

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



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

POR:

LUIS MIGUEL CANSECO AVILA

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

Octubre, 2002

e.1
C36

.U8

RC280

TM

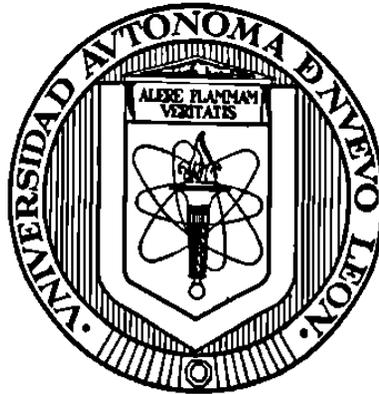
Q.F.B. LUIS MIGUEL CAMSECO

AVILLA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



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

POR:

LUIS MIGUEL CANSECO AVILA

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

Octubre, 2002

JM
RC280

.U8

C36



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

Aprobación de la Tesis:



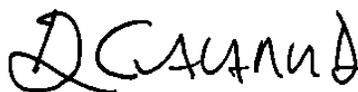
DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Co-Director de Tesis



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

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

1ª Cor: 2

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme fe y esperanza.

A mi madre:

Hermila Avila salgado

Con todo mi amor e infinito agradecimiento.

A mireya:

El amor de mi vida.

A mi familia

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TABLA DE CONTENIDO

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

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

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

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

ANEXOS

Anexo 1.- Cuestionario

Anexo 2.- Carta de consentimiento

Anexo 3.- Protocolo de secuenciación

Anexo 4.- Protocolo de precipitación con vivid violet

Anexo 5.- Diario de las reacciones de secuenciación

Anexo 6.- Diario de resultados de secuenciación

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABLAS

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

NOMENCLATURA

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

RESUMEN

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

Presenta: **Luis Miguel Canseco Avila**

Título del estudio:

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

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

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

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