) y linfoma anaplásico de células gigantes Células mesoteliales (con SV40) Células pre-T (en ratones sobreexpresando DLL-4)
Supresor de tumores	Pérdida de función	Queratinocitos Posiblemente otros epitelios escamosos
Factor metaplásico	Activación dependiente de ligando	Células acinares de páncreas Endocérvix
'Angiogénesis	Activación dependiente de ligando	Células endoteliales
Renovación de células troncales cancerosas	Activación dependiente de ligando	Población auto-regenerante de células progenitoras
Respuesta inmune	Activación dependiente de ligando	Células dendríticas Células T de sangre periférica

* Adaptado de Weng y Aster, 2004 (referencia 51)

El CaCu es la segunda causa de mortalidad en mujeres en el mundo y es uno de los tipos de cáncer más estudiado en relación con la vía Notch. Se afirma que la infección por el virus del papiloma humano (VPH) contribuye al desarrollo de esta enfermedad en 99%.⁵² El primer estudio realizado sobre Notch en CaCu en humano señala que su expresión está asociada a poblaciones celulares específicas: células escamosas del cérvix en carcinomas *in situ* e invasivos. Se observó, además, que la distribución subcelular de Notch-1 cambia en la medida en que la enfermedad progresa de preneoplasia (NIC3), con altas concentraciones de Notch-IC en el citoplasma a altas concentraciones de Notch-IC en el núcleo en carcinomas microinvasivos.*

La transformación no se ha confirmado en tumores que progresan en forma natural, sino sólo al inducir *in vitro* la expresión simultánea de Notch-IC y oncoproteínas como E1A de adenovirus, E6 y E7 de VPH, RAS, MYC, o el antígeno T del virus de simio 40 (SV40T). Estas oncoproteínas tienen la propiedad de anular el punto de control G1-S del ciclo celular. Por lo tanto, no es probable que la contribución de Notch en tumorigénesis sea la de revocar este punto de control, sino más bien la de proveer de características oncogénicas a las células, tal como lo es la resistencia a apoptosis, anoikis, o diferenciación.⁸

Para explicar las aseveraciones antes descritas, se estudió el papel que desempeña la expresión espontánea de Notch-1 en CaCu. Se llevaron a cabo estudios de silenciamiento de Notch-1 a través de siRNA (*small interfering RNA*) e inhibición farmacológica de la enzima g-secretasa. Ambos experimentos muestran que la susceptibilidad de las células transformadas de CaCu se incrementa en gran medida al tratarlas simultáneamente con altas concentraciones de cisplatino (tratamiento sistémico de uso cotidiano en pacientes con CaCu), al activar a la caspasa 3 y, como consecuencia, la inducción a apoptosis. Los resultados indican que el efecto primario de Notch-1 en CaCu es el de transducir una señal de supervivencia. En resumen, estos datos apoyan el modelo en el cual la expresión sostenida y endógena de Notch-1 protege a las células cancerosas de la inducción a apoptosis y, por lo tanto, puede ser explotado como blanco potencial en el tratamiento de CaCu.⁵³

* Song LL, Vijaya Chaturvedi V, Mascarenhas J, Sanne Weijzen S, Kast WM, Santos L, *et al.* Endogenous Notch-1 inhibits apoptosis in cervical cancer cells by non-transcriptional activation of NF- κ B via the PI3 kinase-AKT pathway. *Cancer Res* (sometido 2005).

Notch y terapia del cáncer

En resumen, los estudios reconocen al sistema de señalización Notch como un blanco modelo para el desarrollo de fármacos en la erradicación de cáncer y otras enfermedades. A continuación se describen algunos ejemplos con propósitos biofarmacéuticos, específicamente antagonistas (inhibidores) y agonistas de la vía Notch y, por último, sus aplicaciones potenciales en cáncer.

Dentro de los inhibidores experimentales, se han desarrollado proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales dirigidos contra las repeticiones 11 y 12 de la región EC de Notch (rh11-12), que es el sitio de unión de Notch con su ligando.⁵⁴ La ventaja de desarrollar proteínas recombinantes de este tipo es que son fáciles de expresar, tienen un peso relativamente pequeño (aproximadamente 10 kDa) y, por lo tanto, es probable una biodistribución extravascular eficiente. Una desventaja de este tipo de moléculas es el tamaño, ya que éste permite una rápida eliminación a través del riñón y, por ende, un tiempo de vida corto. Es posible que se llegue a producir una proteína de fusión que contenga la región Fc de inmunoglobulina, incrementando así su masa molecular y biodistribución, como en el caso del receptor del factor de necrosis tumoral (p75 TNF).⁵⁵

Otra alternativa es el uso de derivados biofarmacéuticos a nivel de la proteína Fringe. Estas son proteínas secretoras extracelulares que modulan las interacciones entre Notch-ligando en *Drosophila* (figura 1). Se ha sugerido el uso de proteínas recombinantes Fringe para modular la señalización Notch en humano.^{2,56,57}

En el caso de agentes antisentido, Austin y colaboradores utilizaron oligonucleótidos antisentido dirigidos contra tres regiones diferentes del RNAm de Notch-1 para reducir la expresión de Notch-1 en cultivos de células precursoras de retina de pollo (método propuesto por Altshuler y Cepko, 1992). Estas regiones son: a) la región EGF-like; b) la región lin12/Notch del dominio extracelular, y c) la región cdc/ankirina de la región intracelular de Notch. El efecto es la aceleración en la diferenciación de células precursoras ganglionares.⁵⁸

Por otro lado, la transfección de un oligonucleótido antisentido dirigido contra los residuos de ankirina en la porción Notch-IC en células 3T3L1, inhibe por completo la expresión de Notch-1.⁵⁴

Shelly y colaboradores han logrado inducir apoptosis en células eritroleucémicas murinas (MEL) mediante la utilización de oligonucleótidos antisentido, o bien, forzando la expresión de RNAm antisentido durante la diferenciación con el fármaco Hexametil-

no-Bisacetamida (HMBA). Esta estrategia causa que las células MEL abandonen el programa de diferenciación para sufrir apoptosis espontánea.⁵⁹

Una ventaja adicional del uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra Notch podría ser la capacidad de hacer blanco específico en las fracciones extracelular (EC) e intracelular de Notch (IC) en la activación o modulación, respectivamente.

La presenilina-1 (PS-1 es una proteína que forma parte del complejo enzimático gama-secretasa (paso 4, figura 1). Se han utilizado agentes farmacológicos inhibidores de PS-1 para prevenir la hidrólisis en la fracción TM de Notch inducida por ligando. Weng y colaboradores probaron 12 diferentes inhibidores de la PS-1, y encontraron que un derivado de las benzodiazepinas, el DFP-AA, causa supresión del crecimiento de las células T6E (línea celular leucémica-linfoblástica de células T) en concentraciones nanomolares.⁴⁵

En el caso del uso de agonistas, se han desarrollado formas recombinantes *in vitro* del ligando JAG-1, así como un péptido sintético derivado del mismo. Este péptido está formado por los residuos 188-204 de la región DSL altamente conservada de JAG-1 y -2 e inhibe la diferenciación inducida en la línea celular mieloides 32D que expresa Notch-1.^{60,61} No obstante, cabe mencionar que los péptidos activos como el anterior están diseñados en regiones que contienen altos contenidos de cisterna, por lo que pueden formar estructuras plegadas para su estabilización a través de puentes disulfuro. Estas características son desventajas dado que se puede llevar a cabo oxidación y formación de puentes disulfuro al azar, y agregación y pérdida de actividad biológica durante el almacenamiento. Se podría optimizar el diseño de tales agonistas sustituyendo los residuos de cisteína por otros aminoácidos con el uso del "diseño racional".⁶² Se han sugerido mezclas de agonistas/antagonistas en la línea celular S2 de *Drosophila* (expresión de proteínas heterólogas).⁶⁰ Dependiendo de las afinidades relativas ligando-ligando y ligando-receptor, sería posible el uso de ligandos solubles que puedan secuestrar moléculas de ligando, formando así complejos homotípicos (e.g. Delta-Delta) y reduciendo la concentración de moléculas de ligando disponibles para unirse a Notch. Al utilizar concentraciones más altas, una vez que los ligandos endógenos estén saturados, sería posible observar el efecto agonista del ligando exógeno libre para interactuar con Notch. Con base en la dosis, este modelo podría predecir el efecto agonista o antagonista de un ligando soluble. El uso clínico de los ligandos recombinantes de Notch y de los péptidos sintéticos estará determinado por consideraciones farmacológicas como

la farmacocinética, el volumen de distribución, el acceso a compartimentos extracelulares, etcétera.⁵⁶

En el caso de la terapia génica, se podrían usar los mediadores de Notch (e.g. Deltex) para alcanzar una activación inducible de los factores de transcripción y producir un efecto parcial parecido al de Notch. En la naturaleza, el virus Epstein-Barr usa este efecto. La proteína viral EBNA2 mimetiza la señalización Notch al convertir al represor transcripcional CBF-1 en su forma activante.⁶³

El desarrollo de los agentes antineoplásicos basados en las estrategias experimentales antes mencionadas requerirá, además de estudios enfocados a los efectos sistémicos adversos, el desarrollo de liberación del fármaco de forma que permitan mayor especificidad sobre un determinado órgano blanco.⁷

Discusión

En la actualidad, sólo 2 a 4% de los casos con cáncer en el mundo responden a la quimioterapia. Por otra parte, estos agentes farmacológicos producen graves efectos secundarios, además de tener una efectividad limitada. Por ejemplo, los derivados del platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, entre otros) se utilizan en el tratamiento en una amplia variedad de tumores malignos de ovario, cuello del útero, pulmón, testículo, vejiga, mama, próstata, piel, páncreas, etcétera. Su efectividad está basada en la habilidad para formar complejos con el ADN, a fin de inducir la muerte celular programada. No obstante, son responsables de efectos colaterales severos irreversibles de tipo nefrotóxico y ototóxico, lo que representa un obstáculo para extender su uso. Es por ello que la introducción de nuevas estrategias para mejorar la eficacia y especificidad en el tratamiento del cáncer se hace necesaria.

Las evidencias presentadas indican que el sistema de señalización Notch está frecuentemente desregulado en cáncer y, por lo tanto, su modulación ofrece una nueva estrategia terapéutica. Los estudios sobre la vía de señalización Notch han revelado la importancia de su función al controlar las decisiones del destino celular, incluyendo eventos en el desarrollo, renovación de células troncales y diferenciación en diversos tejidos. Con el objeto de regular la señalización Notch en condiciones patológicas, se ha considerado el uso de proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, anticuerpos monoclonales, oligonucleótidos antisentido y terapia génica, mismo que significa un campo de investigación prometedor para la industria biofarmacéutica en el desarrollo de agentes antineoplásicos.

El enfoque de la terapia génica en cáncer representa una tecnología emergente como nueva opción de tratamiento. El uso de adenovirus oncolíticos es especialmente prometedor, ya que éstos pueden replicarse selectivamente en células tumorales, teniendo como blanco lesiones inherentes en cáncer, o la incorporación de promotores específicos de tejido que sometan a los genes tempranos a iniciar la replicación viral.⁶⁴ La terapia con adenovirus oncolíticos ha mostrado los mejores resultados y logra un efecto tumorocida aumentado cuando se utiliza en combinación con agentes quimioterapéuticos en bajas dosis como el cisplatino, la leucovorina y el 5'-fluoracilo. Además, las formulaciones de liposomas con genes como Notch podrían superar barreras en las aplicaciones de terapia génica en un escenario clínico.⁶⁶ Estos estudios se han utilizado ampliamente en cultivos celulares y en animales transgénicos para activar el sistema de señalización Notch. Sin embargo, al utilizar formas variantes de los receptores Notch, se induce a una actividad transformante junto con algunos virus oncogénicos,⁶⁴ y además se ocasionan linfomas de células T cuando se introducen en células hematopoyéticas progenitoras de ratón.⁶⁵ De este modo, es obvio que el uso potencial de variantes de Notch expresados constitutivamente para la terapia génica implica un gran número de aspectos de bioseguridad, aun usando vectores inducibles. La alternativa más razonable es mimetizar funciones de Notch a través de proteínas virales como se mencionó anteriormente. No obstante, se desconoce si esta estrategia implica los mismos desafíos que representa la expresión constitutiva y activa de Notch.

Las vías potenciales indirectas que podrían utilizarse para regular positivamente a la señalización Notch son: a) la inhibición del supresor de la degradación/ubiquitinación del receptor mediado por Deltex, o b) la regulación negativa de los moduladores de la actividad de Notch como la proteína Notchless o Numb. Estas dos opciones podrían llevarse a cabo mediante el método antisentido o también a través de fármacos sintéticos permeables a la célula que inactiven estos blancos.

El desafío actual es llevar estas estrategias probadas experimentalmente *in vitro* e *in vivo* a una etapa posterior, es decir, a estudios pre-clínicos farmacológicos con la finalidad de evaluar el costo-riesgo-beneficio. El primer paso lo ha dado la compañía Viragen, Inc. (patentes no. 60/102,816, 09/806,440, y 60/124,119), donde se explota la tecnología de los anticuerpos monoclonales para inducir apoptosis en células tumorales utilizando específicamente al receptor Notch-1, para los cuales consideran al cáncer cervicouterino, cáncer de mama y cáncer pulmonar.

Agradecimientos

Se agradece al doctor Rubén H. López-Revilla, Jefe de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPI-CyT) su valiosa ayuda en la discusión y preparación de este manuscrito.

Referencias

1. Morgan, TH. The theory of the gene. *Am Nat* 1917; 51:513-544.
2. Wu JY, Rao Y. Fringe: Defining borders by regulating the Notch pathway. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9:537-543.
3. Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 1985; 43:567-581.
4. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284:770-776.
5. Kidd S, Kelley MR, Young MW. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: Relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol* 1986; 6:3094-3108.
6. Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Honjo T, et al. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-Jk/Su(H). *Curr Biol* 1995; 5:1416-1423.
7. Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: A new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003; 22:6598-6608.
8. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: Oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003; 3:756-767.
9. Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* 1999; 154:785-794.
10. Qi H, Rand MD, Wu X, Sestan N, Wang W, Rakic P, et al. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 1999; 283:91-94.
11. 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.
12. Johnston SH, Rauskolb C, Wilson R, Prabhakaran B, Irvine KD, Vogt TF. A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch pathway. *Development* 1997; 124:2245-2254.
13. Sundaram M, Greenwald I. Suppressors of a lin-12 hypomorph define genes that interact with both lin-12 and glp-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1993; 135:765-783.
14. Spana EP, Doe CQ. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 1996; 17:21-26.
15. Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 1999; 18:2196-2207.
16. Kadesch T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14:506-512.
17. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 2004; 131:965-973.
18. Bigas A, Martin DIK, Milner LA. Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* 1998; 18:2324-2333.

19. Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, Kitajewski J. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:5643-5648.
20. Mitsiadis TA, Regaudiat L, Gridley T. Role of the Notch signalling pathway in tooth morphogenesis. *Arch Oral Biol* 2005; 50:137-140.
21. Fortini ME, Artavanis-Tsakonas S. Notch: Neurogenesis is only part of the picture. *Cell* 1993; 75:1245-1257.
22. Jan YN, Jan LY. Functional gene cassettes in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:8305-8317.
23. Greenwald I. Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Review. Curr Opin Genet Dev* 1994; 4:556-562.
24. Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science* 1995; 268:225-232.
25. Coffman C, Harris W, Kintner C. Notch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* notch. *Science* 1990; 249:1438-1441.
26. Bierkamp C, Campos-Ortega JA. A zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Notch and its pattern of transcription during early embryogenesis. *Mech Dev* 1993; 43:87-100.
27. Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 1991; 113:199-205.
28. Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* 1994; 46:123-136.
29. Stifani S, Blaumueller CM, Redhead NJ, Hill RE, Artavanis-Tsakonas S. Human homologs of a *Drosophila* Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet* 1992; 2:119-127.
30. Kopan R, Weintraub H. Mouse notch: Expression in hair follicles correlates with cell fate determination. *J Cell Biol* 1993; 121:631-641.
31. Horvitz HR, Sternberg PW. Multiple intercellular signalling systems control the development of the *Caenorhabditis elegans* vulva. *Nature* 1991; 351:535-541.
32. Reaume AG, Conlon RA, Zirngibl R, Yamaguchi TP, Rossant J. Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo. *Dev Biol* 1992; 154:377-387.
33. Benedito R, Duarte A. Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene Expr Patterns* 2005; 5:750-755.
34. Baldi A, De Falco M, De Luca L, Cottone G, Paggi MG, Nickoloff BJ, et al. Characterization of tissue specific expression of Notch-1 in human tissues. *Biol Cell* 2004; 96:303-311.
35. Miele L, Osborne B. Arbitrator of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* 1999; 181:393-409.
36. ids=11506867&query_hi=20" Lundkvist J, Lendahl U. Notch and the birth of glial cells. *Trends Neurosci* 2001; 24:492-504.
37. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 2001; 20:3427-3436.
38. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 2003; 33:416-421.
39. Hasserjian RP, Aster JC, Davi F, Weinberg DS, Sklar J. Modulated expression of notch: 1 during thymocyte development. *Blood* 1996; 88:970-976.
40. Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ. Correlating notch: signaling with thymocyte maturation. *Immunity* 1998; 9: 777-786.
41. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; 66:649-661.
42. Pear WS, Aster JC. T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: A human cancer commonly associated with aberrant Notch 1 signaling. *Curr Opin Hematol* 2004; 11:426-433.
43. Gridley T. Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* 2003; 12:R9-13.
44. Kalimo H, Viitanen M, Amberla K, Juvonen V, Marttila R, Poyhonen M, et al. CADASIL: Hereditary disease of arteries causing brain infarcts and dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25:257-265.
45. Weng AP, Nam Y, Wolfe MS, Pear WS, Griffin JD, Blacklow SC, et al. Growth suppression of Pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of Notch signaling. *Mol Cell Biol* 2003; 23:655-664.
46. Jehn BM, Bielke W, Pear WS, Osborne BA. Cutting edge: Protective effects of Notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J Immunol* 1999; 162:635-638.
47. Young IC, Jeon SH, Jang J, Han S, Kim JK, Chung H, et al. Notch1 confers a resistance to glucocorticoid-induced apoptosis on developing thymocytes by down-regulating SRG3 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10267-10272.
48. Capobianco AJ, Zagouras P, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S, Bishop JM. Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. *Mol Cell Biol* 1997; 17:6265-6273.
49. Girard L, Hanna Z, Beaulieu N, Hoemann CD, Simard C, Kozak CA, et al. Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev* 1996; 10:1930-1944.
50. Rohn JL, Luring AS, Linenberger ML, Overbaugh J. Transduction of Notch2 in feline leukemia virus-induced thymic lymphoma. *J Virol* 1996; 70:8071-8080.
51. Weng AP, Aster JC. Multiple niches for Notch in cancer: Context is everything. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14:48-54.
52. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-19.
53. Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:6414-6418.
54. Song LL, Vijaya V, Mascarenhas J, Sanne Weijzen S, Kast WM, Santos L, et al. Endogenous Notch-1 inhibits apoptosis in cervical cancer cells by non-transcriptional activation of NF- κ B via the PI3 kinase-AKT pathway. *Cancer Res* 2005 (submitted).
54. Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, Font de Mora J, Park C, Miele L, Goldstein J, et al. Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. *J Biol Chem* 1997; 272:29729-29734.
55. Murray KM, Dahl SL. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) Fc fusion protein (TNFR:Fc) in rheumatoid arthritis. *Ann Pharmacother* 1997; 31:1335-1338.
56. Fleming RJ, Yi G, Hukriede NA. Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the Fringe gene in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 1997; 124: 2973-2981.
57. Zlobin A, Jang M, Miele L. Toward the rational design of cell fate modifiers: Notch signaling as a target for novel biopharmaceuticals. *Curr Pharm Biotechnol* 2000; 1:83-106.
58. Austin CP, Feldman DE, Ida JA Jr, Cepko CL. Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* 1995; 121:3637-3650.
59. Shelly LL, Fuchs C, Miele L. Notch inhibits apoptosis in murine erythroleukemia cells and it is necessary for differentiation induced by hybrid polar compounds. *J Cell Biochem* 1999; 73: 164-175.
60. Li L, Milner LA, Deng Y, Iwata M, Banta A, Graf L, et al. The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity* 1998; 8:43-55.
61. Fehon RG, Kooh PJ, Rebay I, Regan CL, Xu T, Muskavitch MA, et al. Molecular interactions between the protein products of the neurogenic

- loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 1990; 61:523-534.
62. Mukherjee A, Miele L. Chemical and Structural Approachs to Rational Drug Design. CRC Press 1994: 237-261.
63. Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 1996; 16:952-959.
64. Boulikas T. Status of gene therapy in 1997: Molecular mechanisms, disease targets, and clinical application. *Gene Ther Mol Biol* 1998; 1:1-172.
65. Martin F, Boulikas T. The challenge of liposomes in gene therapy. *Gene Ther Mol Biol* 1998; 1:173-214.
66. Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J *et al*. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* 1996; 183:2283-2291.

Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed

C. SILVA-SÁNCHEZ,^{†,§} A. P. BARBA DE LA ROSA,[†] M. F. LEÓN-GALVÁN,[†]
 B. O. DE LUMEN,[‡] A. DE LEÓN-RODRÍGUEZ,[†] AND E. GONZÁLEZ DE MEJÍA^{*,§}

Molecular Biology Division, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,
 San Luis Potosí, S.L.P., Mexico, Nutritional Sciences and Toxicology, University of California,
 Berkeley, California 94720, Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois,
 Urbana–Champaign, Urbana, Illinois 61801

Amaranth seeds are rich in protein with a high nutritional value, but little is known about their bioactive compounds that could benefit health. The objectives of this research were to investigate the presence, characterization, and the anticarcinogenic properties of the peptide lunasin in amaranth seeds. Furthermore, to predict and identify other peptides in amaranth seed with potential biological activities. ELISA showed an average concentration of 11.1 μg lunasin equivalent/g total extracted protein in four genotypes of mature amaranth seeds. Glutelin fraction had the highest lunasin concentration (3.0 $\mu\text{g/g}$). Lunasin was also identified in albumin, prolamin and globulin amaranth protein fractions and even in popped amaranth seeds. Western blot analysis revealed a band at 18.5 kDa, and MALDI-TOF analysis showed that this peptide matched more than 60% of the soybean lunasin peptide sequence. Glutelin extracts digested with trypsin, showed the induction of apoptosis against HeLa cells. Prediction of other bioactive peptides in amaranth globulins and glutelins were mainly antihypertensive. This is the first study that reports the presence of a lunasin-like peptide and other potentially bioactive peptides in amaranth protein fractions.

KEYWORDS: Amaranth; lunasin; anticancer peptides; antihypertensive peptides; bioactive peptides; HeLa cells

INTRODUCTION

Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is a traditional Mexican plant, which provides both grains and tasty leaves of high nutritional value, but it still remains as an underutilized crop. The National Academy of Sciences has stated that amaranth could be a grain with high potential for commercial exploitation because of its superior nutritional quality (1). The seed is high in protein (17%), and its amino acid composition is close to the optimum amino acid balance required in the human diet (2). The leaves also contain a high protein level (28 to 49%), unsaturated oil (45% linoleic acid), fiber (11 to 23%), and minerals such as potassium, iron, magnesium, and calcium (2). Aside from these nutritional components, amaranth seeds also contain other substances that play various biological roles in the diet, such as protease inhibitors, antimicrobial peptides, lectins, and antioxidant compounds (3–5). Aqueous extracts of *Amaranthus gangeticus* leaves have been reported to possess anticancer activity on liver, breast, and colon cancer cell lines (6). Vegetable parts of *Amaranthus tricolor* have been

likewise found to have antitumor and anticell proliferation activities (7).

Lunasin is a unique 43 amino acid peptide whose cancer preventive properties have been demonstrated in a mammalian cell culture model and in a skin cancer mouse model against chemical carcinogens, oncogenes, and inactivators of tumor suppressor proteins (8). Its carboxyl-end contains nine Asp (D) residues, an **Arg-Gly-Asp** (RGD) cell adhesion motif, and a helix with structural homology to chromatin-binding proteins. Lunasin was found in the 2S albumin storage protein of soybean, and its appearance is reported to coincide with the initiation of mitotic arrest and DNA endoreduplication in the developing soybean cotyledon (8–10). The presence of lunasin in barley (11) and wheat (12) suggests the possibility that lunasin or lunasin-like compounds could be found in other grains. The objectives of this research were to investigate the presence, characterization, and the anticarcinogenic properties of the peptide lunasin in amaranth seeds and to predict and identify other peptides in amaranth seed with potential biological activities.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material. Since lunasin concentrations vary depending on genotype and degree of maturity (13), mature amaranth (*Amaranthus*

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: edemejia@uiuc.edu.

[†] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

[‡] University of California, Berkeley.

[§] University of Illinois, Urbana–Champaign.