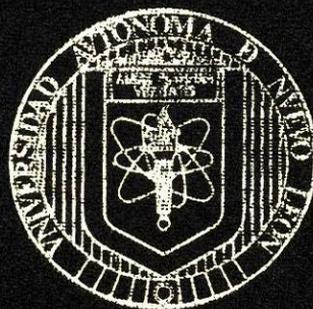


98

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEINAS BRN3 α Y
BRN3 β POR SUERO DE PACIENTES CON
CANCER CERVICOUTERINO

PRESENTA

ROSA NELLY GONZALEZ RIOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO

NOVIEMBRE DEL 2000

TK

RC280

.U8

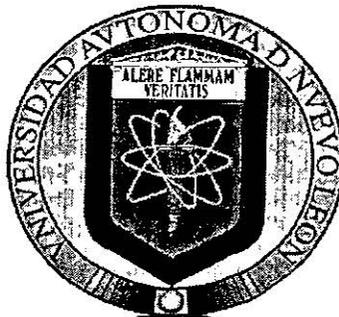
G66

c.i



1080117235

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO DE LAS PROTEINAS BRN3a Y BRN3b POR SUERO DE
PACIENTES CON CANCER CERVICOUTERINO

PRESENTA

ROSA NELLY GONZALEZ RIOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE QUIMICO BACTERIOLOGO
PARASITOLOGO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO

MAYO DE 2001

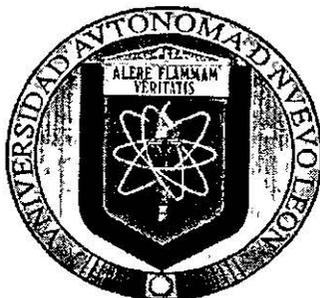
TL
RC280

.08

G66



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



COMISION DE TESIS

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Presidente

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Vocal

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en:

Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL
Bajo la Dirección del Dr. Juan Manuel Alcocer González y la Co-dirección
del Dr. Reyes Tamez Guerra

INDICE

| | pagina |
|--|--------|
| INDICE DE ABREVIATURAS | 3 |
| INDICE DE TABLAS | 4 |
| INDICE DE GRAFICAS | 4 |
| INDICE DE FIGURAS | 4 |
| ANTECEDENTES | 5 |
| 1.- IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA DEL CANCER CERVICOUTERINO | 5 |
| 1.1.- ESTADISTICAS | 6 |
| 2.- CANCER CERVICOUTERINO | 10 |
| 2.1.- INFECCIÓN | 10 |
| 2.2.- PATOLOGÍA | 12 |
| 2.3.- DESARROLLO | 12 |
| 2.4.- DIAGNOSTICO | 14 |
| 2.5.- TRATAMIENTO | 15 |
| 3.- MARCADORES TUMORALES EN CANCER CERVICOUTERINO | 16 |
| 3.1.- ANTIGENO POLIPEPTIDICO DE TEJIDO (TPA) | 17 |
| 3.2.- ANTIGENO CARCINOEMBRIONARIO (CEA) | 17 |
| 3.3.- ANTIGENO CA125 | 18 |
| 3.4.- ANTIGENO DE CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS (SCC) | 18 |
| 3.5.- ANTIGENO CIFRA 21-1 | 19 |
| 4.- PAPILOMAVIRUS HUMANO | 19 |
| 4.1.-RESPUESTA INMUNOLOGICA HACIA EL HPV | 23 |
| 5.- ANTICUERPOS CONTRA PROTEINAS DE PAPILOMAVIRUS HUMANO COMO MARCADORES DE DIAGNOSTICO PARA CANCER CERVICAL INVASIVO. | 25 |
| 6.- PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE BRN3A Y BRN3B | 26 |
| 7.- BRN3A Y BRN3B:FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EXPRESADOS EN CACU Y SU UTILIDAD COMO MARCADORES SEROLOGICOS | 28 |

| | |
|-------------------|----|
| IMPORTANCIA | 31 |
| HIPÓTESIS | 32 |
| OBJETIVOS | 32 |
| MATERIAL Y METODO | 33 |
| RESULTADOS | 40 |
| DISCUSIÓN | 50 |
| CONCLUSIÓN | 52 |
| BIBLIOGRAFÍA | 53 |

INDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|------------|--|
| CaCu | Cáncer Cérvico-uterino |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| HPV | Virus del Papiloma Humano |
| NIC | Neoplasia Cervical Intraepitelial |
| DNA | Acido Desoxirribonucleico |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| HVB | Virus de la Hepatitis B |
| TPA | Antígeno Polipeptidico de Tejido |
| CEA | Antígeno Carcinoembrionario |
| SCC | Antígeno de Carcinoma de Células Escamosas |
| CIFRA 21-1 | Fragmento de citoqueratina 19 |
| RLC | Región Larga de Control |
| POU | Pit-Oct-Unc |
| GST | Glutation Sepharosa Transferasa |
| VLP | Partículas Parecidas a Virus |
| Pb | Pares de Bases |
| LB | Luria Bertani |
| IPTG | Isopropil β -D- tiogalactosido |
| APS | Persulfato de amonio |
| SDS | Sodio lauril sulfato |
| CA 125 | Antígeno de cáncer 125 |
| ELISA | Inmunoensayo ligado a enzima |
| E6 | Proteína temprana 6 |
| E7 | Proteína temprana 7 |
| AMP | Ampicilina |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IgA | Inmunoglobulina A |
| IgM | Inmunoglobulina M |

INDICE DE TABLAS

- 1.- Principales causas de mortalidad general
- 2.- Principales causas de mortalidad en edad productiva

INDICE DE GRAFICAS

- 1.- Mortalidad por cáncer cérvico-uterino y mamario

INDICE DE FIGURAS

- 1.- Representación de la infección de HPV
- 2.- Representación esquemática de los precursores del cáncer cervical
- 3.- Virus de Papiloma Humano
- 4.- Representación tridimensional del papillomavirus humano.
- 5.- Organización genómica del papillomavirus humano.

ANTECEDENTES

1.-IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA DEL CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer constituye un problema de salud pública. En nuestro país constituyó la segunda causa de muerte en el año de 1995, con 48,222 decesos, el 11.2% del total de muertes.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados [43]. A nivel mundial el cáncer cérvico-uterino ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias, superado solo por el carcinoma mamario [44,45]. Según la OMS cada año se registran al menos 450,000 casos de los cuales cerca del 45 % fallece [46].

Mientras en países desarrollados la incidencia y la mortalidad debidas a este padecimiento han decrecido de manera significativa en este siglo, en los países pobres o en vías de desarrollo no se ha observado este descenso y, en particular, los países de América Latina se han caracterizado por notificar las mayores tasas de incidencia en todo el orbe. Se estima que en esta región, una de cada 1,000 mujeres de 35 a 55 años padece cáncer del cuello uterino, enfermedad que es precedida durante meses o años de una lesión premaligna "in situ" [48]. En México el panorama es coincidente y en el último cuarto de siglo la mortalidad ha mostrado una tendencia ascendente [49].

En la actualidad se considera que el cáncer cérvico-uterino es una de las neoplasias potencialmente curables. La posibilidad de detectar en forma temprana esta neoplasia hace factible reducir la mortalidad secundaria al padecimiento. Sin embargo, éste sigue siendo uno de los principales tumores en la mujer, y contribuye con un número nada despreciable de defunciones a nivel mundial [47].

1.1 ESTADISTICAS

El cáncer cervical es una patología de gran importancia en salud pública en el ámbito mundial. Se estima que 400,000 mujeres de todo el mundo la desarrollan anualmente y se considera la primera causa de muerte en mujeres adultas. Además es considerado uno de los más importantes problemas de salud pública en países en desarrollo donde se concentran cerca del 80% de los 500,000 nuevos casos mundiales [103]. México no es la excepción en esto, 12 mujeres mueren de cáncer cervical cada 24 horas lo cual representa más de 4,000 muertes anuales [107].

En nuestro país una de las principales causas de mortalidad general son los tumores malignos, presentando en el año de 1997, 51,245 defunciones con una tasa de 54.1, de los cuales los tumores de traquea, bronquios y pulmón presentan 6,385 defunciones con una tasa de 6.7, mientras que los tumores de estómago presentan 4,799, con una tasa de 5.1; en cuanto a los tumores de cuello del útero se refiere, estos presentan 4,534 defunciones, teniendo una tasa de 4.8 La mortalidad por tumores del cuello del útero está por encima de enfermedades como el SIDA, que presenta una mortalidad de 4,200 defunciones con una tasa de 4.4 (Tabla No. 1)

Gran parte de los estudios epidemiológicos revelan que el cáncer cervical tiene una alta prevalencia en la población productiva, a pesar de ser una enfermedad que puede ser diagnosticada en forma temprana persiste con una elevada incidencia y mortalidad en México. En nuestro país, en 1997 el cáncer del cuello del útero presenta una mortalidad en la población productiva de 2,835 defunciones con una tasa de 4.9, estando por arriba de otros tipos de cáncer como el cáncer de mama, el cual es la segunda causa de muerte en mujeres adultas presentando 2,258 defunciones con una tasa de 3.9 (Tabla No. 2)

La mortalidad por cáncer cérvico-uterino en México; ha ido disminuyendo en los últimos 10 años, presentando en 1990 una mortalidad de 10.2 defunciones con una tasa de 100,000 mujeres. Se espera que para finales de ~~la~~ 2000 alcance una mortalidad de 5.6 por 100,00 mujeres, sin embargo este tipo de neoplasia sigue siendo la primera causa de mortalidad en mujeres productivas (Gráfica No. 1).

ESTADISTICAS VITALES CAPITULO: MORTALIDAD

PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD GENERAL ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 1997

| No. de orden | CAUSA | Defunciones | Tasa 1/ |
|--------------|---|-----------------------------------|---------------------------|
| 1 | Enfermedades de corazón | 68,040 | 71.8 |
| 2 | Tumores malignos de la traquea, bronquios y pulmón del estomago del cuello del útero | 51,245 6,385 4,799 4,534 | 54.1 6.7 5.1 4.8 |
| 3 | Diabetes mellitus | 36,027 | 38.0 |
| 4 | Accidentes | 35,876 | 37.9 |
| 5 | Enfermedades crónicas del hígado | 22,865 | 24.1 |
| 6 | Neumonía e influenza | 19,867 | 21.0 |
| 7 | Enfermedades infecciosas intestinales | 7,426 | 7.8 |
| 8 | Sida | 4,200 | 4.4 |

1/Tasa por 100,000 habitantes

TABLA No. 1 Principales causas de mortalidad general
Estados Unidos Mexicanos, 1997

Fuente: INEGI, SSA/DGEL, 1998

ESTADISTICAS VITALES CAPITULO: MORTALIDAD

PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD EN EDAD PRODUCTIVA ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 1997

| No. de orden | CAUSA | Defunciones | Tasa 1/ |
|--------------|-------------------------------------|-------------|---------|
| 1 | Accidentes | 23,683 | 41.0 |
| 2 | Tumores malignos | 22,917 | 39.6 |
| | del cuello del útero | 2,835 | 4.9 |
| | traquea, bronquios y pulmón | 2,258 | 3.9 |
| | de mama | 2,256 | 3.9 |
| 3 | Enfermedades del corazón | 18,155 | 31.4 |
| 4 | Enfermedades crónicas del hígado | 15,769 | 27.3 |
| 5 | Diabetes mellitus | 14,967 | 25.9 |
| 6 | Sida | 4,052 | 7.3 |
| 7 | Neumonía e influenza | 3,318 | 5.7 |
| 8 | Tuberculosis pulmonar | 2,122 | 3.7 |
| 9 | Enfermedad infecciosas intestinales | 1,212 | 2.1 |

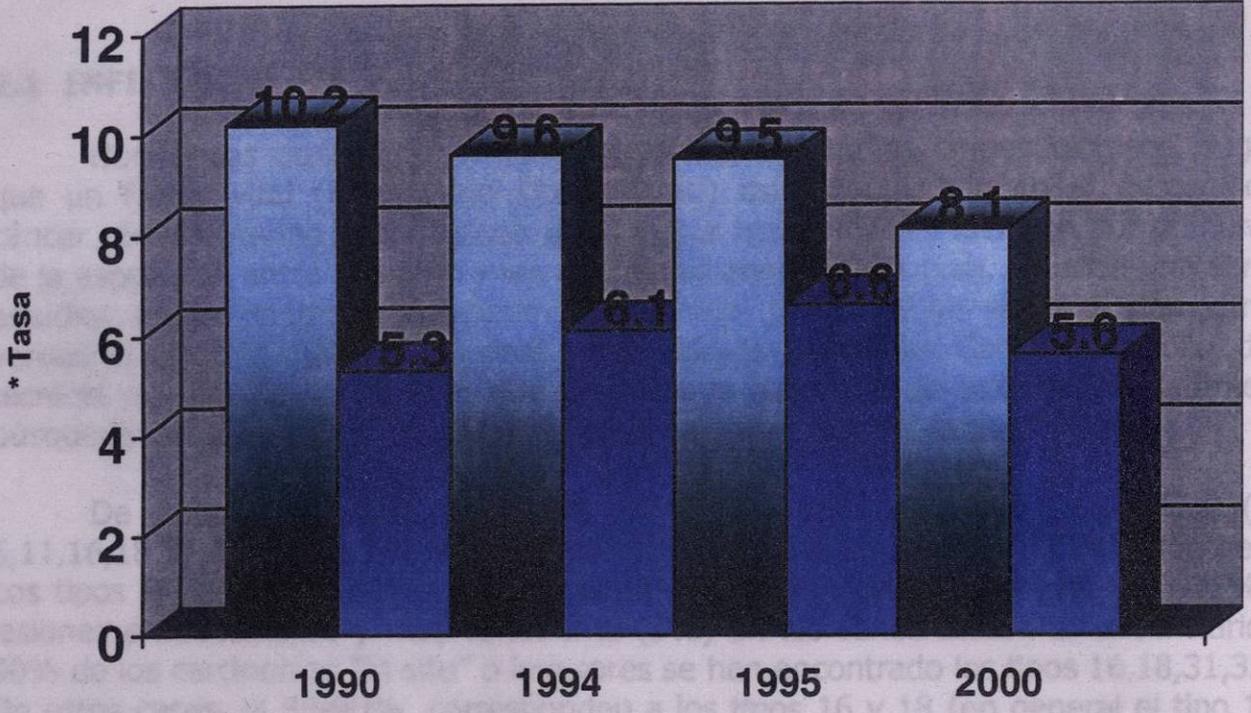
1/Tasa por 100,000 habitantes de 15 a 64 años

TABLA No. 1 Principales causas de mortalidad general en edad productiva
Estados Unidos Mexicanos, 1997

Fuente: INEGI, SSA/DGEL, 1998

7. CANCER CERVICOUTERINO

Mortalidad por cáncer de mama y de cérvix



■ Cáncer cérvico-uterino ■ Cáncer mamario

* por 100,000 mujeres

Gráfica No. 1 Mortalidad por cáncer cérvico-uterino y mamario México 2000.

2.-CANCER CERVICOUTERINO

2.1 INFECCION

Numerosas observaciones clínicas, así como estudios epidemiológicos, sugieren que un factor viral (transmitido sexualmente) está involucrado en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino [108]. A partir de que Zur Hausen hace mención por primera vez de la asociación entre los HPV y las neoplasias anogenitales [109], se inicia una serie de estudios epidemiológicos y experimentales cuyo propósito ha sido el demostrar la verdadera relación entre estos virus y este tipo de neoplasias. Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular que permiten la detección de infecciones latentes, la búsqueda de estos virus, se ha ampliado a personas que no tienen CaCu [110].

De todos los tipos descritos de HPV, sólo algunos de ellos (tipos 6,11,16,18,31,33,35) se han encontrado recientemente en tumores de la región genital. Los tipos 6 y 11 se han encontrado en 90-100% de lesiones benignas, en 25% de lesiones precancerosas y muy raramente (2%) en las cancerosas. Por el contrario, en 90% de los carcinomas "in situ" o invasores se han encontrado los tipos 16,18,31,33,35. De estos casos, el 50-90% corresponden a los tipos 16 y 18 (en general el tipo 16 es tres veces más frecuente que el tipo 18) [95].

Los órganos blanco de los HPV son la piel y las mucosas. Para que estos virus puedan penetrar e iniciar un proceso infeccioso se necesita que haya una solución de continuidad en estos tejidos, de manera que el virus pueda ponerse en contacto con las células permisivas, que son las células basales del epitelio [101].

La infección por el papillomavirus humano ocurre solamente, como ya se mencionó, en células basales que pueden dividirse; en estas, el virus no se replica y permanece en estado latente. A medida que las células epiteliales se diferencian, el DNA se replica, se transcribe y forma viriones completos. Esto sugiere que algunos factores de la diferenciación de los epitelios participan en la regulación del ciclo viral. Durante la diferenciación celular, las células se vuelven más y más permisivas para la replicación viral. Esta puede observarse en las capas suprabasales, mientras que las proteínas estructurales y las partículas vírales aparecen sólo en las capas superiores [111].

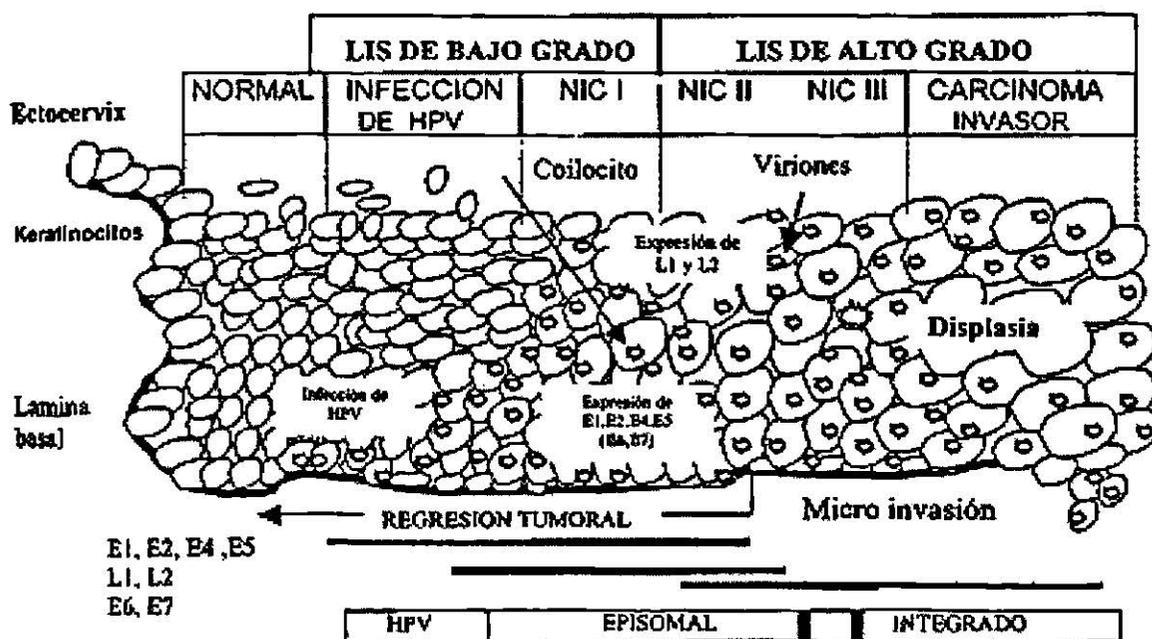


Fig. No. 1 Representación de la infección de HPV

Al infectar las mucosas genitales, los HPV inducen frecuentemente coilocitosis, caracterizadas por una gran zona clara perinuclear y a menudo binucleación. En algunos coilocitos aparecen antígenos virales de la cápside, pero otros son negativos [112].

Se ha obtenido evidencia experimental que indica que en algunos tumores de CaCU, las secuencias del HPV 16 se encuentran muy cerca o adentro del oncogén c-myc [113]; en un alto porcentaje de los tumores de CaCU el oncogén c-myc esta molecularmente alterado y presenta tanto rearrreglos como amplificación [114]. Es posible que la inserción de secuencias virales cerca de algún proto-oncogén celular pueda activar a estos últimos en posición cis [115,116].

El área de transformación del epitelio cervical, el cual es mas proliferativo durante la pubertad y la adolescencia, es especialmente susceptible a alteraciones, las cuales pueden ser inducidas por agentes transmitidos sexualmente, principalmente por infección del virus del papiloma humano. Por lo tanto, la iniciación de la actividad sexual en una edad temprana constituye uno de los principales factores de riesgo para cáncer cervical. Estudios realizados en diferentes poblaciones han producido resultados similares en términos de iniciación de la actividad sexual en una edad temprana constituyendo uno de los principales factores de riesgo para la neoplasia cervical [125].

2.2 PATOLOGIA

El resultado de la infección es el desarrollo de hiperplasia celular, lo que da origen a las manifestaciones clínicas de esta patología; verrugas vulgares, verrugas planas, pólipos, condilomas y tumores malignos [117].

En el caso específico del tracto genital, la infección puede ser clínica, subclínica o latente. La infección clínica se manifiesta por la presencia de condilomas y el periodo de incubación puede ser de seis semanas a tres meses. La infección subclínica es aquella que solamente se detecta con la colposcopia, por medio de la cual se observa en el cérvix uterino zonas blanquecinas en la mucosa que ha sido infectada por HPV. Las infecciones latentes únicamente se pueden detectar por técnicas de biología molecular [117].

El hecho de que las lesiones precursoras tardan muchos años en progresar a CaCU (cuando lo hacen), así como las evidencias de pacientes con epidermodisplasia verruciforme, cuyas lesiones progresan a carcinoma rápidamente, sugiere la participación de factores del hospedero en el desarrollo del CaCU; estudios epidemiológicos han apoyado el concepto de que el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, el número de parejas sexuales, el uso de anticonceptivos orales por tiempo prolongado, la conducta sexual de la pareja, la deficiencia de ciertas vitaminas, el tabaquismo e infecciones virales del tracto genitourinario, son co-factores para el desarrollo de esta patología [109,118 y 119].

2.3 DESARROLLO

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) es un tipo frecuente de cáncer en mujeres, y consiste en una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino. Se considera que la lesión precursora del CaCU es la neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Al parecer, las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino son parte del mismo padecimiento. Estas generalmente empiezan con una lesión bien diferenciada (NIC I o displasia leve), pasan por una fase menos diferenciada (NIC II o displasia moderada), luego una lesión intraepitelial indiferenciada (NIC III, la clásica displasia severa o carcinoma in situ), y finalmente termina en carcinoma invasor (en diversos estadios) cuando las células neoplásicas del epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente [120].

La evolución de estas lesiones a estadios invasores no es inevitable y depende del individuo. Hay lesiones preinvasoras que regresan o permanecen inalterables durante toda la vida, y sólo un porcentaje pequeño progresa hacia CaCU. El tiempo de evolución de las lesiones que progresan de NIC I a NIC III, y de éste a carcinoma invasor es muy variable, generalmente de 10 a 20 años, siendo la edad promedio de las mujeres que presentan NIC I y carcinoma invasor, de 25 y 50 años respectivamente [95].

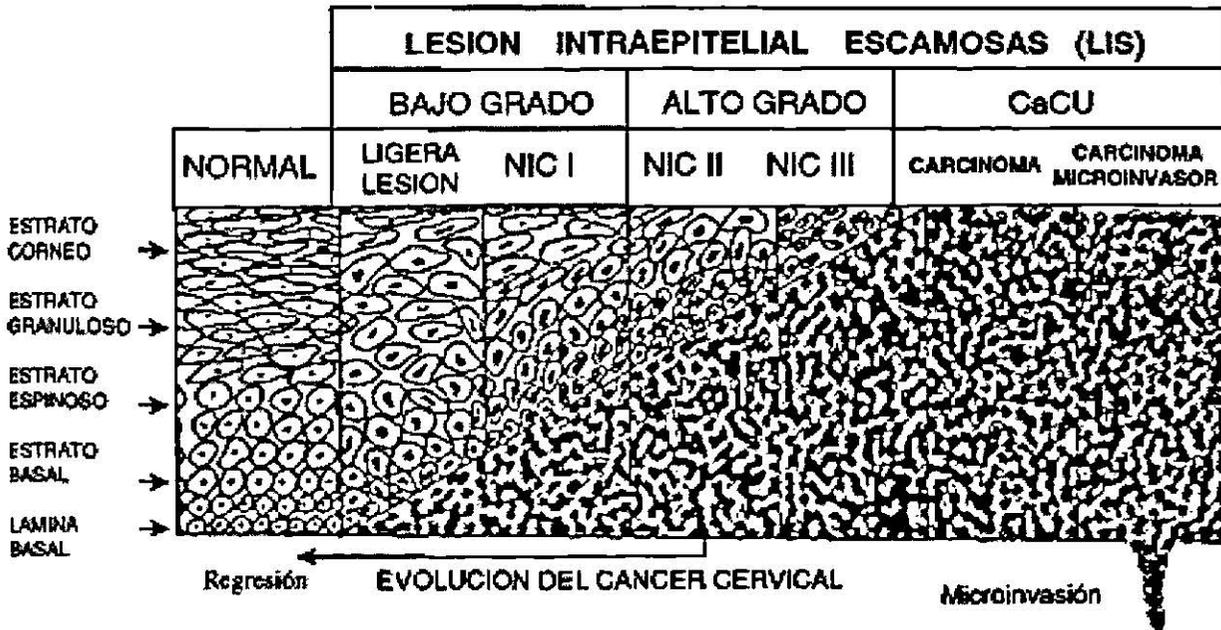


Fig. No. 2 Representación esquemática de los precursores del cáncer cervical

El cáncer cérvico-uterino presenta diversos estadios o etapas; En el **estadio 0** ó **carcinoma in situ** el cáncer que se presenta es un cáncer temprano, las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino, y no invaden los tejidos más profundos de este.

En el **estadio I** el cáncer afecta el cuello uterino, pero no se han diseminado a los alrededores. Este estadio se divide en: **estadio I-A**, en la cual se presenta una cantidad muy pequeña de cáncer, sólo visible por microscopio y se encuentra en el tejido más profundo del cuello uterino, **estadio I-B**, aquí una cantidad mayor de cáncer se encuentra en dicho tejido.

En el **estadio II** el cáncer se ha diseminado a áreas cercanas, pero aún se encuentra en el área pélvica. El estadio se divide en: **estadio II-A**, en el cual el cáncer se ha diseminado fuera del cuello uterino a los dos tercios superiores de la vagina, y en **estadio II-B**, aquí el cáncer se ha diseminado al tejido alrededor del cuello uterino.

El **estadio III** presenta un cáncer que se ha diseminado a toda el área pélvica, aquí puede haberse diseminado a la parte inferior de la vagina, o infiltrar los uréteres.

En el **estadio IV** el cáncer se ha diseminado a diversas partes del cuerpo. Este estadio se divide en: **estadio IV-A** aquí se presenta una diseminación a la vejiga o al recto, en el **estadio IV-B** se ha diseminado a órganos distales como los pulmones.

El cáncer cérvico-uterino es una enfermedad que puede ser recurrente, lo que significa que el cáncer puede volver después de haber sido tratado. Puede ocurrir en el propio cérvix o aparecer en otra localización.

2.4 DIAGNOSTICO

Existen varias técnicas para detectar la presencia del HPV en tejidos o en células. Estos métodos varían en cuanto a su sensibilidad y especificidad. Así, tenemos que durante mucho tiempo el único método utilizado para detectar HPV, era el estudio histológico de células de cérvix con tinción de Papanicolaou. Con esta técnica se pueden observar los cambios propios de las células infectadas por HPV. Estas células son los llamados coilocitos [121]. Este método tiene la desventaja de que solamente detecta infecciones activas y con gran producción de virus. Otro método también utilizado es la detección de antígenos virales por medio de la técnica de la inmunoperoxidasa, la cual también detecta solamente infecciones activas y no las infecciones latentes, aunque es mucho más específica que la anterior ya que se utilizan anticuerpos específicos contra antígenos de HPV [122].

Con el avance tecnológico de la biología molecular, se han desarrollado técnicas que han hecho posible que el diagnóstico sea más específico y mucho más sensible, en etapas tempranas de la infección. La más utilizada es la hibridación, mediante la cual se detecta el DNA viral que se encuentra en la célula huésped por medio de un DNA complementario marcado. Esta técnica supera por mucho la especificidad y sensibilidad del diagnóstico realizado por citología o por inmunoperoxidasa [123].

La técnica de PCR es a la fecha la de mayor especificidad y sensibilidad ya que es posible que una sola copia del DNA viral pueda ser detectada en 100,000 células [122].

Ya que en general no hay síntomas asociados con el cáncer cérvico-uterino, suelen ser necesarias una serie de pruebas para diagnosticarlo, como lo son:

- Citología con tinción de Papanicolaou: se lleva a cabo usando un pedazo de algodón, un cepillo o una espátula pequeña de madera para raspar suavemente el exterior del cuello uterino con el fin de recoger células.
- Biopsia: si se encuentran células anormales, se tendrá que extraer una muestra de tejido del cuello uterino y se observará a través del microscopio

para determinar la presencia de células cancerosas. Para efectuar una biopsia sólo se necesita una pequeña cantidad de tejido, pero a veces se necesita extraer una muestra de biopsia más grande en forma de cono a lo que se le llama conización.

2.5 TRATAMIENTO

Existen tres tipos de tratamientos para el cáncer cérvico-uterino los cuales son:

- **Cirugía.**- consiste en la extracción del cáncer en una operación.
- **Radioterapia.**- se utilizan radiaciones de alta energía para eliminar las células cancerosas.
- **Quimioterapia.**- utiliza medicamentos para eliminar las células cancerosas.

Algunas de las cirugías que se emplean para extraer el cáncer pueden ser:

- **Criocirugía.**- consiste en la eliminación del cáncer por congelamiento.
- **Cirugía con rayo laser.**- consiste en el uso de haz de luz intensa para eliminar células cancerosas.
- **Conización.**- consiste en la extracción de un pedazo de tejido en forma de cono en el lugar donde se encuentra la anormalidad. Se emplea para biopsia, pero también para el tratamiento de cánceres tempranos del cuello uterino.
- **Escisión electroquirúrgica.**- la cual usa corriente eléctrica que pasa por un aro de alambre delgado, el cual sirve como cuchilla.
- **Histerectomía.**- es una operación en la cual se extrae todo el útero incluyendo todo el cuello uterino, además del cáncer.

Los tratamientos para cáncer cérvico-uterino también dependerán de la etapa o estadio en que se encuentra la enfermedad, el tamaño del tumor, la edad y estado de salud en general.

3.- MARCADORES TUMORALES EN CÁNCER CERVICO-UTERINO

Los marcadores de tumor (proteínas, enzimas, hormonas etc.) pueden ser detectados y medidos en laboratorios, por muestras de sangre[23], orina, o tejidos del cuerpo de algunos pacientes con ciertos tipos de cáncer y pueden ser utilizados como monitores de los efectos de la terapia tumoral, indicadores de la recurrencia de un tumor, o la estimación de un pronóstico [23]. Un marcador de tumor puede ser producido por el mismo tumor ó por el cuerpo en respuesta a la presencia del cáncer. El uso de los marcadores de tumor para diagnosticar el cáncer es limitado, los investigadores están buscando marcadores que sean específicos de un tipo particular de cáncer y que pueda ser usado para detectar la presencia del cáncer antes de que aparezcan los síntomas.

Los cambios en los niveles de los marcadores de tumor pueden ser usados para seguir el curso de la enfermedad, para medir el efecto del tratamiento y para checar la recurrencia de esta. En algunos casos, los niveles de los marcadores de tumor pueden indicar el grado de la enfermedad (estado) ó la rapidez con la que probablemente este progresando. La detección de marcadores de tumor pueden frecuentemente ser un método accesible para detectar grupos de alto riesgo y contribuir a una adecuada determinación del tamaño del tumor y metástasis [61].

El uso correcto de los marcadores de tumor en pacientes con cáncer ginecologicos puede tener un impacto en el manejo de la enfermedad. Los niveles incrementados de varios marcadores de tumor dan información del pronóstico que puede alterar la terapia de pacientes con carcinoma temprano de ovario ó carcinoma cervical. Sus valores principales es en el monitoreo de la respuesta hacia la terapia y confirmar la recaída, para lo cual esto puede ser mejor a realizar una exploración [63].

Varios anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes nuevos en antígenos asociados a tumor permiten el desarrollo de ensayos sensitivos para marcadores en suero. El mas ampliamente aplicado procedimiento para identificar estos marcadores es la microscopia inmunofluorescente y las tinciones inmunocitoquimicas. Múltiples marcadores y modalidades pueden ser requeridas para incrementar la sensibilidad de la detección del tumor [64].

Los biomarcadores pueden ser de valor como indicadores de riesgo ó indicadores de la enfermedad. Como indicadores de la enfermedad, pueden ser de valor cuando el marcador esta unido al agente etiológico de la enfermedad, por ejemplo, marcadores para la infección por el virus de la hepatitis B (HVB), y potencialmente en el futuro, marcadores para la infección con papilomavirus humano (HPV) y para el monitoreo de cáncer de cervix [65].

Algunos de los marcadores de tumor que se han estudiado y por lo tanto han sido utilizados en adenocarcinoma de cérvix, son, antígeno polipeptido de tejido (TPA) [27], antígeno carcinoembrionario (CEA) [24,27 y 29], CA 125, [24,27-29], además del antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC) [24-28], y recientemente se ha utilizado un nuevo marcador de tumor, CIFRA 21-1 [66].

3.1 ANTÍGENO POLIPEPTIDICO DE TEJIDO (TPA)

El antígeno polipeptídico de tejido (TPA) fue reportado por Bjorklund [80], como un antígeno asociado a tumor; este antígeno es un polipeptido de cadena simple de aproximadamente 22,000 – 45,000 de peso molecular, el cual ha sido estudiado en varias otras neoplasias como marcador de tumor [80]. TPA puede ser medido por radioinmuno ensayos, la medición serial de los niveles de TPA en suero de pacientes que padecen malignidades ginecológicas presentan correlación con los efectos del tratamiento y con el curso clínico de la enfermedad [81].

Por medio de examinación inmunohistoquímica, se indica que TPA esta presente en células de cáncer [82], y está ausente en tejido normal de cérvix y endometrio [80].

Se han realizado estudios con los cuales se concluye que TPA es un marcador útil en el diagnóstico de tumores ginecológicos, especialmente para cáncer de ovario [83], además de presentar que TPA parece ser el marcador mas confiable para el manejo de cáncer cervical y endometrial [84].

3.2 ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA)

Este marcador de tumor es una proteína normalmente encontrada en cantidades muy pequeñas en la sangre de personas saludables, pero esta es elevada en algunas personas que tienen cáncer ó condiciones no cancerosas. El antígeno CEA puede ser determinado radioinmunologicamente [67]. Un nivel alto de CEA ha sido encontrado en mas de la mitad de las personas que tienen cáncer de colon, páncreas, estomago, pulmón y cáncer de mama. El antígeno CEA es un marcador para la detección de cáncer cervical y para el monitoreo del curso de la enfermedad, y ha sido presentado para ser particularmente útil en pacientes con adenocarcinoma [68].

CEA, además, ha presentado con frecuencia un incremento en casos elevados de acuerdo al estado clínico, y la frecuencia es relativamente mas alta en casos recurrentes, que en pacientes sin evidencia de enfermedad [69]. Por otro lado se tiene información de que los niveles del antígeno carcinoembrionario medido inmediatamente después de la terapia en pacientes con inicialmente niveles elevados adquiere significancia como pronostico [67].

3.3 ANTÍGENO CA125

El antígeno CA125 es una proteína producida por una variedad de células, particularmente por células de cáncer de ovario. Un elevado nivel de CA125 después de tratamiento del cáncer de ovario sugiere que algunas células están en descanso (reposo) en el cuerpo. CA125 es un antígeno epitelial el cual es ampliamente utilizado para monitorear la enfermedad residual en pacientes que están bajo quimioterapia para cáncer de ovario [70]. Además, CA125 ha sido utilizado en el monitoreo de cáncer endometrial [71]. La interpretación de los valores de CA125 en suero ha sido basada en un valor normal de 35 U/ml. el cual esta derivado de un estudio de donadores de sangre, que incluye mujeres con un sistema reproductivo intacto [70].

3.4 ANTÍGENO DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCC)

El antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC) pertenece a la familia de inhibidores de la proteasa serina y cisteína [30-32] y es una subfracción del antígeno de tumor TA-4 aislado de un carcinoma cervical de células escamosas [72]. El antígeno se encuentra presente en epitelio cervical normal y su expresión es incrementada en lesiones displásicas y en carcinomas cervicales de células escamosas [33-34]. El antígeno de carcinoma de células escamosas fue descrito por Kato y colaboradores, en pacientes con carcinoma de cérvix uterino, los niveles de este antígeno pueden ser medidos por radioinmunoensayos [73]. Este antígeno es el mejor marcador conocido para carcinoma de células escamosas de cérvix, así como también para pulmón, esófago, cabeza y cuello, y para canal anal [79]. Estudios clínicos tempranos indican una buena concordancia entre los valores del antígeno SCC en suero y el grado de la enfermedad, el pronóstico y la detección temprana de la recurrencia del tumor [35-38].

El SCC es clínicamente aplicable al monitoreo del tamaño y el volumen del tumor de carcinomas de cérvix uterino derivado del epitelio escamoso [74]. En pacientes con, inicialmente, valores negativos para el antígeno SCC pueden demostrar valores elevados con la recurrencia del tumor. Este hecho refleja la respuesta al tratamiento en pacientes que tienen un nivel elevado antes del tratamiento. El antígeno SCC es un útil marcador de tumor en el manejo de pacientes con carcinoma de células escamosas del cérvix uterino [75]. La medición del antígeno SCC en suero y el tamaño del tumor estimado por examinación colposcópica es útil en la identificación de pacientes que requieren terapia post-operativa adyuvante [76].

3.5 ANTÍGENO CYFRA 21-1

Elevados niveles del fragmento 19 de citoqueratina (cyfra 21-1) ha sido recientemente detectado en una gran proporción de pacientes con cáncer de células no pequeñas del pulmón, y en particular con carcinomas de células escamosa [79]. Además los niveles elevados de cyfra 21-1 pueden utilizarse como indicadores del estado del tumor y para pronóstico de carcinoma de células escamosas de esófago [61].

En estudios que se han realizado con cyfra 21-1 en cáncer cervical se ha concluido que este, se encuentra muy bien relacionado con el tamaño del tumor y la extensión de la enfermedad, en caso de recurrencia, este marcador aumenta mas frecuentemente que SCC y por lo tanto se ha propuesto el uso de cyfra 21-1 para el monitoreo de cáncer cervical [85].

Cyfra 21-1 puede ser de valor adicional en evaluar el estado de la enfermedad, tamaño del tumor y en la presencia de enfermedad extracervical en pacientes con cáncer cérvico-uterino [77], así como para el manejo de estos pacientes [78].

4.- PAPILOMAVIRUS HUMANO

Gran cantidad de estudios epidemiológicos revelan que la mayor parte de los cánceres están asociados a factores del medio ambiente. La mayoría de estos factores inducen mutaciones en el DNA, como lo hacen algunos virus que actúan en periodos largos y probablemente en combinación con otros agentes. En el caso particular del cáncer cervical, actualmente se considera al virus del papiloma (HPV, virus del papiloma humano) como el agente causal de esta neoplasia [86,87].

En 1976 Zur Hausen postuló la asociación entre papilomavirus obtenidos en humanos (HPV) y carcinomas anogenitales. A partir de entonces se ha acumulado evidencia suficiente que apoya el concepto de que los HPV son cofactores de este tipo de neoplasias [88].

La infección del virus del papiloma humano (HPV) (Fig. 1) se limita a epitelios escamosos (piel y mucosa), se inicia en las células basales del epitelio. La replicación del virus se encuentra aparentemente relacionada con el programa de diferenciación de las células epiteliales, posiblemente a través de proteínas celulares específicas que se unen al DNA viral y regulan la transcripción [86].

Los papilomavirus pertenecen a la familia **Papovaviridae**, estos virus se han encontrado en varias especies animales, principalmente en mamíferos [89]. Los papilomavirus se han clasificado con base a la especie animal de origen y en relación con el grado de homología genética que existe entre los papilomas de una misma especie. Esta clasificación se realiza por medio de la técnica de hibridación en fase

liquida. Aquellos virus cuya homología del DNA sea menor de 50% se consideran de diferente tipo, pero si la homología es mayor del 50% pero menor del 100% se consideran de diferentes subtipos [90]. Existen más de 75 tipos de papilomavirus humanos (HPV), aquellos capaces de infectar mucosas genitales se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo con la malignidad de las lesiones en que se encuentran. Así los HPV tipos 6 y 11 se asocian con condilomas y lesiones benignas y los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 42 y 56 se presentan tanto en displasias moderadas como en carcinomas [91].

El HPV presenta un genoma de DNA de doble cadena de una longitud aproximada de 8000 pares de bases (pb) [91]. Miden aproximadamente 50 nm de diámetro, carecen de membrana, su cápside tiene forma icosaédrica y esta compuesta por 72 capsómeros, los cuales están formados por 2 proteínas la L1 y la L2. Su peso molecular es de aproximadamente de 5.2×10^6 d. Este DNA se encuentra combinado con histonas para formar un cromosoma pequeño [92]. (Fig. 2)

Aunque los HPV despliegan una gran diversidad, su organización genómica es bastante conservada. Todos presentan siete genes de expresión temprana (E) y dos genes de expresión tardía (L), así como una región reguladora no codificadora. Todos sus genes están codificados por una sola cadena y usan un procesamiento diferencial de corte y empalme para la expresión individual de cada uno de sus genes. La capacidad oncogénica de los HPV reside en dos productos virales: las proteínas tempranas E6 y E7, cuya expresión depende de un gran número de factores celulares, y la presencia de la proteína viral reguladora E2. Asociada a E2, la proteína E1 cumple importantes funciones en la replicación del DNA viral [94]. Por su parte, los genes tardíos L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside viral [93]. (fig. 3)

El genoma contiene una región de control (RLC, región larga de control) de aproximadamente 1000 PB, en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de la replicación [95]. Una característica interesante de la RLC es que, no obstante su importancia en la regulación de los HPV, su secuencia nucleotídica es extremadamente variable entre los diferentes tipos virales [96]. De esta forma, es posible distinguir los diferentes tipos de HPV sólo con base en la secuencia de su RLC. No obstante lo anterior, la RLC conserva elementos de regulación comunes a todos ellos. Funcionalmente se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, regulado por la presencia de la proteína viral E2 y donde se localizan tanto el origen de replicación del DNA viral, como el promotor temprano [97]. En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes E6 y E7 [98,99].

La proteína E1 controla la replicación episomal del DNA, a través de la codificación de dos proteínas, una que es reguladora positiva y otra reguladora negativa [92]. E2 codifica un par de proteínas que se unen a la RLC y funcionan como factores estimuladores o inhibidores de la transcripción viral [92,101]. E3 es un marco abierto de lectura del cual se desconoce su producto proteico y por ende su función. E4 produce

varias proteínas que se encuentran en las células parabasales de los epitelios infectados y se cree que ellas inician los cambios colicíticos en estas células. Este gene se pierde cuando se integra el DNA viral al genoma de la célula [101]. E5 es otro gene que juega un papel importante en la transformación celular, produce una pequeña proteína que se une a la membrana citoplasmática. La pérdida de este gene evita la replicación liposomal del DNA y favorece la integración del DNA viral al cromosoma [92,101].

La región L contiene sólo dos genes que codifican para proteínas estructurales [92]. L1 es la proteína codificada por el gene del mismo nombre se encuentra en mayor cantidad, pertenece a la cápside, su peso molecular es de 54,000 d y la estructura primaria de esta proteína se encuentra conservada entre los virus aislados de los seres humanos y de diversos animales. La proteína L2 se encuentra en menor cantidad que la anterior, su peso molecular es de 76,000 d y es específica de cada tipo [101].

E6 es un gene que codifica para una proteína de 18,000 d, que se encuentra relacionada con la transformación maligna de las células. Este gene se encuentra conservado y activo en la mayoría de las células de CaCu estudiadas hasta ahora [92,101]. La proteína E6 tiene gran afinidad por el DNA, y se ha encontrado tanto en el núcleo como en la membrana plasmática [102]. E7 también participa importantemente en la oncogénesis. La proteína codificada por este gene causa transformación maligna de varias líneas celulares en cooperación con el gene E6 [92,101]. La proteína E7 es una fosfoproteína que se ha localizado en el citoplasma aunque reportes recientes sugieren que es nuclear [95].

Los productos de estos oncogenes participan en la inducción y el mantenimiento del estado inmortalizado de las células que contienen secuencias de HPV; dichos genes se expresan selectivamente en tumores genitales y líneas celulares derivadas de tumores humanos, y se conservan intactos durante la integración del DNA viral al genoma celular [98,100]. Estas proteínas interactúan con diferentes proteínas celulares, las cuales se conoce que están involucradas en el control del ciclo celular y en la reparación del DNA, mas notablemente, las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb [129,130]

No se sabe como ni en que momento el virus transforma a la célula [44,128]. Se sabe que los HPV 6, 11, 16 y 18 se encuentran en estado episomal y en forma productiva en las lesiones benignas y precancerosas; los HPV 16 y 18 se encuentran en forma no productiva e integrados al genoma celular en las células cancerosas y generalmente están amplificados en unas 50-200 copias por célula [44,104 y 105]. Esto parece indicar que la integración de los tipos 16 y 18 está relacionada con el proceso de malignización de las células normales o la progresión tumoral. El DNA viral generalmente se abre en la región E1-E2 durante la inserción al DNA celular [106]. Los sitios de inserción en el DNA celular al parecer son muy variados y no hay un patrón característico [46].

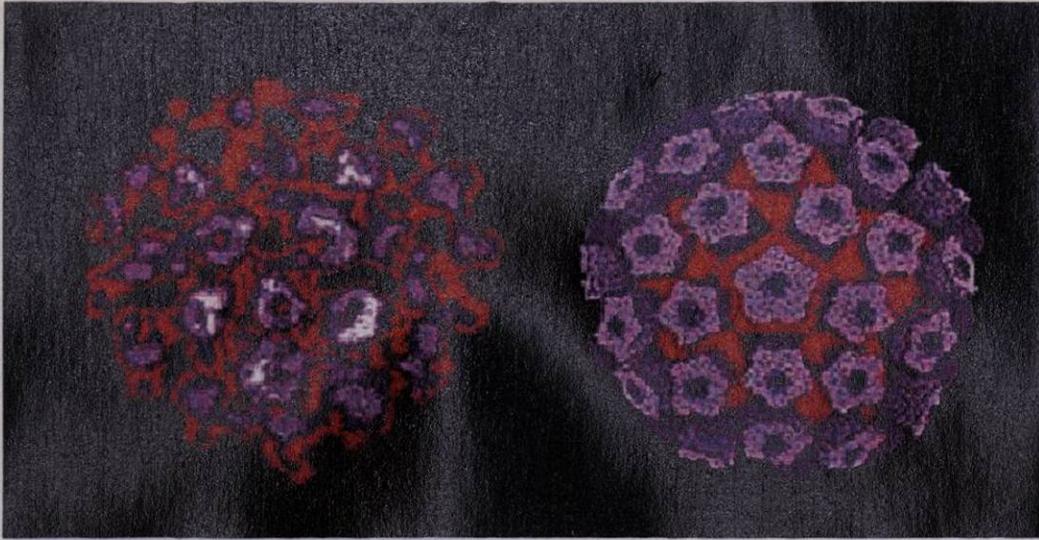


FIGURA NO. 1 PAPILOMAVIRUS HUMANO

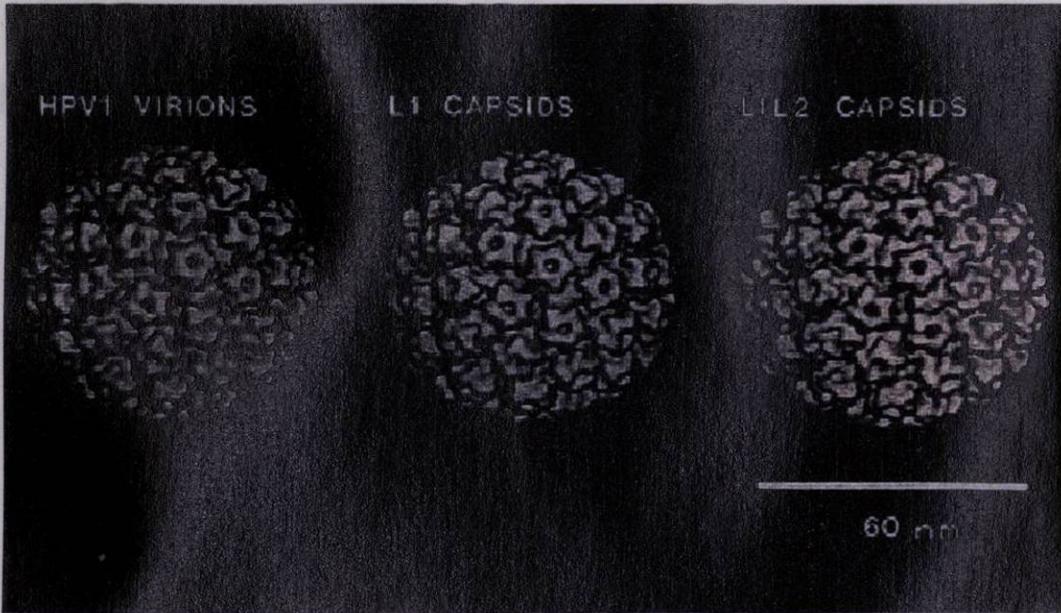


FIGURA NO. 2 REPRESENTACION TRIDIMENCIONAL DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO

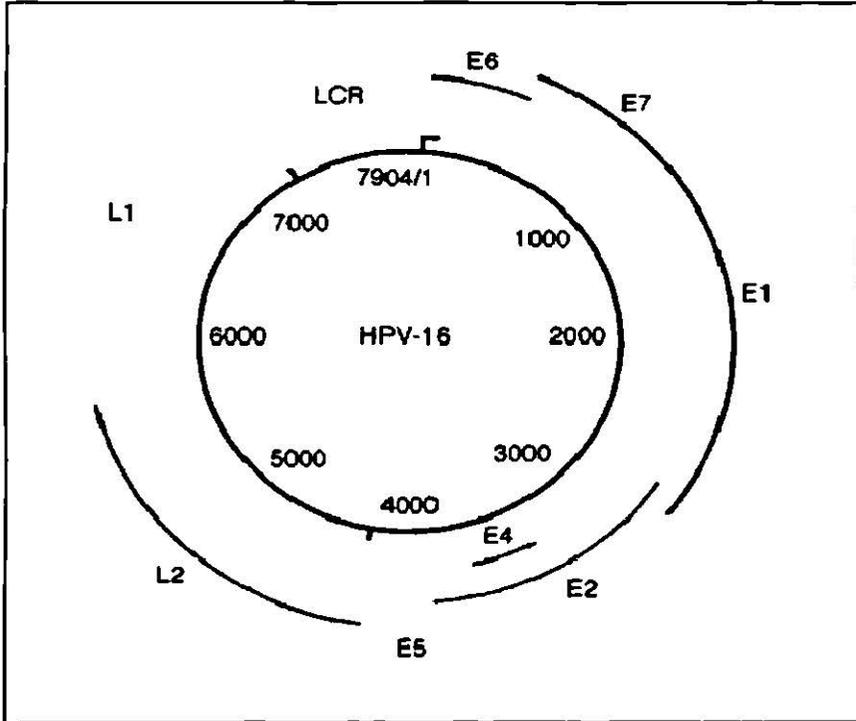


FIGURA No. 3
ORGANIZACIÓN GENOMICA DEL
PAPILOMAVIRUS HUMANO

4.1.-RESPUESTA INMUNOLOGICA CONTRA HPV

Poco se conoce acerca de la respuesta inmunológica contra el papillomavirus humano (HPV) en humanos, ya que no hay un sistema apropiado para la propagación de los viriones de HPV "in vitro", ni tampoco un buen modelo animal. Sin embargo recientemente muchos grupos de investigadores han producido partículas parecidas al virus (virus-like-particles, VLP) HPV-1 y HPV-11 en sistemas de expresión usando vaccinia virus o baculovirus. Estas capsides producidas "in vitro" parecen tener una estructura idéntica a la de los viriones auténticos, lo cual ha sido determinado por microscopía electrónica. La producción de VLPs compuestas de las proteínas de la capsida de HPV representan el mayor avance en los esfuerzos para desarrollar reactivos para estudios inmunológicos de HPV, ya que las proteínas de superficie viral son comúnmente blancos de la respuesta inmune hacia la infección. La inmunización de ratones con vaccinia virus recombinantes y/o VLP de HPV-1 genera inmunoglobulinas IgG, IgM, y IgA, estos datos sugieren que las VLP pueden sustituirse por viriones nativos.

La respuesta serológica contra las proteínas de la capsida L1 y L2 del HPV-16 han sido detectada por Western blot (inmunobloting) con proteínas de fusión derivadas de bacterias o por la técnica de ELISA con peptidos sintéticos. La respuesta de anticuerpos ha sido detectada, por estos métodos, en pacientes con neoplasia cervical, sin embargo es posible que los anticuerpos reconociendo virus intactos sean erróneos

debido a que los antígenos péptidos y las proteínas desnaturalizadas utilizadas en los ensayos carezcan de la conformación nativa. Un reporte reciente presenta que más de la mitad de las mujeres con infección cervical por HPV generan un anticuerpo IgG en respuesta a los epitopes dependientes conformacionalmente de las proteínas L1 y L2 en ELISAs usando VLP de HPV-16.

En 1997, Raphael P. Viscidi y col., realizaron un estudio cuyo propósito fue determinar la prevalencia de anticuerpos hacia proteínas de la capsida del HPV tipo 16 (HPV-16) por la técnica de ELISA en relación a la infección cervical en una población de mujeres sexualmente activas. En este estudio la presencia de anticuerpos hacia HPV-16 en estas mujeres, fue significativamente asociada con la presencia de DNA de HPV-16 en el tracto genital demostrado por PCR. La prevalencia de anticuerpos (46 %) hacia HPV-16 fue similar a lo reportado por Wideroff y col. , hubo, además, un numero significativo de mujeres positivas para anticuerpos entre aquellas con otros tipos de HPV detectados en el tracto genital (30%) y entre aquellas sin DNA de HPV detectado (19%). Estos resultados pueden indicar que las mujeres positivas para anticuerpos, hacia HPV-16, pudieron haber sido infectadas con este tipo de virus en el pasado. La seroreactividad hacia las VLPs del HPV en mujeres infectadas con HPVs estrechamente relacionados no son mas inmunologicamente de reacción cruzada que los que están relacionados distantemente. Además, en este estudio no todas las mujeres con una infección por HPV tienen anticuerpos detectables hacia el tipo de virus que presentan utilizando la técnica de ELISA. La débil respuesta de anticuerpos hacia proteínas de la capsida difiere marcadamente de la fuerte respuesta inmune humoral elicitada por muchos otros agentes infecciosos, sin embargo la respuesta de anticuerpos contra HPV fue significativamente alta entre mujeres con alta carga viral que en mujeres con una baja carga viral.

En un estudio realizado por Toshiyuki Sasagawa y col. en el que emplearon 36 muestras de pacientes con carcinoma cervical, 33 pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, y 31 mujeres citologicamente normales, las cuales fueron probadas con ELISA usando VLP's del papillomavirus humano tipo 6 (HPV-6) y tipo 16 (HPV-16) como antígenos , 40 especimenes de suero de niños de 1 año de edad fueron utilizados para asignar puntos limites . Cuando las muestras de sueros de sujetos infectados con HPV-16 fueron probadas en un ELISA -HPV -16 detectando inmunoglobulina A (IgA), IgG, e IgM, 61% presentaron IgA, 44% presentaron IgG, y un 39% presentaron IgM. De sujetos infectados con HPV-6, HPV-11 ó HPV-18 menos del 17% presentan IgA ó IgG, mientras que 33% presentaron IgM. En contraste, el 13% presentó IgA, el 10% presentó IgG y el 16% presentó IgM, en los controles (DNA-negativos). Estos resultados sugieren que las respuestas de IgG e IgA son específicas de HPV-16 y la respuesta de IgM puede ser una reacción cruzada hacia diferentes tipos de HPV. Por otro lado la respuesta serológica hacia HPV-6 no difieren en el grupo de pacientes, ni en el grupo control.

Por otra parte, Anton Petter y col. realizaron un estudio en el que evaluaron la respuesta inmune humoral hacia HPV en mujeres infectadas con HIV, en este estudio utilizaron muestras de suero de 83 mujeres HIV positivas que fueron analizadas por ELISA para anticuerpos específicos de los isotipos IgA, IgG, e IgM reconociendo VLPs

de HPV-6,11,16,18 y 31. Las lesiones relacionadas a papillomavirus estuvieron presentes en 30 de 83 mujeres HIV positivas. La reactividad positiva de IgG hacia HPV -6/-11/ y HPV-16/-18/-31 fueron vistas en 19%, 31% y 49%, 30%, 24% de las mujeres HIV positivas respectivamente. La respuesta de IgA fue comparable a la de IgG. La respuesta de IgM fue baja. La tasa extraordinariamente alta de anticuerpos hacia la proteína L1 de la capsida de los HPVs de alto riesgo (HPV-16,18 y/o31) en 58% de mujeres HIV comparada con el 19% de 102 mujeres control HIV negativas, sugiere un alto tiempo de exposición acumulativo hacia el HPV y el incremento de la expresión de las proteínas de la capsida debido a la inmunodeficiencia celular en mujeres HIV positivas.

5.-ANTICUERPOS CONTRA PROTEINAS DE PAPILOPMAVIRUS HUMANO COMO MARCADORES DE DIAGNOSTICO PARA CANCER CERVICAL INVASIVO.

Como ya es conocido, existen ciertos tipos de papillomavirus humano, principalmente 16 y 18, que han sido reconocidos como mayor factor etiológico para el desarrollo del cáncer cervical. Las moléculas activas de estos virus son las proteínas tempranas E6 y E7. Así, anticuerpos contra las proteínas tempranas del papillomavirus E6 y E7 han sido encontrados mas frecuentemente en pacientes con tumores que en controles. Sin embargo la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos anti-E6 y anti-E7 en suero humano tiene bajos niveles de sensibilidad y especificidad y así, estos no son útiles para uso como herramientas de diagnostico.

Wolfgang y col. realizaron un estudio en el cual analizaron un pequeño numero de muestras de suero con lesiones cervicales premalignas. Las frecuencias de reacciones positivas a HPV-E6 y/o HPV-E7 fueron mucho más bajas con estos sueros que con los sueros de pacientes con carcinoma cervical invasivo. El alto grado de asociación de los anticuerpos anti-E6 y anti-E7 con la enfermedad y la ausencia de estos anticuerpos en la población sin cáncer fuertemente sugiere que E6 y E7 no son expresadas en cantidades suficientes y/o no están en el sitio apropiado para ser accesibles al sistema inmune durante las infecciones primaria y latente.

Anticuerpos contra las proteínas E6 y E7 del HPV tipo 16 y 18 han sido encontradas para ser fuertemente asociadas con el cáncer cervical, pero los valores específicos de serología para el diagnostico de esta enfermedad es todavía cuestionable. Los ensayos de ELISAs que usan pequeños epitopes lineales de las proteínas para la detección de anticuerpos tienen bajos niveles de sensibilidad y especificidad para la detección de la enfermedad. Los ensayos de inmunoprecipitación con proteínas nativas enteras pueden también detectar anticuerpos contra epitopes conformacionales y tienen un ligero incremento en la sensibilidad y especificidad, sin embargo el manejo del procedimiento para estos ensayos son complejos y requieren sofisticados métodos de laboratorios y por lo tanto estos no son convenientes para pruebas de rutina de un gran numero de muestras.

6.- PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE BRN3A Y BRN3B

Las proteínas Brn3a y Brn3b pertenecen a la familia POU (Pit-Oct-Unc) de factores de transcripción expresados en células neuronales y células cervicales pero no en otro tipo de células [12]. Dentro de esta familia, los diversos factores son clasificados de acuerdo a la similitud de sus dominios POU comunes, los cuales constituyen el dominio de unión al DNA de estas proteínas y consiste de un dominio específico POU y un homeodominio relacionado a encontrarse en las proteínas homeobox. El Brn3a pertenece a la subfamilia IV POU; la cual también incluye a Brn3b y Brn3c. Estos tres factores Brn3 están estrechamente relacionados unos con otros, dentro de dominio POU, pero presentan poca homología fuera de este, y son codificados por diferentes genes [18]. El dominio POU consiste de dos subdominios separados, el dominio específico-POU y el homeodominio POU separado por una región corta de enlace flexible [17,56]. Brn-3a y Brn-3b presentan seis diferencias en la región de enlace, pero son idénticos en el dominio POU específico y solo tienen una diferencia en el homeodominio POU [14,125]. En la posición 22, Brn-3a presenta un residuo de valina, mientras que Brn-3b presenta isoleucina. Además, diferentes isoformas de Brn3a y Brn3b resultan del empalme alternativo de los genes que codifican estas dos proteínas [13,15,18,50]. Ambas proteínas (Brn3a y Brn3b) parecen reconocer y unirse a la misma secuencia de DNA en la conformación de doble cadena [19,54,55,].

No obstante su similitud, Brn3a y Brn3b tienen efectos antagonistas en la transcripción de varios genes diferentes expresados en células neuronales. Así, mientras Brn3a activa los genes que codifican los neurofilamentos [51], la proteína relacionada a α -internexin [52] y SNAP-25 [53], Brn3b reprime estos promotores e interfiere con su activación por Brn3a.

Así, la simple mutación de isoleucina en la posición 22 del homeodominio de Brn-3b hacia la valina encontrada en Brn-3a elimina el efecto inhibitorio de Brn3b en la transcripción basal y la activación del gene por Brn-3a y también lleva a Brn-3b a actuar como un activador [15,55,125].

Por lo tanto, los Brn3 probablemente jueguen un papel crítico en el desarrollo del sistema nervioso de mamíferos, debido a que la inactivación del gene de Brn3b en ratones "knock out" resulta en la ausencia de neuronas de retina, mientras la inactivación similar del gene de Brn3c lleva a la ausencia de neuronas olfatorias [57], y la inactivación de Brn3a lleva a la pérdida de tanto el motor sensorial, como el neuronal [58], lo cual lleva a la muerte de los animales en un corto tiempo después de su nacimiento, indicando la importancia de Brn3a en el desarrollo del sistema nervioso [59].

Ambas Brn3a y Brn3b son expresadas como isoforma corta y larga. La forma larga de Brn3a, Brn3a (L), es capaz de transformar oncológicamente fibroblastos. Por contraste la forma corta de Brn3b, Brn3b(S), no puede transformar fibroblastos pero es capaz de inhibir específicamente la actividad transformante de Brn3a. Además Brn3(L) puede actuar como un transactivador transcripcional, mientras que Brn3b(S) no solo es incapaz de hacer esto, sino que inhibe específicamente la actividad transactivadora de Brn3a(L) [124].

Brn3a(L) y Brn3b(S) presentan actividades antagonistas [18]. Se ha mostrado que las actividades opositorias y antagonistas de estas proteínas, Brn3a(L) y Brn3b(S), son debido a sus diferentes propiedades de unión al DNA. Brn3a(L), puede formar complejos estables con varios octameros relacionados a las secuencias de DNA blanco; Brn3b(S) no solo es incapaz de unirse a estas secuencias blanco, sino que además puede disrumpir los complejos entre Brn3a(L)-DNA [124].

Hay dos posibilidades para explicar la falta de complejos Brn3b(S)-DNA; la estructura molecular de Brn3b(S) en contraste a Brn3b(L) puede inhibir el acceso del dominio POU a DNA por obstrucción estérica, o alternativamente, Brn3b(S) puede contener un dominio inhibidor que interactúa con su propio dominio POU en una manera que interfiere con la unión al DNA [124].

La proteína Brn3a es codificada por un solo gene, la transcripción de este ocurre por dos distintos promotores [18] y contiene dos dominios de activación los cuales son importantes para la activación de distintos genes y son localizados respectivamente en el N-terminal y en el C-terminal coincidente con el dominio POU [59]. La transcripción del promotor 5' seguida por la modificación transcripcional para remover un intron entre el primero y el segundo exon resulta en la forma larga de la proteína Brn3a. En contraste el uso de un promotor localizado dentro del intron 3' del primer exon resulta en la producción de un RNA no madurado, el cual da una forma corta de Brn3a que carece de los primeros 84 aminoácidos [18].

Estas dos formas de la proteína son producidas en diferentes proporciones por diferentes células neuronales [50] y tienen diferentes propiedades funcionales. Así la forma corta de la proteína carece del dominio de activación N-terminal, el cual es incapaz de activar los promotores de los genes que codifican para α -internexin [52] y Bcl-2 [60], mientras la forma larga de Brn3a es evidentemente capaz de activar estos promotores. En contraste ambas formas de Brn3a pueden activar los promotores de genes cuya activación dependa del C-terminal del dominio POU, el cual esta presente en ambas formas de la molécula [59].

Así Brn3a parece tener dos distintos efectos funcionales en la célula neuronal, con la activación de su dominio N-terminal induce la expresión de Bcl-2 protegiendo así

a la célula de apoptosis, mientras que el C-terminal del dominio POU induce la expresión de un número de diferentes genes expresados neuronalmente e induce la diferenciación neuronal [59].

Brn3a también ha sido reportado como cooperador con el oncogen Ha-ras en las células transformadas y para ser sobreexpresada en algunos tumores [18]. Por lo tanto es posible que las mutaciones puedan alterar su expresión o aumentar su actividad, lo cual puede jugar algún papel en cánceres humanos específicos [59].

7.- BRN3A Y BRN3B: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EXPRESADOS EN CACU Y SU UTILIDAD COMO MARCADORES SEROLÓGICOS

El Papilomavirus humano tipo 16 y 18 (HPV-16 y HPV-18), son encontrados en la gran mayoría de las mujeres con cáncer cervical [1,2], ahora se conoce que estos virus oncogénicos juegan un papel crítico en la etiología de la enfermedad. Por lo tanto ambos (HPV-16 y HPV-18) pueden ser detectados en mujeres con anomalías cervicales indetectables o mínimas [3,4]. Aun no está bien claro que factores "disparan" a estos virus para iniciar su transformación celular hacia un fenotipo maligno.

La habilidad del HPV para iniciar la transformación celular es dependiente de las oncoproteínas codificadas viralmente E6 y E7, cada una de las cuales tiene, en cultivo, un papel en la transformación celular. Así un polimorfismo natural existe en la población humana con algunos individuos que tienen en p53 (gen supresor de tumor) un residuo de prolina en la posición 72, mientras que otros tienen una arginina en esta posición. Como p53 con el residuo de prolina es más eficazmente degradado por la proteína E6 de HPV, los individuos con este aminoácido tienen un alto riesgo de presentar cáncer cervical causado por HPV. Evidentemente otros mecanismos potenciales para la regulación de la transformación por HPV puede ser el control de la producción de las proteínas E6 y E7 por factores regulatorios celulares [126]. La transcripción de los genes que codifican E6 y E7 es controlada por una región regulatoria 5' (de la activación) LCR, del genoma viral que es preferencialmente activa en células de origen cervical [5,6]. Numerosos estudios han documentado la unión de diferentes factores de transcripción celular a la LCR [7-10], estos factores son generalmente expresados ubiquitariamente y pueden no explicar completamente la actividad específica de la LCR de la célula cervical o si esta activación lleva a la progresión de la enfermedad in vivo.

Se ha reportado, previamente, que una actividad regulatoria específica de células cervicales es capaz de unirse a la secuencia (ATGCAATT) en la LCR del HPV-16 y HPV-18, para así poder activar su expresión específicamente en líneas celulares de origen cervical [11,12]. Esta secuencia está ausente en la URR del HPV's estrechamente relacionados con HPV-6 y HPV-11, los cuales solo causan verrugas benignas.

Subsecuentemente se ha presentado que esta actividad esta mediada por dos distintos factores de transcripción (Brn3a y Brn3b) que son expresados en células cervicales y neuronales pero no en otro tipo de células [12]. El Brn3a (también conocido como Brn3.0 [13,14]) y Brn3b (conocido como Brn3.2 [14,15]) son miembros de la familia de factores de transcripción POU [16,17], que están estrechamente relacionados, pero son codificados por diferentes genes [18]. Los miembros de esta clase de factores de transcripción son definidos basándose en el dominio POU que tienen en común, el cual consiste de 2 regiones altamente conservadas, el dominio específico POU y el homeodominio POU, el cual esta separado por una región conectada pobremente conservada. El dominio POU actúa como el dominio de unión al DNA el cual reconoce y se une específicamente a secuencias presentes en el promotor del gen blanco [21]. Mas interesantemente mientras Brn3a activa la transcripción vía el motif ATGCAATT de la LCR del HPV, Brn3b reprime dicha transcripción e interfiere con la activación por Brn3a [19].

Brn3a y Brn3b constituyen un par de factores de transcripción, estrechamente relacionados, que son específicamente expresados en células cervicales y tienen efectos antagonistas en la actividad de la LCR. Es posible, por lo tanto, que el balance entre Brn3a y Brn3b "in vivo" puedan jugar un papel en la regulación de la actividad de la LCR y aumentar una producción controlada de las proteínas oncogénicas E6 y E7 y en la transformación de células hacia un fenotipo maligno.

Se han realizado estudios donde se comparan la expresión de Brn-3a y Brn-3b en material cervical de mujeres con anomalías cervicales no detectables histológicamente y con lesiones NIC3 [22].

Estos estudios presentan resultados que indican que el nivel del factor de transcripción celular, Brn3a, esta incrementado en pacientes con lesiones NIC3 comparados con los niveles observados en células cervicales normales de individuos con anomalías cervicales no detectables. Los niveles elevados de Brn3a en muestras con NIC3 comparados con las células normales sugieren que esta elevación juega un papel en la activación del gen de HPV y en los cambios celulares que resultan. Los incrementos dramáticos en los niveles de Brn3a contrastan con los niveles similares de Brn3b en todas las muestras y resultan en la elevación de la relación Brn3a:Brn3b [22].

Por otro lado, se han investigado los efectos de la manipulación artificial de los niveles de Brn3a en la expresión de los genes del HPV en líneas celulares de cáncer cervical y en su desarrollo y características de transformación. En este trabajo se ha demostrado que la manipulación de la expresión de Brn3a puede afectar los niveles de la expresión de un genoma de HPV integrado en una línea cervical celular transformada. Así, las líneas celulares (SiHa) transformadas con un plásmido de expresión antisentido Brn3a presenta una clara reducción en la expresión de HPV [126].

Además, se han realizado experimentos con los cuales se ha establecido que la expresión de Brn3a es crítica para mantener la transcripción de los genes del HPV en una línea celular de cáncer cervical. También se ha demostrado que las características del desarrollo de dichas líneas celulares son similarmente dependientes de Brn3a. Así la inhibición de la expresión usando un antisentido lleva a la reducción de la velocidad de desarrollo celular, densidad de saturación y la habilidad para cultivar en una forma independiente de anclaje [126].

Esta amplia elevación en los niveles de Brn-3a en mujeres con NIC III puede depender de su exposición a algún factor del medio ambiente que eleva los niveles de Brn-3a, o alternativamente, puede reflejar una diferencia genética en la región regulatoria del gen de Brn3a, la cual resulta en una elevación de la expresión de Brn3a en estas mujeres. En este caso este polimorfismo genético puede representar un factor de riesgo para cáncer cervical similar a tener ap 53, el gene que codifica para una proteína con una arginina en la posición 72, resultando en una degradación aumentada por la proteína E6 del papillomavirus humano [127].

Los niveles elevados de Brn3a, ya sea causados por el medio ambiente o por causas genéticas, pueden jugar un papel crítico en la activación de la transcripción viral y la progresión de la enfermedad, aunque otros factores como lo es el tipo viral, la distribución viral, y la susceptibilidad celular a la transformación pueden ser responsables de la localización precisa de las lesiones malignas [126].

I M P O R T A N C I A

El cáncer cervico-uterino representa en nuestro país un importante problema de salud pública. Por tal razón es necesario promover el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar el tratamiento y detección temprana de esta neoplasia. En el diagnóstico oportuno de las lesiones del epitelio cervical producidas por la infección de HPV 16 la prueba de papanicolao juega un papel muy importante, pero sin embargo, solo puede determinar lesiones de bajo grado y lesiones de alto grado. Actualmente no existe un marcador serológico útil para diferenciar las lesiones producidas por la infección por HPV 16. Dado los hallazgos recientes en relación a la expresión anormal de las proteínas Brn3A y Brn3B en el epitelio cervical y su relación con la activación de los oncogenes vírales de HPV 16, hemos propuesto que estas proteínas puedan funcionar como marcadores serológicos que permitan diferenciar las lesiones producidas por HPV 16 en el tracto genital. El reconocimiento serológico de estas proteínas por sueros de pacientes con diferentes lesiones por HPV 16 puede representar una nueva alternativa simple y sencilla para diferenciar las lesiones basada en el uso de estas proteínas como marcadores serológicos.

HIPOTESIS

La expresión anormal en el epitelio cervical de las proteínas Brn3a y Brn3b induce anticuerpos que pueden ser utilizados para diferenciar las lesiones cervicales producidas por la infección de HPV 16.

OBJETIVOS

1. Producción y purificación de las proteínas recombinantes de fusión Brn3a-GST y Brn3b-GST.
2. Determinar por Western Blot si los sueros de pacientes con lesiones por HPV 16 reconocen a las proteínas Brn3a y Brn3b.
3. Determinar si la seroreactividad contra las proteínas Brn3a y Brn3b correlacionan con el grado de las lesiones cervicales producidas por HPV 16.

MATERIAL Y METODO

1.- MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se utilizarán sueros de pacientes con cáncer cérvico-uterino (20 muestras) inducidas por HPV. Además se utilizarán muestras de personas sanas las cuales serán utilizadas como control negativo.

2.- VECTORES DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN *GST-BRN3A* Y *GST-BRN3B*

La transformación o introducción de plásmidos en diferentes tipos de bacterias principalmente en *E. coli* tiene sus inicios a principios de los 70's, para lograr esto, las bacterias son sometidas a un tratamiento que induce a un estado pasajero de competencia durante el cual son capaces de tomar DNA extraño de diversa fuente. Esta técnica se compone de dos pasos fundamentales: formación de bacterias calcio competentes y la transformación. Otro tipo de métodos que se han empleado son la electrotransformación y lipotransformación estos tienen una alta eficiencia de transformación sin embargo son mas caros que la utilización de cloruro de calcio para la formación de competentes [62].

En este trabajo se llevará a cabo la transformación de la cepa BL21 de *E. coli*, con el plásmido pGEX, el cual trae incluido, por separado, el gen que codifica para la proteína Brn3a y para la proteína Brn3b.

Los plásmidos pGEX son designados para inducir un alto nivel de expresión intracelular de genes ó fragmentos de genes fusionados con GST (Glutation S-transferasa) codificada por el parásito helminto *Schistosoma japonicum* [39]. Los vectores pGEX se caracterizan por presentar un promotor *tac* inducible químicamente, para generar un alto nivel de expresión y presentan además el gen *lacIq*, el cual permite el uso de cualquier cepa de *E. coli* como hospedero.

A) Formación de bacterias calcio competentes.

- 1- Activación de *E. coli*. Si la bacteria se encuentra congelada o en cultivos relativamente viejos se requiere de la activación de la bacteria para un eficiente crecimiento. Se inocula una azada de la bacteria en 5 ml. de medio LB (Luria Bertani) y se incuba toda la noche a 37 °C con agitación constante.
- 2- Se toman 100µl de cultivo de toda la noche en un tubo de 4 ml. de medio y se incuba por 3 horas a 37°C con agitación constante, es importante que no exceda a 10⁸ células/ml.
- 3- Se centrifugan a 5000 r.p.m. por 2 minutos 3 ml. del medio de cultivo con la bacteria en tubos eppendorf de 1.5 ml. 2 veces.
- 4- Se remueve las trazas de medio y se resuspende el paquete celular con 1.2 ml. de cloruro de calcio 0.1 M frío y se incuba en hielo por 20 minutos.
- 5- Se centrifuga a 5000 r.p.m. por 2 minutos, se elimina el sobrenadante y se adiciona 50 µl de cloruro de calcio frío
- 6- Las bacterias en este momento pueden ser transformadas, incubadas a 4°C toda la noche para incrementar la eficiencia de transformación o bien congeladas a -70°C para uso posterior.

B) Transformación

- 1- En un tubo eppendorf de 0.5 ml se le adicionan 20 µl de la suspensión de bacterias calcio competentes y 3 µl del plásmido (1ng de plásmido superenrollado) se incuban en hielo por 1 hora.
- 2- Se retira la mezcla (DNA y bacterias calcio competentes) del hielo y se someten a un shock de calor a 37 °C por un minuto.
- 3- Se incuba nuevamente en hielo por 1 minuto.
- 4- Se le adiciona 200 µl de medio LB sin antibiótico y se incuba a 37 °C por 20 minutos.
- 5- Se siembra en 2 cajas petri con agar LB con 100 µg/ml de ampicilina en la caja A (baja concentración) se siembran 50 µl de la mezcla DNA/bacterias y en la caja B (alta concentración) el resto de las bacterias (180 µl) y se incuban toda noche a 37 °C

6- Selección de las clonas, se seleccionan al azar colonias de bacterias que crecieron en ampicilina y se transfieren a cajas nuevas (agar LB 100 µg/ml de ampicilina), en sitios plenamente identificados con palillos estériles los cuales se introducen en tubos con 2 ml. de medio LB con ampicilina 100 µg/ml para la extracción de plásmidos e identificación de las colonias que contienen el plásmido.

C) Minipreparaciones de Plasmido

1. Centrifugar 1.5 ml. de cultivo bacteriano.
2. tirar el sobrenadante
3. resuspender en 50 µl. de solución 1
4. centrifugar 20 seg. a 13,000 rpm
5. tirar el sobrenadante
6. agregar 70 µl. de buffer (azul de bromofenol y sacarosa)
7. agregar 40 µl. de fenol
8. agitar, y centrifugar 4 min. a 13,000 rpm.
9. correr en un gel de agarosa al 1 - 1.2 % a 100 volts por 30 min. aprox.

3.- INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las proteínas fusionadas a GST son producidas en células de *E. coli* que tienen un plásmido recombinante pGEX. La expresión de las proteínas que presentan este plásmido esta bajo el control del promotor *tac*, el cual es inducido usando el análogo de lactosa isopropil β-D-tiogalactosido (IPTG).

Una vez que se tiene la cepa BL21 transformada con el plásmido para los factores de transcripción Brn3a y brn3b, se llevara a cabo la inducción de dichas proteínas, de la siguiente manera:

En un tubo de 15ml colocar 8 ml aproximadamente de medio LB + amp, inocular este medio con la cepa BL21 transformada con la proteína que se desea inducir su producción, dejar en incubación toda la noche a temperatura ambiente, y en agitación.

Una vez transcurrido este tiempo, tomar 800 µl de medio inoculado, y agregárselos a un tubo con 10 ml de medio LB+amp. Este se dejara en agitación y a una temperatura ambiente, y se le medirá la densidad óptica a 550 nm con luz visible, hasta que alcance una densidad óptica de 0.5, una vez alcanzada esta densidad se hará la inducción con IPTG 100 mM, teniendo una concentración final de 0.1 mM. Este tubo se volverá a colocar a temperatura ambiente y en agitación, y se tomaran alicuotas de 1 ml cada una, y se colocaran en tubos eppendorf, etiquetándolos adecuadamente, las

alícuotas serán tomadas cada hora por 3 horas (T1,T2,T3,), se tomara además, un tiempo cero, (T0) el cual será tomado inmediatamente después de la inducción con IPTG. Se realizará también un control, el cual no contara con IPTG, y solo será tomado el tiempo cero.

4.- GELES DE POLIACRILAMIDA

El gel de electroforesis de poliacridamida es una de las técnicas mas ampliamente utilizadas en biología molecular [20,40]. El SDS-PAGE es un importante método utilizado para la separación de proteínas basado en la migración de proteínas cargadas negativamente, dependiendo de su peso molecular, en un campo eléctrico. Este método tiene la ventaja de que las proteínas pueden ser separadas y visualizadas. La técnica SDS-PAGE provee información acerca del grado de pureza de una proteína en particular en una mezcla de proteínas aplicada en una cierta línea del PAGE durante el proceso de purificación de proteína. Cada banda en el SDS-PAGE representa una diferente proteína.

Para verificar la inducción de las proteínas deseadas se realizara un gel de poliacrilamida SDS. El gel se realizará con las muestras antes mencionadas (control, T1,T2,T3), y también se incluirá una muestra preparada a partir de una cepa de E. coli BL21 no transformada,(en la cual se espera que no aparezca la banda de la proteína inducida).

Preparación de las Muestras

- centrifugar las muestras (1 ml.) a 12000 revoluciones por 5 min.
- tirar el sobrenadante
- añadir 100 µl de buffer de lisis SDS gel 2X
- mezclar en el vortex
- calentar en agua a punto de ebullición por 10 min.
- pasar a hielo (congelar si las muestras no se van a utilizar inmediatamente).

Preparación del Gel

Poliacrilamida 12 % (5 ml)

| | | |
|----------------------------|-----|-----|
| H ₂ O destilada | 1.7 | ml. |
| Acrilamida Mix 30 % | 2.0 | ml. |
| Tris 1.5M (pH 8.8) | 1.3 | ml. |
| SDS 10% | 50 | µl. |
| APS 10% | 50 | µl. |
| TEMED | 4 | µl. |

Concentrador (10 ml.)

| | | |
|----------------------------|-----|-----|
| H ₂ O destilada | 2.1 | ml. |
| Acrilamida Mix 30 % | 500 | μl. |
| Tris 1.5M (pH 6.8) | 380 | μl. |
| SDS 10% | 30 | μl. |
| APS 10% | 30 | μl. |
| TEMED | 6 | μl. |

Preparar la cámara de electroforesis, colocando las siguientes muestras(15μl de cada una) en los carriles: *C1* marcador de peso molecular (14,000 – 70,000), *C2* BL21 sin transformar, *C3* control, *C4* T0, *C5* T1, *C6* T2, *C7* T3, *C8*T4, *C9*T5. Se prepara un gel para cada una de las proteínas, Brn3a y Brn3b, con el mismo tiempo de inducción..

Correr el gel en una fuente de poder a 100 volts, por aproximadamente 2 ½ horas, o hasta que las muestras lleguen al final del gel. Una vez terminado de correr el gel sacarlo de la cámara y colocarlo en un recipiente para llevar acabo la siguiente tinción: agregar en el recipiente Azul de Comassie, y dejarlo así toda la noche, después quitar el colorante y agregar la solución decolorante 1, hasta eliminar el exceso de colorante, posteriormente cambiar esta solución por la solución decolorante 2, dejarla ahí por 2 o 3 horas y después cambiar esta solución por la solución destaining. Una vez realizada esta tinción, el gel esta listo para ser observado.

5.- INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT

Para detectar si los sueros, con los que se trabajaría presentaban anticuerpos contra los factores de transcripción, Brn3a y Brn3b, se llevó acabo una inmunodetección por Western Blot. Esta técnica permite transferir las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida a un filtro de nitrocelulosa, donde son reconocidas mediante reacciones específicas con antígenos marcados [42].

Con las muestras utilizadas en el gel PAGE, se realizará un gel de poliacridamida al 12%, (preparado como se menciono anteriormente); una vez ya corrido, se hará una transferencia a una membrana de nylon, esto se llevará acabo en una cámara de transferencia, con un buffer adecuado. La transferencia se hará por 2 horas, a 300 miliampers constantes.

Una vez ya transcurrido este tiempo, se cerciorará si hubo transferencia colocando la membrana en un recipiente y se le agregaran algunas gotas de rojo Ponceau y agua destilada, por unos segundos, observando la membrana para ver la aparición de las bandas de las proteínas, después decolorar la membrana con agua

destilada, hasta que quede nuevamente blanca; Una vez logrado esto, se realizarán los siguientes pasos:

- 1.- hacer dos lavados a la membrana con Tween 20/ PBS al 0.05 % por 5 min. cada uno.
- 2.- bloquear la membrana con Tween 20/PBS al 2 % mas leche al 1 %, por 30 min.
- 3.- lavar la membrana con PBS 1X, hasta eliminar el Tween.
- 4.- adicionar el primer anticuerpo, preparándolo a la dilución deseada, los sueros utilizados se preparan a una dilución de 1:50, el anti-GST y anti-Brn3 se preparan a una dilución de 1:1000. Estas diluciones son preparadas con PBS 1X. El primer anticuerpo se deja 3 horas con agitación suave.
- 5.- eliminar el anticuerpo.
- 6.- realizar dos lavados con Tween/PBS al 0.05 % por 5 min. agitando suavemente.
- 7.- eliminar el Tween, con PBS.
- 8.- añadir el segundo anticuerpo, preparando una dilución 1:3000, de IgG humana (de ratón o de cabra según sea el caso) conjugada con fosfatasa alcalina, dejarlo en agitación por 2 horas.
- 9.- lavar con PBS, tres veces.
- 10.- agregar el sustrato de la fosfatasa alcalina, en este caso, BCIP/NBT.
- 11.- observar si hubo aparición de bandas en la membrana.
- 12.- detener la reacción añadiéndole agua destilada.

6.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para llevar a cabo la purificación de las proteínas se utilizó un kit para purificar proteínas unidas a GST, mediante el método de purificación en columna, Las proteínas fusionadas son fácilmente purificadas de lisados de bacterias, siguiendo los pasos indicados en el kit, se realizó lo siguiente:

INDUCCION DE LA PROTEINA

- 1.- inocular una colonia de *E. coli* transformada para producir Brn3 (ya sea 3a ó 3b, según la proteína que se vaya a purificar), en 20 ml. de medio LB dejar incubar de 12 a 16 horas, en agitación a 37 °C.
- 2.- hacer una dilución 1:100 de los 20 ml. Inoculados, agregando 80 ml. de caldo LB.
- 3.- incubar a 37 °C, en agitación de 3 a 5 horas, hasta que alcance una densidad óptica de 0.6 – 0.8, A600.
- 4.- añadir el inductor de la proteína, el cual en este caso será el IPTG 0.1 M, por ml. de cultivo, obteniendo una concentración final de 0.1M.
- 5.- incubar por 4 horas, para permitir la producción de la proteína.
- 6.- tomar 20 ml. y centrifugar a 7700 por 10 minutos.

- 7.- tirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 50 μ l de PBS 1x "ice cold" por cada ml. de cultivo centrifugado, en este caso se resuspenderá en 1 ml de PBS 1x.
- 8.- guardar 10 μ l del resuspendido celular para un análisis en SDS-PAGE.

LISIS

- 9.- utilizar un sonicador para lisar las células, haciendo sonicados de un minuto por 5 minutos, intercalando 1 minuto de descanso entre cada sonicado.
- 10.- centrifugar el sonicado por 5 min., para remover el material insoluble.
- 11.- transferir el sobrenadante a tubos nuevos.
- 12.- guardar 10 μ l para análisis por SDS-PAGE.

PURIFICACION EN COLUMNA

- 13.- eliminar el etanol al 20% que trae la columna
- 14.-lavar la columna 2 ó 3 veces con PBS 1x (hacer la dilución del PBS 10x con agua esteril)
- 15.-colocar el sonicado
- 16.- lavar 2 veces con PBS 1x
- 17.- poner 1ml. de buffer de elusión, tapan la columna y esperar 10 minutos.
- 18.- coleccionar 0.8 ml. aprox. en un tubo marcado como E1(eluido 1).
- 19.- agregar 1 ml. de PBS 1x
- 20.- esperar 10 minutos.
- 21.- coleccionar 0.8 ml. marcando el tubo con E2
- 22.-agregar el buffer 1x necesario para obtener 4 tubos mas, de aproximadamente 1 ml. cada uno.
- 23.- marcar cada tubo con E3, E4, E5, E6.
- 24.- lavar la columna 2 veces con PBS 1x
- 25.- lavar la columna con la solución 1
- 26.- lavar la columna con la solución 2
- 27.- repetir los pasos 25 y 26, dos veces cada uno
- 28.- colocar etanol 20 % en PSB 1, y guardar la columna, para usarse después.

Posteriormente, para checar si la proteína fue purificada, se correrá un gel de poliacrilamida al 12% en el cual se colocarán muestras de los eluidos además de colocar una muestra control.

RESULTADOS

Las proteínas Brn3a y Brn3b son factores de transcripción que se expresan exclusivamente en células nerviosas y células epiteliales del cérvix, para lograr tener una fuente de proteína necesaria para nuestros estudios, se obtuvieron dos plásmidos (pGEXBrn3a y pGEXBrn3b) para la expresión de la proteína recombinante en bacterias, estos plásmidos son de la familia de los pGEX y producen una proteína recombinante de fusión a glutation-s-transferasa y se puede purificar por cromatografía de afinidad a glutation reducido.

Se realizaron varios experimentos con el propósito de optimizar el tiempo y concentración de IPTG para inducir la expresión en *E.coli* de las dos proteínas de fusión, las concentraciones analizadas fueron 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mM de IPTG y los tiempos de inducción fueron 1, 2, 3, 4, y 5 horas. Las muestras de los diferentes experimentos y un control el cual corresponde a extractos totales de *E. coli* BL21 sin transformar fueron corridas en geles de poliacrilamida al 12 %, en estos geles se observan las proteínas totales de la bacteria y un incremento en una banda específica de cada una de las dos proteínas, lo cual corresponde a un aumento de producción de la proteína por efecto de la inducción. Para las dos proteínas de fusión Brn3a-GST (46Kd) y Brn3b-GST(35Kd) se logro determinar que se produce un incremento proporcional de producción de la proteína recombinante conforme se incrementa la concentración del inductor y del tiempo, logrando obtener un óptimo de producción con 5 horas de incubación con el IPTG a una concentración 1mM (Figura No. 1).

Basados en los datos anteriores, los primeros experimentos que se realizaron fueron para verificar que la proteína inducida corresponde a la proteína de interés, el factor de transcripción, Brn-3a, para esto se utilizó un anticuerpo policlonal comercial (sc-6027) que reconoce a la proteína Brn-3a. En dos experimentos realizados se observa que el anticuerpo sc-6027 reconoce una proteína del tamaño molecular esperado en los extractos totales de proteínas de la bacteria BL21 inducidos con IPTG, estos datos confirman que la proteína recombinante Brn3a producida en bacteria por fusión a GST, es una proteína con conformación natural reconocida por un anticuerpo comercial (Figura No.2 , 3 y 4)

Para confirmar los resultados anteriores fue necesario realizar un western blot utilizando las mismas muestras de proteínas, pero ahora realizamos la detección con un anticuerpo monoclonal anti-GST comercial (sc-138), el cual reconoce a la Glutation S-Transferasa, que se produce fusionada con la proteína Brn-3a. En dos experimentos realizados separadamente se encontró que el anti-GST reconoce una proteína ubicada en la misma posición, que la reconocida por el anticuerpo para la proteína Brn3a. Estos datos ratifican que la proteína recombinante Brn-3a se produce fusionada a GST en respuesta a la inducción con IPTG, además, en el segundo western blot realizado con el anti-GST, se logro demostrar que el reconocimiento de la proteína se incrementa proporcionalmente conforme al aumento del tiempo de inducción con IPTG, lo cual nos indica un aumento en la producción de la proteína Brn-3a que se encuentra fusionada a GST. Los experimentos anteriores demuestran que utilizando anticuerpos comerciales

contra la proteína Brn3a y anti-GST para su detección por Western Blot, podemos tener la seguridad de producir la proteína Brn3a en la bacteria BL21 bajo condiciones controladas y potencialmente purificarla por cromatografía de afinidad, por medio del socio de fusión GST y resinas comerciales con glutation inmovilizado. (Figura No. 5 y 6).

Uno de los objetivos de este trabajo fue purificar la proteína Brn3a mediante el método de purificación en columna, utilizando un sistema comercial para purificar proteínas recombinantes unidas a GST (Pharmacia Biotech). Para esto se realizó nuevamente el experimento de inducción con IPTG por 5 hrs. para tener proteína suficiente para purificar, las fracciones (eluidos) obtenidas después de liberar las proteínas unidas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida (Figura No. 7) para verificar si en los eluidos se encontraba la proteína Brn3a purificada, se logró detectar por tinción con azul de commassie dos proteínas presentes en los eluidos, lo cual nos hacía suponer que habíamos logrado purificar la proteína, así que nuevamente para verificar esto, fue necesario realizar la detección con el anticuerpo anti-Brn3a, después de realizar este experimento en varias ocasiones no hemos logrado detectar ninguna proteína que haya sido purificada y que sea reconocida por el anticuerpo anti-Brn3a. Usando como controles las proteínas totales de 3 y 5 horas de inducción con IPTG, con los cuales habíamos demostrado previamente que el anti-Brn3a reconoce una sola proteína, no se observó reconocimiento en ninguna de las dos proteínas detectadas por el azul commassie en los eluidos, solo hubo detección de la proteína Brn3a en las proteínas totales de 3 y 5 horas de inducción (Figura No.8).

Estos datos indican que hemos sido incapaces de purificar la proteína recombinante Brn3a por afinidad a glutation, pero esta es perfectamente inducida en la proteína total de la bacteria y es reconocida por anticuerpos comerciales. Dadas estas circunstancias nuestro único camino para determinar si los sueros de pacientes con cáncer cérvico-uterino reconocen a la proteína Brn3a, es utilizar proteínas totales de la bacteria BL21 transformada con el plásmido pGEX-Brn3a y producción de la proteína Brn3a bajo la inducción con IPTG.

Los siguientes experimentos fueron realizados con el propósito de realizar una detección rápida de la capacidad de reconocer a la proteína Brn3a en un amplio número de muestras de sueros de pacientes con cáncer cérvico-uterino. Basado en lo anterior la estrategia que seguimos fue hacer dos grupos de muestras de sueros, incluyendo 10 sueros de pacientes en cada grupo y formado por 100 µl de cada una de las diez muestras. En dos experimentos realizados con ambos grupos de muestras de pacientes con cáncer cérvico-uterino, se observó que algunas proteínas de la bacteria son reconocidas por los sueros de las pacientes, estas proteínas son frecuentemente de mayor peso molecular que la proteína Brn3a, el reconocimiento de estas proteínas por los sueros de pacientes, no es un suceso difícil de explicar, dado, que la bacteria donde se está produciendo la proteína Brn3a recombinante es una cepa de E. coli, que normalmente está en contacto con las personas y produce infecciones subclínicas que generan anticuerpos contra sus principales proteínas. Lo más importante de estos experimentos de Western Blot fue detectar con ambos grupos de sueros de pacientes una proteína localizada en la misma posición que la reconocida por los anticuerpos anti-Brn3a y anti-GST comerciales, estos datos indican que esta proteína es Brn-3a y que está siendo reconocida por anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con este

tipo de cáncer. Para determinar que el reconocimiento de esta proteína es realmente Brn3a, fueron incluidas durante estos experimentos muestras obtenidas de proteínas totales de la cepa Bl21 sin transformar con el plasmido pGEX-Brn3a, estas muestras no contienen a la proteína Brn3a recombinante y tal como se esperaba los sueros de pacientes no reconocieron a la proteína del peso molecular que corresponde a la Brn3a. (Figura No. 9 y10).

Así mismo, el reconocimiento de estas bandas es mayor conforme aumenta el tiempo de inducción de las proteínas, como se observa en los experimentos cuando se lleva a cabo la detección con el anticuerpo anti-GST. Se realizó un último Western Blot con muestras de sueros de pacientes con CaCu, en el cual se colocaron cantidades iguales de los sueros del lote 1 y 2, con el fin de confirmar la detección de la proteína Brn3a con un suero representativo de las 20 muestras de pacientes, se encontró que la banda específica para la proteína Brn3a sigue siendo detectada en forma específica y esta no aparece en el control con proteínas totales de E. Coli sin transformar con el plasmido pGEXBrn3a (Figura No. 11). Estos datos demuestran que en el suero de pacientes con CaCu existen anticuerpos que reconocen en forma específica a la proteína Brn3a.

Finalmente realizamos un experimento para determinar que en muestras de suero de mujeres normales no existen anticuerpos capaces de reconocer a la proteína Brn3a, se encontró que estos sueros normales reconocen algunas proteínas de E. Coli pero no reconocen la banda específica de la proteína Brn3a (banda señalada en la foto con una flecha) y esto fue confirmado con el control de proteínas totales de la bacteria que no están expresando dicha proteína Brn3a. Estos datos confirman que la presencia de anticuerpos contra la proteína Brn3a ocurre solo durante el proceso neoplásico, dado que sueros de personas normales no estos existen anticuerpos(Figura No. 12 y 13).

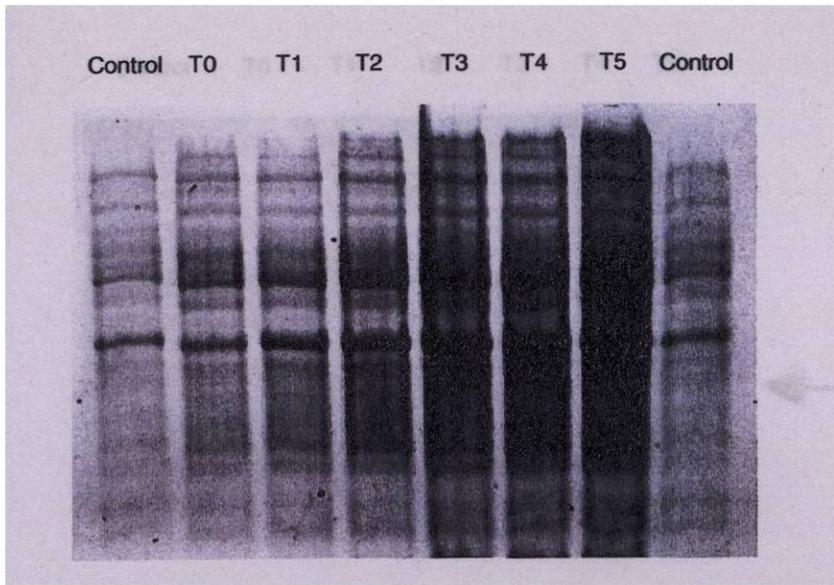


Figura No. 1 Gel de poliacrilamida al 12% donde se corrieron muestras de proteínas totales de E. Coli, El cultivo de E. Coli fue inducido con IPTG a diferentes tiempos T0 a T5 (tiempos de inducción de 0 – 5 hrs.) . Control, proteínas de bacterias sin plásmido.

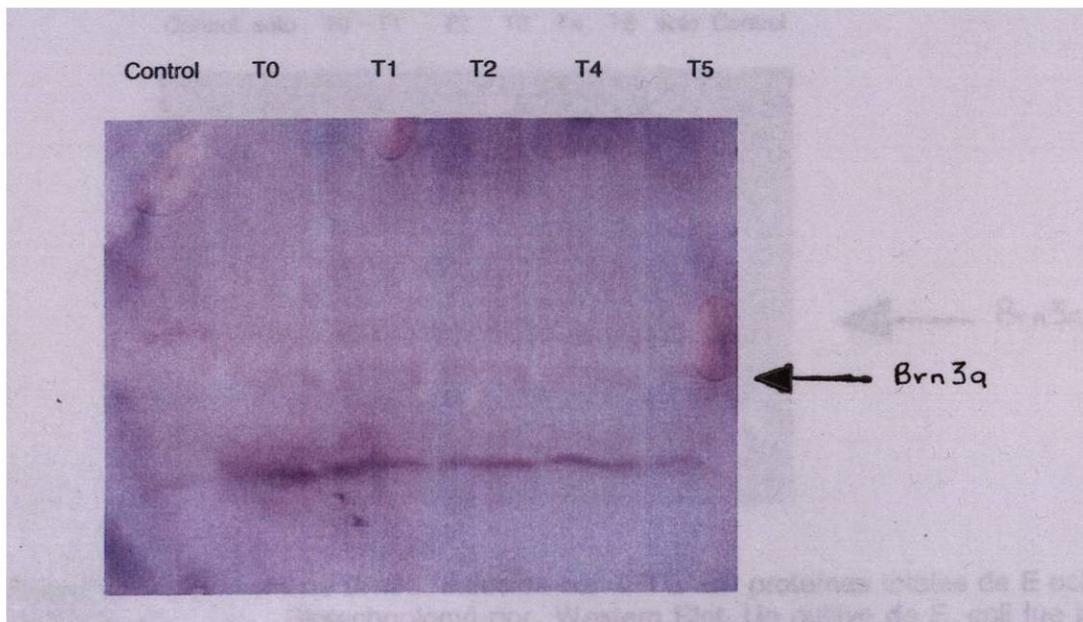


Figura No. 2. Detección de la proteína Brn3a inducida con IPTG en proteínas totales de E coli con el anticuerpo sc - 6027 (Santa Cruz Biotechnology) por Western Blot. Un cultivo de E. coli fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-cabra -fosfatasa alcalina. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0 a T5 (tiempos de inducción de 0 - 5 hrs.)

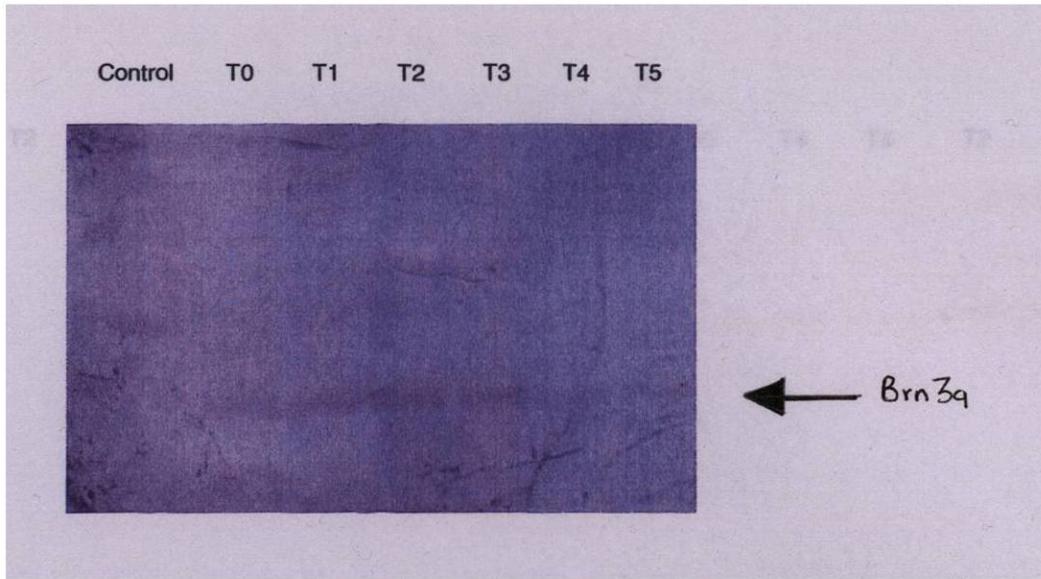


Figura No. 3. Detección de la proteína Brn3a inducida con IPTG en proteínas totales de E coli con el anticuerpo sc - 6027 (Santa Cruz Biotechnology) por Western Blot. Un cultivo de E. coli fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-cabra -fosfatasa alcalina. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0 a T5 (tiempos de inducción de 0 - 5 hrs.)

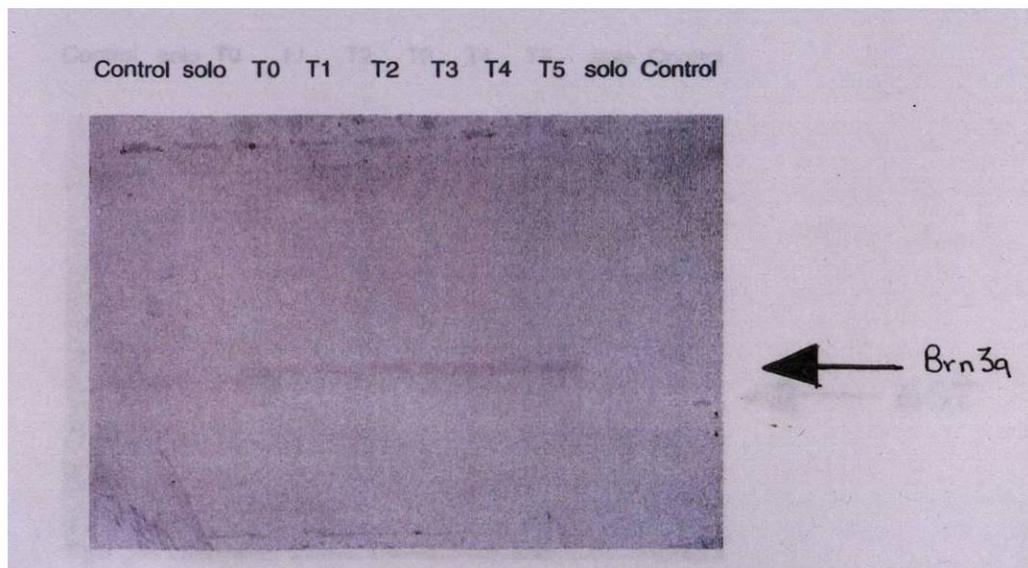


Figura No. 4. Detección de la proteína Brn3a inducida con IPTG en proteínas totales de E coli con el anticuerpo sc - 6027 (Santa Cruz Biotechnology) por Western Blot. Un cultivo de E. coli fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-cabra -fosfatasa alcalina. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0 a T5 (tiempos de inducción de 0 - 5 hrs.)

A

T5 T4 T3 T2 T1 Control

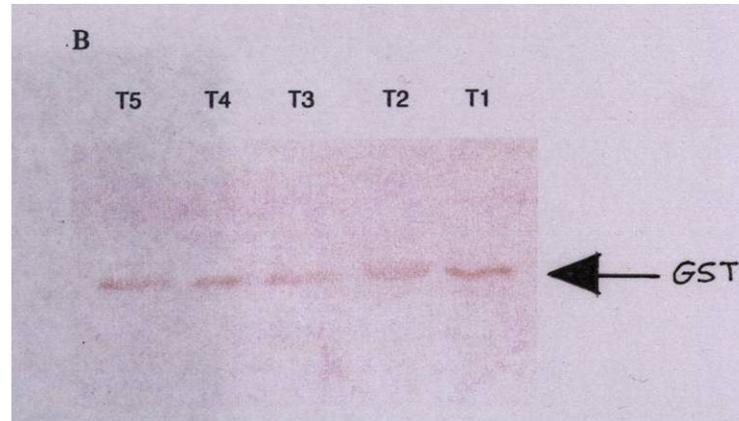


Figura No. 5A. Detección de la proteína Glutation S-Transferasa inducida con IPTG en proteínas totales de E coli con el anticuerpo sc - 138 (Santa Cruz Biotechnology) por Western Blot. Un cultivo de E. coli fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-ratón -peroxidasa. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T1 a T5 (tiempos de inducción de 1 - 5 hrs.). Figura 5B Ampliación de la zona de las bandas de la figura 5A

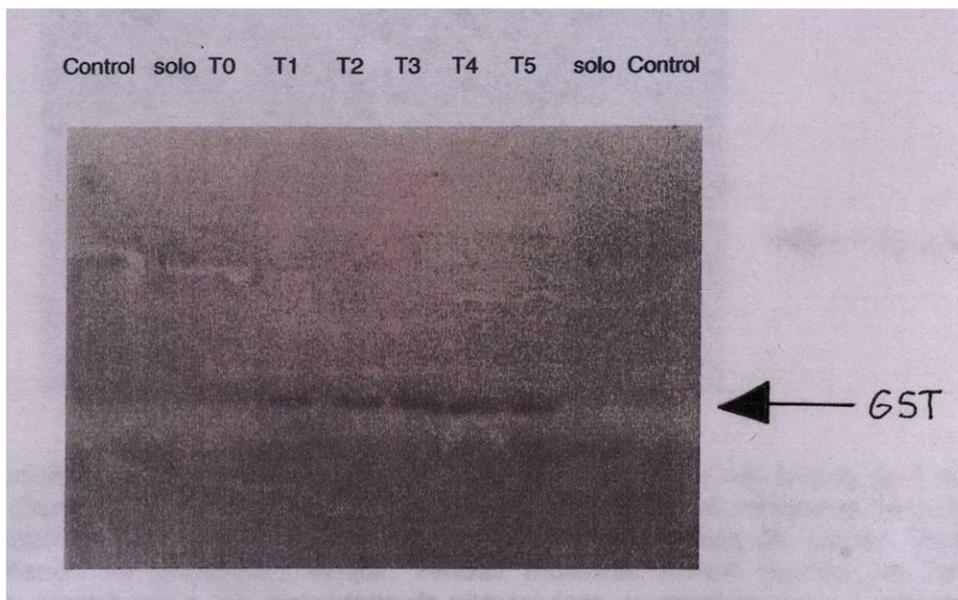


Figura No. 6. Detección de la proteína Glutation S-Transferasa inducida con IPTG en proteínas totales de E coli con el anticuerpo sc - 138 (Santa Cruz Biotechnology) por Western Blot. Un cultivo de E. coli fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-ratón -fosfatasa alcalina. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0 a T5 (tiempos de inducción de 0 - 5 hrs.).

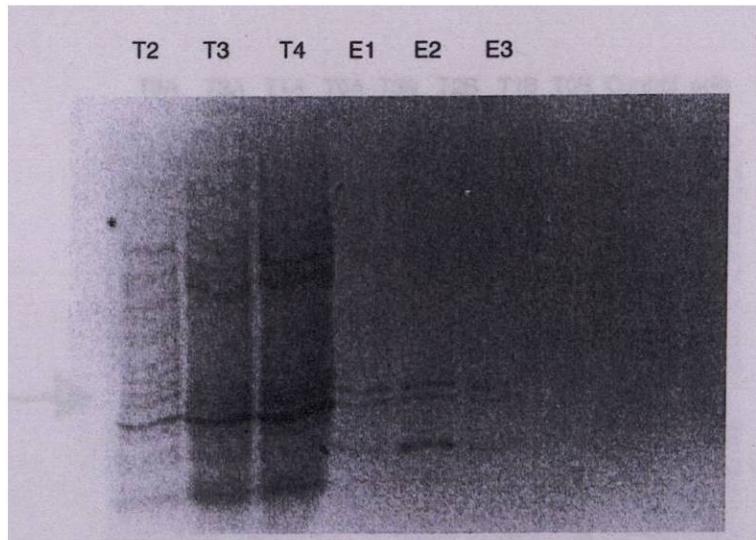


Figura No. 7. Gel de poliacrilamida al 12 %, donde se corrieron muestras de los eluidos de la purificación, además de las muestras de las proteínas totales, el cultivo de *E. coli*, de ambas muestras, fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. E1 a E3 (eluidos de fracciones de la purificación), T2 a T4 (tiempos de inducción de 2 - 4 hrs.).

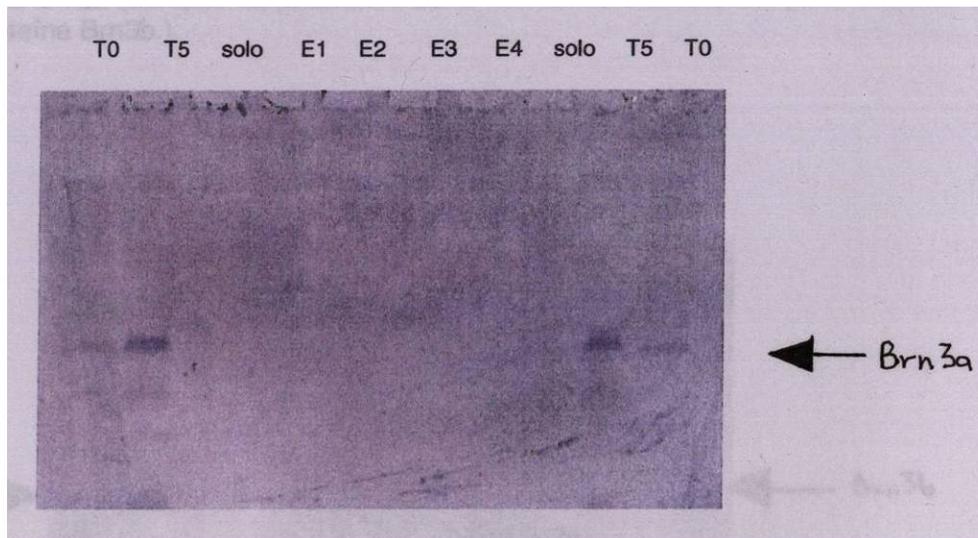


Figura No. 8. Detección de la proteína Brn3a inducida con IPTG en proteínas totales de *E. coli* con el anticuerpo sc - 6027 (Santa Cruz Biotechnology) por Western Blot. Utilizando muestras de un cultivo de *E. coli* el cual fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos, además de utilizar muestras de eluidos de la purificación de un cultivo similar. Ambas muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-ratón -fosfatasa alcalina. E1 a E4 (eluidos de fracciones de la purificación) T0 y T5 (tiempos de inducción de 0 - 5 hrs.).

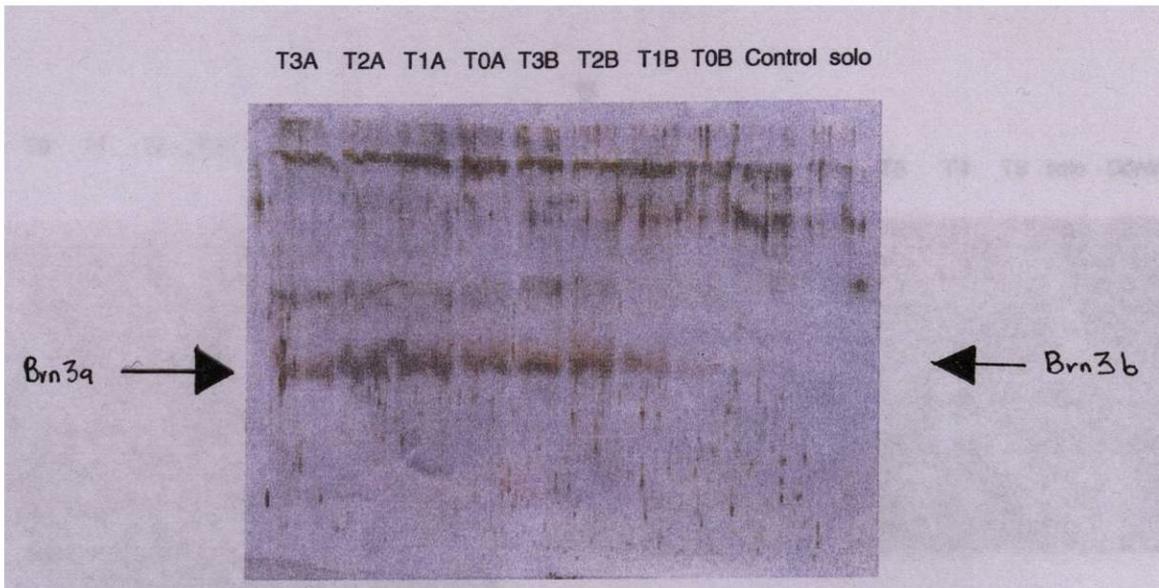


Figura No. 9. Detección de las proteínas Brn3a y Brn3b inducidas con IPTG en proteínas totales de *E. coli* por anticuerpos en suero de pacientes con cáncer cervicouterino mediante la técnica de Western Blot. Los cultivos de *E. coli* fueron inducidos con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-humano-peroxidasa. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0A a T3A (tiempos de inducción de 0 - 3 hrs de extractos de proteínas totales con el plasmido para la proteína Brn3a.). T0B a T3B (tiempos de inducción de 0 - 3 hrs de extractos de proteínas totales con el plasmido para la proteína Brn3b.).

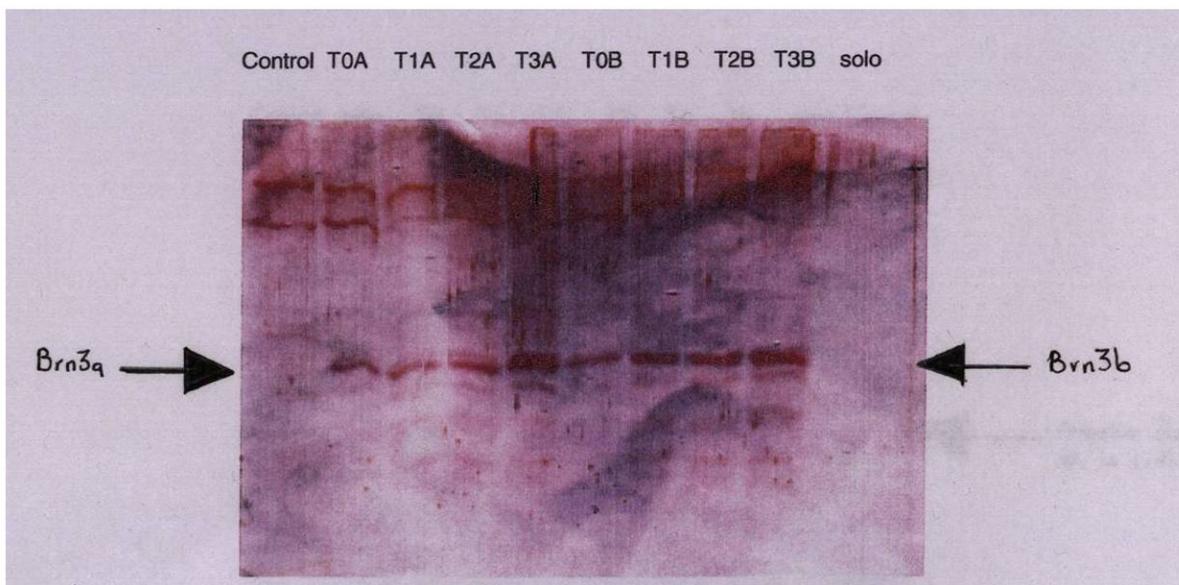


Figura No. 10. Detección de las proteínas Brn3a y Brn3b inducidas con IPTG en proteínas totales de *E. coli* por anticuerpos en suero de pacientes con cáncer cervicouterino mediante la técnica de Western Blot. Los cultivos de *E. coli* fueron inducidos con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-humano-peroxidasa. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0A a T3A (tiempos de inducción de 0 - 3 hrs de extractos de proteínas totales con el plasmido para la proteína Brn3a.). T0B a T3B (tiempos de inducción de 0 - 3 hrs de extractos de proteínas totales con el plasmido para la proteína Brn3b.).

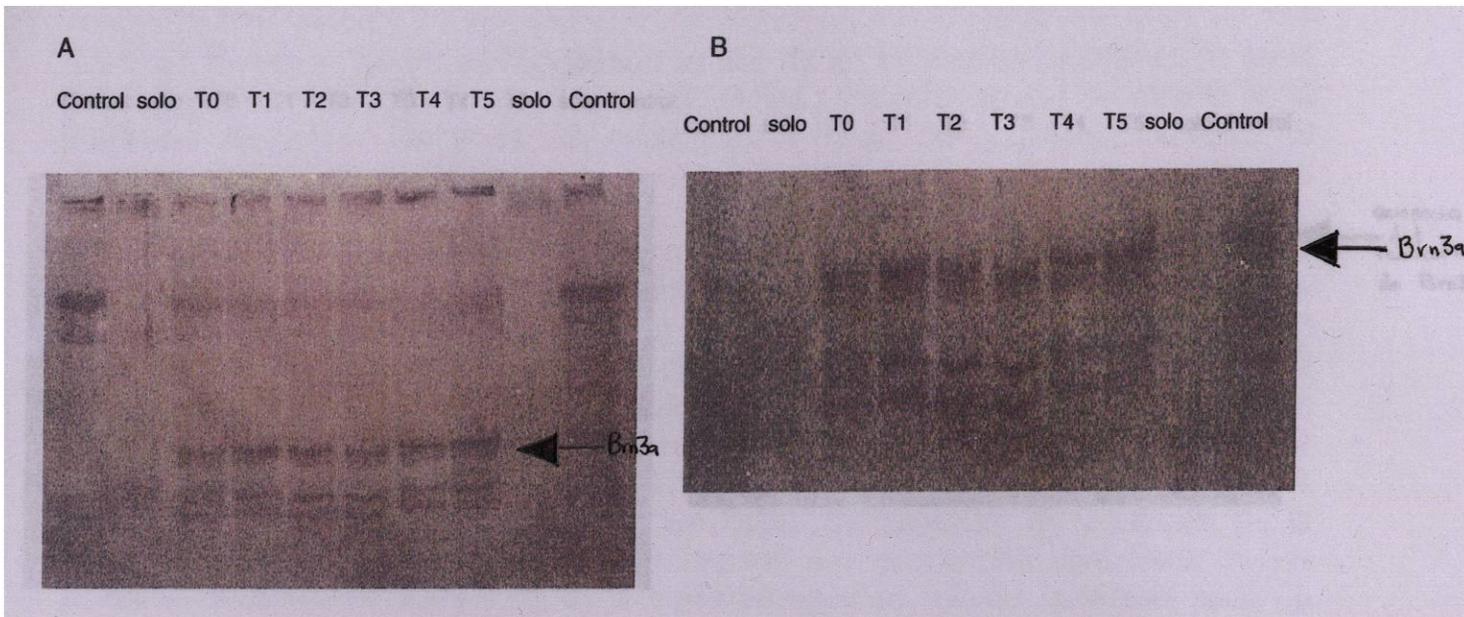


Figura No. 11. A Detección de las proteínas Brn3a inducida con IPTG en proteínas totales de *E. coli* por anticuerpos en suero de pacientes con cáncer cervicouterino mediante la técnica de Western Blot. El cultivo de *E. coli* fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-humano-fosfatasa alcalina. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0 a T5 (tiempos de inducción de 0 - 5 hrs) . 11B Ampliación de la zona de las bandas .

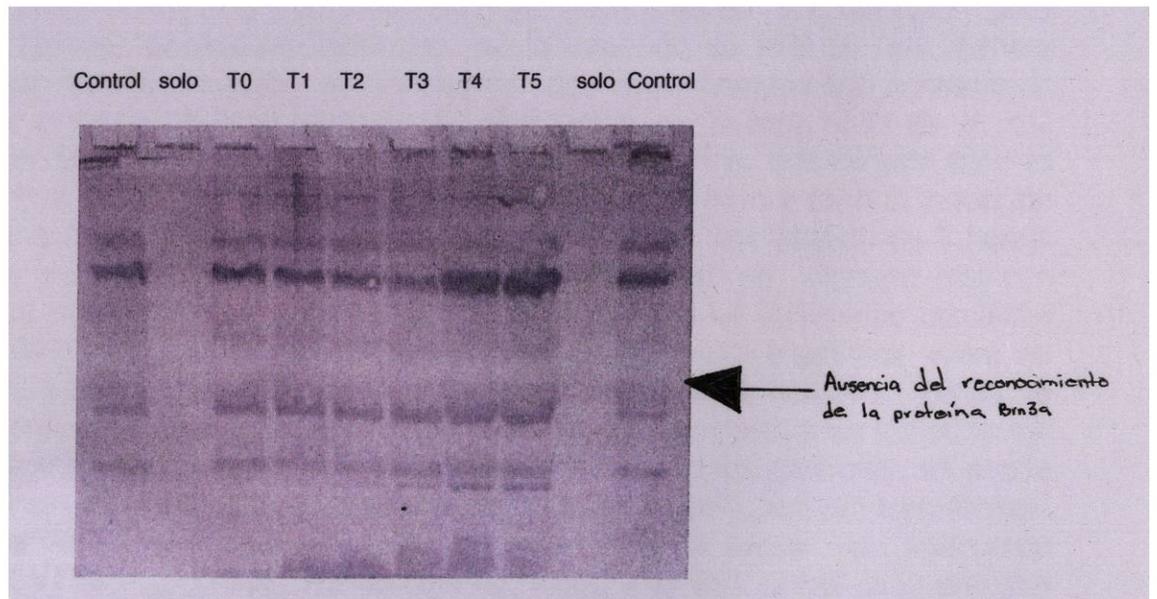


Figura No. 12. Detección de las proteínas Brn3a inducida con IPTG en proteínas totales de *E. coli* por anticuerpos en suero de personas sanas mediante la técnica de Western Blot. El cultivo de *E. coli* fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-humano-fosfatasa alcalina. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0 a T5 (tiempos de inducción de 0 - 5 hrs).

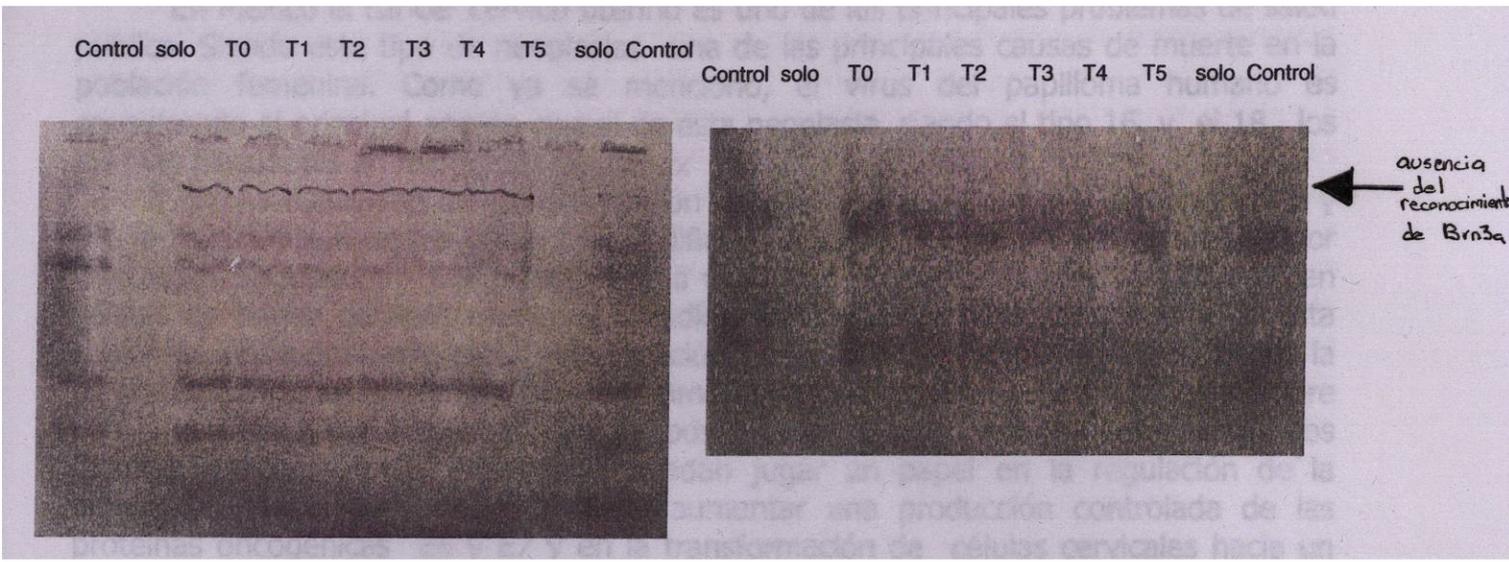


Figura No. 13. Detección de las proteínas Brn3a inducida con IPTG en proteínas totales de E. coli por anticuerpos en suero de personas sanas mediante la técnica de Western Blot. El cultivo de E. coli fue inducido con IPTG 1 mM a diferentes tiempos. Las proteínas totales fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12 %, transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelado con un anticuerpo anti-humano-fosfatasa alcalina. Control (proteínas de bacterias sin plasmido), T0 a T5 (tiempos de inducción de 0 - 5 hrs).

DISCUSIONES

En México el cáncer cérvico-uterino es uno de los principales problemas de salud pública. Siendo este tipo de neoplasias una de las principales causas de muerte en la población femenina. Como ya se mencionó, el virus del papilloma humano es considerado el principal agente causal de esta neoplasia, siendo el tipo 16, y el 18, los los mas frecuentes en neoplasias del cérvix

○ Dicha capacidad de transformación pertenece a las proteínas tempranas E6 y E7, la transcripción de los genes que codifican para estas proteínas es controlada por una región regulatoria (LCR), del genoma viral que es preferencialmente activada en células de origen cervical, mediante estudios realizados, se ha reportado que en esta región se unen dos factores de transcripción, Brn3a y Brn3b, mientras Brn3a activa la transcripción de las proteínas E6 y E7, Brn3b reprime dicha transcripción e interfiere con la activación por Brn3a. Es posible, por lo tanto, que el balance entre estos dos factores de transcripción "in vivo" puedan jugar un papel en la regulación de la activación de la URR del HPV y así aumentar una producción controlada de las proteínas oncogénicas E6 y E7 y en la transformación de células cervicales hacia un fenotipo maligno.

Se han realizado estudios donde se indica que el nivel del factor de transcripción celular Brn3a esta incrementado en pacientes con lesiones NIC3 comparados con los niveles observados en células cervicales normales de individuos con anomalías cervicales no detectables. Por lo tanto, en este trabajo se trató de demostrar que una expresión elevada de esta proteína (Brn3a) en el epitelio cervical podría inducir anticuerpos contra ella, y así la medición de estos podría ser utilizada para diferenciar las lesiones cervicales inducidas por la infección de HPV de una manera simple y sencilla. Para lograr esto, se realizaron varios experimentos que consistieron en lo siguiente, primero, se llevó a cabo la transformación de la cepa BL21 de E. coli con un plásmido de la familia pGEX el cual produce una proteína, que en este caso es Brn3a, fusionada a glutation-S-transferasa. Posteriormente se llevó a cabo la inducción de dicha proteína mediante la adición del inductor IPTG 1mM por espacio de 5 horas. Teniendo ya la cepa BL21 de E. coli transformada se realizó un western blot con extractos totales de bacteria usando como primer anticuerpo un anticuerpo comercial anti-Brn3a (sc-6027), el cual fué capaz de reconocer una proteína específica entre las proteínas de E. coli, con lo cual nos aseguramos de que la proteína Brn3a se encuentra presente en estos extractos, ya que esta banda solo apareció en los extractos totales de bacterias transformadas, en cambio no apareció en los controles, en donde se utilizó extractos de bacteria de la misma cepa (BL21 de E. coli) pero sin transformar. Para comprobar esto, se realizó otro western blot usando ahora un anticuerpo comercial anti-GST (sc-138) específico el cual reconoció a la GST unida a la proteína Brn3a, obteniendo con este experimento resultados similares a los del western anterior. Posteriormente se realizó un western blot en donde se utilizaron muestras de los mismos extractos, pero en esta ocasión se utilizó como primer anticuerpo suero de pacientes con cáncer cervical, con el propósito de observar si en los sueros de estas personas había presencia de anticuerpos contra esta proteína, en este western

aparecieron varias bandas que nos pueden indicar que el suero de estas personas hay anticuerpos contra algunas proteínas de E. coli, ya que las bandas correspondientes a estas proteínas se presentan también en los controles, sin embargo, se presenta una banda, a la misma altura que las que aparecen en los dos western anteriores, lo que nos podría indicar que efectivamente, como se pensaba, los sueros de estas personas si presentan anticuerpos contra esta proteína (Brn3a), ya que esta banda no se presenta en los carriles donde se colocaron las muestras control. Finalmente se llevo a cabo la realización de un western blot, en el cual se utilizaron sueros de personas sanas, para poder determinar si en estos sueros hay anticuerpos capaces de reconocer a la proteína Brn3a, en este ultimo western se encontró que estos sueros reconocen a diversas proteínas de E. coli, ya que aparece un patrón de bandas similar al del western anterior, sin embargo, en este western no aparece la banda correspondiente a la proteína Brn3a, lo que nos indica que los anticuerpos contra esta proteína se encuentran en suero de personas con cáncer cervical y no en suero de personas sin este tipo de cáncer. Con los datos obtenidos de la realización de estos experimentos podemos confirmar que la presencia de anticuerpos contra la proteína Brn3a ocurre solo durante el proceso neoplásico.

Esta es la primera descripción de la presencia de anticuerpos contra las proteínas de Brn3a en el suero de pacientes con lesiones cervicales. La presencia de estos anticuerpos puede representar un nuevo marcador serológico con posibilidades de diferenciar lesiones intraepiteliales cervicales (NIC) de las lesiones tumorales producidas por HPV.

CONCLUSIONES

Los experimentos realizados en este trabajo han logrado cumplir con los objetivos planteados y en base a sus resultados podemos concluir lo siguiente:

1. Se estandarizaron las condiciones para la inducción y producción de las proteínas recombinantes Brn3a y Brn3b en E. Coli.
2. Se optimizaron las condiciones para la inmunodetección de las proteínas Brn3a y Brn3b recombinantes usando un anticuerpo comercial.
3. Se optimizaron las condiciones para la inmunodetección de proteínas de fusión recombinantes producidas en bacterias usando un anticuerpo anti-GST comercial.
4. Los sueros de pacientes con cáncer cérvico-uterino tienen anticuerpos contra la proteína Brn3a recombinante detectados mediante Western Blot.
5. Los sueros de mujeres normales no tienen anticuerpos contra la proteína Brn3a recombinante mediante Western Blot.
6. Los anticuerpos anti-Brn3a en suero de pacientes con cáncer cervical pueden representar nuevos marcadores serológicos de lesiones neoplásicas inducidas por HPV.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Schiffman, M.H., H.M. Bauer, R.N. Hoover, A.G. Glass, D.M. Cadell, B.B. Rush, D.R. Scott, M.E. Sherman, R.J. Kurman, S. Wacholder, et. al. 1983. Epidemiological evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia J. Natl. Cancer Inst. 85:958-964.
- 2.- Durst, M. L. Gissmann, H. Ikenberg, and H.A. Zur Hausen. 1983. Papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3812-3815.
- 3.-Cox, M.F., C.A. Meanwell, N.J. Maitland, G. Blackledge. C. Scully and J.A. Jordan. 1986 Human papillomavirus type-16 homologous DNA in normal human ectocervix. Lancet. 2:157-158.
- 4.- Meanwell, C.A. 1987. HPV16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: implicatins for the etiology and behavior of cervical neoplasia. Lancet 1:703-707.
- 5.- Cripe, T.C., T.H. Hangen. J.P. Turk, F. Tabatabai, P.G. Schmid. M. Durst, L. Gissmann. A. Roman, and L. Twek. 1987. Transcriptional regulation of the human papilloma virus-16 E6-E7promoter by a keratinocyte-dependent enhancer and by viral E2 transactivator and repressor gene products :implication for cervical carivogenesis. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 6:3745-3753.
- 6.- Gloss ,B., H.U. Bernard, K. Seedorf, and G. Klock. 1987. The upstream regulatory region of the human papilloma virus contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones . EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J 6:3735-3743.
- 7.- Chan, W.T., T. Chong, U. Bernard, and G. Klock. 1990. Transcription of the transforming gene of the oncogenic human papilloma virus-16 is stimulated by tumour promoters through AP1 binding sites . Nucleic Acids. Res. 18:763-769.
- 8.-Chan, W.K., G. Klock , and H.U. Bernard . 1989. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papilloma viruses involved in anogenital neoplasia. J. Virol. 63:3261-3269.
- 9.- Gloss, B.M. Yeo-Gloss, M. Meisterenst, I. Rogge, E.L. Wimacker. and H.U. Bernard . 1989. Clusters of nuclear factor 1 binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function . Nuclei Acids Res. 17:3519-3533.
- 10.-Nakshtri, H.,M.M. Pater, and A. Pater. 1990. Ubiquitous and cell type specific protein interactions with human papillomavirus type 16 and type 18 enhancers. Virology. 178:92-103.
- 11.-Dent, C.L., G.A.J. McIndoe , and D.S. Latchman. 1991. The constitutively expressed octamer binding protein OTF-1 and a novel octamer binding protein expressed specifically in cervical cell bind to an octamer-related sequence in the human papillomavirus 16 enhancer . Nuclei Acids Res. 19:4531-5435.
- 12.- Morris, P.J., C.L. Dent, C.J. A. Ring, and D.S. Latchman. 1993. The octamer binding site in the HPV 16 regulatory region produces opposite effects on gene expression in cervical and non.cervical cell. Nuclei Acids Res. 21:1019-1023.

- 13.- Gerrero, M.R., R.J. McEvilly, E. Turner, C.R. Lin, S. O'Connell. K.J. Jenne, M.V. Hobbs, and M.G. Rosenfeld. 1993. Brn-3.0 A POU domains protein expressed in the sensory , immune and endocrine system that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc. Natl. Acad. USA.* 90:10841-10845.
- 14.- Lillycrop, K.A., V.S. Budhram-Mahadeo , N.D. Lakin, G. Terrenghi, J.N. Wood, J.M. Polak , and D.S. Lachtman .1992. A novel POU family transcription factor is closely related to Brn3 but has distinct expression pattern in neuronal cell . *Nuclei Acids Res.* 20:5093-5096.
- 15.- Turner, E.E., K.J. Jenne, and M.G. Rosenfeld. 1994. Brn-3.2: a Brn3-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid. *Neuron.* 12:205-218.
- 16.- Verrijzer, C.P., and P.C. van der Vliet . 1993. POU domain transcription factors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1173:1-21.
- 17.-Wegner, M., D.W. Drolet, and M.G. Rosenfeld. 1993. POU-domain protein:structure and function of developmental regulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:488-498.
- 18.-Theil, T., S. McLean-Hunter, M. Zornig, and T. Moroy. 1993. Mouse Brn-3 family of POU transcription factors: a new amino terminal domain is crucial for the oncogenic activity of Brn3-A. *Nuclei Acids Res.* 21:5921-5929.
- 19.- Morris, P.J., T. Theil, C.J.A. Ring, K.A. Lillycrop, T. Moroy, and D.S. Latchman. 1994. The opposite and antagonistic affects of the closely related POU family transcription factors in the activity of a target promoter are dependent upon differences in the POU domain. *Mol. Cell Biol.* 14:6907-6914.
- 20.- B. J. Smith. SDS Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Institute of Cancer Research. Chester Beatty Laboratories. London. pp. 41- 47.
- 21.- V.B. Mahadeo, M.Parker, D. S. Latchman. POU transcription factors Brn-3a interact with the estrogen receptor and differentially regulate transcriptional activity via an estrogen response element. *Mol. Cel. Biol.* 18:1029-1041.
- 22.- D. Ndisdang., P.J. Morris, C. Chapman, L. Ho, A. Singer, D.S. Latchman. 1998. The HPV-activating cellular transcription factor Brn-3a is overexpressed in CIN3 cervical lesions. *J. Clin. Invest.* 101:1687-1692.
- 23.-R.C. Mellors, M.D., Ph. D. 1998. Neoplasia, tumor marker. Cornell University Medical College.
- 24.-Duck JM, Aalders JG, Fleuren GJ, Krans M, de Bruijin HWA: Tumour markers CA125, squamous cell carcinoma antigen , and carcinoembryonic antigen in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1989; 73:661-668.
- 25.-Rose PG, Baker S, Fournier L, Nelson BE, Hunter RE:Serum squamous cell carcinoma antigen levels in invasive cervical cancer: Prediction of response and recurrence. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:942-946.
- 26.-Meier W, Eiermann W, Stieber P, Schneider A, Fatch Moghadam A, Hepp H:Experiences with SCC antigen, a new tumor marker for cervical carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25:1555-1559.
- 27.-Avall-Lundqvist EH, Sjovall K, Nilsson BR, Eneroth PH: Prognostic signifcance of pretreatment serum levels of squamous cell carcinoma antigen and CA125 in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 1992;28A:1695-1702.
- 28.-Lehtovirta P, Viinikka L, Ylikorkala O:Comparison between squamous cell carcionoma-associated antigen and CA125 in patients with carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1990;37:276-278.

- 29.-Leminen A:Tumor markers CA125, carcinoembryonic antigen and tumor-associated trypsin inhibitor in patients with cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1990;39:358-363.
- 30.-Suminami Y, Kishi F, Segikuchi K, Kato H:Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:51-58.
- 31.-Schneider SS, Schick C, Fish KE, Miller E, Pena JC, Treter SD, Hui SM, Silverman GA: A serine protease inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3147-3151.
- 32.-Barnes RC, Worrall DM: Identification of a novel human serpin gene; cloning sequencing and expression of leupin. *FEBS Lett* 1995;373:61-65.
- 33.-Hoshina M, Kimura A, Shibata K, Maruo T, Mochizuki M: Immunocytochemical distribution of the tumor antigen TA-4: Expression during carcinogenesis and maturation of squamous epithelium of human uterine cervix. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1986;12:119-126
- 34.-Maruo T, Shibata K, Kimura A, Hoshina M, Mochizuki M: Tumor associated antigen, TA-4 in the monitoring of the effects of therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Serial determinations and tissue localization. *Cancer* 1985;56:302-308.
- 35.-Kato H, Miyauchi F, Morioka H, Fujino T, Torigoe T: Tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. Correlation of circulating levels with disease progress. *Cancer* 1979;43:585-590.
- 36.-Kato H, Morioka M, Tsutsui H, Aramaki S, Torigoe T: Value of tumor-antigen (TA-4) of squamous cell carcinoma in predicting the extent of cervical cancer. *Cancer* 1982;50:1294-1296.
- 37.-Kato H, Morioka H, Aramaki S, Tamai S, Torigoe T: Pronostic significance of the tumor antigen TA-4 is cell carcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1983;145:350-354.
- 38.-Kato H, Tamai K, Morioka H, Magai M, Nagaya T, Torigoe T: Tumor antigen,TA-4,in the detection of recurrence in cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1984;54:1544-1546.
- 39.- Smith D.B.,Johnson K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene* 1988. 67(1):31-40
- 40.- Gurcan M.N.,M. Koyuturk, H.S .Yildiz, R. Centin-Atalay and A.E. Cetin. 1999. *Biotechniques* 26:1162-1169.
- 41.- Allen, R.C., C.A. Savaris and H.R. Marier. 1984. Gel electrophoresis and isoelectric focusing of proteins: Selected Techniques. Walter de Gryten, Berlin.
- 42.- J. Cerezo Román, V. Madrid Marina. 1995. Técnicas, estrategias y usos de biología molecular en medicina. *Rev Invest Clin*; 47:487-498.
- 43.- Peto R. Introduction geographic patterns and trends. En: Peto Howley P.M., ed. *Viral etiology of cervical cancer*. New York : Cold Spring Habor Laboratory, 1986.
- 44.- Broker TR, Botchan M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. *Cancer cell* 1986;4:17
- 45.- Shodell M. Preface. En: Peto R. Howley P.M., ed. *Viral etiology of cervical cancer*. New York : Cold Spring Habor Laboratory, 1986.

- 46.- Gariglio, P. Rangel L.M., Virus y Cancer. Salud Publica de México mayo-junio 1992;34:308-317.
- 47.- Reeves W. Brenes M, Britton R. et al. Cervical Cancer in the Republic of Panama. Am J. Epidemiol 1984;119:714-724.
- 48.-Escandon-Romero C., Benitez-Martinez M.A., Navarrete-Espinoza J.,Vazquez-Martinez J.L., Martinez-Montañez O.G., Escobedo-De la Peña J.E. Epidemiologia del cáncer cervicouterino en el instituto mexicano del seguro social. Salud Publica de México 1992;34:607-614
- 49.- Cisneros M.T. Espinoza R. Pineda BE. Mortalidad por cáncer de la mujer mexicana. Salud Publica Mex. 1987;29:299-312.
- 50.- Liu, Y.Z., S.J. Dawson, and D.S. Latchman. 1996. Alternative splicing of the Brn-3a and Brn-3b transcription factor mRNA is regulated in neuronal cell. J. Mol. Neurosci. 7:77-85
- 51.-M.D. Smith, P.J. Morris, P.J. Dawson, M.L. Schwartz, W.W. Schlaepfer, D.S. Latchman. Co-ordinate induction of the three neurofilament genes by the Brn3a transcription factor, J. Biol. Chem. 272 . 1997. 21325-21333.
- 52.-V.S. Bbudhram-Mahadeo, P.J. Morris, N.D. Lakin, T. Theil, G.Y. Ching, K.A. Lillycrop, T. Moroy. R.K.H. Liem, D.S. Latchman. Activation of the α -internexin promoter by the Brn3a transcription factor is dependent on the N-terminal region of the protein, J. Biol. Chem. 270 (1995) 2853-285
- 53.- N.D. Lakin, P.J. Morris, T. Theil, T.N. Sato, T. Moroy, M.C. Wilson, D.S. Latchman, Regulation of neurite outgrowth and SNAP25 gene expression by the Brn3a transcription factor. J. Biol. Chem. 270 (1995) 15858-15863
- 54.- Budhram-Mahadeo, V., T. Theil, P.J. Morris, K.A. Lillycrop, T. Moroy, and D.S. Latchman. 1994. The DNA target site for the Brn3 POU family transcription factor can confer responsiveness to cyclic AMP and removal of serum in neuronal cell. Nucleic Acids Res. 22:3092-3098.
- 55.- Budhram-Mahadeo, V., P.J. Morris, N.D. Lakin, S.J. Dawson, and S.D. Latchman. 1996. The different activities of the two activation domains of the Brn3a transcription factor are dependent on the context of the binding site. J. Biol. Chem. 271:9108-9113
- 56.- Verrijzer, C. P.,and van der Vliet, P. C. (1993) Biochim. Biophys. Acta 1173, 1-21.
- 57.- Erkman L.,McEvelly J., Luo L. Ryan A.K., Hooshmand F., O'Connell S.M., Keithley E.M., Rapaport D.H., Ryan A.F. and Rosenfeld M.G. (1996) Role of transcription factor Brn3.1 and Brn3.2 in auditory and visual sistem development. Nature 381,603-606
- 58.- McEvelly R.J., Erkman L., Luo L. Sawchenko P.E. Ryan A.F. and Rosenfeld M.G. (1996). Requirement for Brn3.0 in differentiation and survival of sensory and motor neurons. Nature 384,574-577
- 59.- D.S. Latchman. The Brn3a transcription factor. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 30 (1998) 1153-1157
- 60.- M.D Smith, E.A. Enson, R.S. Coffin. L.M. Boxer. D.S. Latchman. Bcl-2 transcription from the proximal p2 promoter is activated in neuronal cell by the Brn3a POU family transcription factor. J. Biol. Chem. 273 (1998) 16715-16722
- 61.- Yoshikazu Tsuchiya, Masahiko Onda, Massao Miyashita and Koji Sasajima. Serum level of cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) indicates tumour stage and prognosis of squamous cell carcinoma of the oesophagus. Medical Oncology (1999) 16:31-37
- 62.- Trejo L. A., Zapata P., Lara Rdz. M. A. Manual del curso practico de biologia molecular II. Dep. Microbiologia e inmunologia . U.A.N.L. 1996.

- 63.- Rustin G.J. Circulating tumor markers in gynecological tumors. *Curr. Opin. Oncol.* 1996, (5): 426-431.
- 64.- Farghaly S. A. Tumor markers in gynecologic cancer. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1992. 34(2): 65-72.
- 65.- Miller A.B. Role the early diagnosis and screening; biomarkers. *Cancer Detect. Prev.* 1992. 15(1): 21-26.
- 66.- Tsai S.C., Kao C.H., Wang S.J. Study of a new tumor marker, CYFRA 21-1, in squamous cell carcinoma of the cervix. And comparison with squamous cell carcinoma antigen. *Neoplasma.* 1996;43(1):27-29
- 67.- Braun P., Leyendecker G. Carcinoembryonic antigen in cervical cancer: a five-year follow-up. *Cancer Detect Prev.* 1983;6(1-2):249-253
- 68.- Borrás G., Molina R., Xercavins J., Ballesta A., Iglesias J. Tumor antigens CA19.9, CA125, and CEA in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 1995. May;57(2):205-211
- 69.- Inaba N., Takamizawa Y., Ota J., Fukazawa K. Tumor marker. *Gan. No Rinsho.* 1990.Ago;36(10):1123-1127
- 70.- Alagoz T., Buller RE., Berman M., Anderson B, Manetta A., DiSaia P. What is a normal CA125 Level?. *Gynecol Oncol.* 1994.Apr;53(1):93-97
- 71.- Halila H., Alfthan H., Stenman UH. Clinical use of gynaecologic tumor markers. *Ann Chir Gynaecol.* 1989;78(1):65-70
- 72.- Crombach G., Scharl A., Vierbuchen M., Wurz H., Bolte A. Detection of squamous epithelia and is squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer.* 1989.Apr;1;63(7):1337-1342
- 73.- Meier W., Eiermann W., Stieber P., Schneider A., Fateh-Moghadam A., Hepp H. Experiences with SCC antigen, a new tumor marker for cervical carcinoma. *Eur J. Cancer Clin Oncol.* 1989.Nov;25(11):1555-1559
- 74.- Borrás G., Molina R., Xercavins J., Ballesta A., Iglesias X. Squamous cell carcinoma antigen in cervical cancer. *Eur J. Gynaecol Oncol.* 1992;13(5):414-418
- 75.- Bolli JA., Doering DL., Bosscher JR., Day TG. JR., Rao CV., Owens K., Kelly B., Goldsmith J. Squamous cell carcinoma antigen: clinical utility in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 1994.Nov;55(2):169-173
- 76.- Chou CY., Wang ST., Kuo HC., Tzeng CC., Yao BL. Serum level of squamous cell carcinoma antigen and tumor size are useful to identify preoperatively patients at high risk of cervical cancer. *Cancer* 1994.Nov.1;74(9):2497-2501
- 77.- Gaarenstroom KN., Bonfrer JM., Kenter GG., Korse CM., Hart AA., Trimbos JB., Helmerhorst TJ. Clinical value of pretreatment serum Cyfra 21-1, tissue polypeptide antigen, and squamous cell carcinoma antigen levels in patients with cervical cancer. *Cancer* 1995.Sep.1;76(5):807-813
- 78.- Bonfrer JM., Gaarenstroom KN., Kenter GG., Korse CM., Hart AA., Gallee MP., Helmerhorst TJ., Kenemans P. Prognostic significance of serum fragments of cytokeratin 19 measured by Cyfra 21-1 in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1994.Dec;55(3 Pt 1):371-375
- 79.- Ferdeghini M., Gadducci A., Annicchiarico C., Prontera C., Malagnino G., Castrillani C., Facchini V., Bianchi R. Serum Cyfra 21-1 assay in squamous cell carcinoma of the cervix. *Anticancer Res.* 1993. Sep-Oct;13(5C):1841-1844
- 80.- Nakajima H., Hirata T., Norisugi T., Furuno K., Ikehata N., Utsunomiya A., Kobayashi K., Negishi Y., Akiya K. A study on tumor marker of tissue-polypeptide-

antigen (TPA) in gynecologic malignancies. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1994 Oct;36(10):1877-1883

81.- Inoue M., Fujita Y., Abe Y., Inoue Y., Ueda G., Tanizawa O., Minagawa J., Yamada T., Ohashi K., Ozaki M. Tissue polypeptide antigen as a tumor marker for gynecologic malignancies. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1985.Sep;37(9):1799-1805

82.- Saitoh S., Nakanishi A., Noda T., Yoh S., Ando Y., Moriyama I., Ichijo M. Tissue polypeptide antigen in gynecological cancer. *Gan No Rinsho* 1985.Jan;31(1):65-72

83.- Inoue M., Inoue Y., Hiramatsu K., Tanaka Y., Yamasaki M., Ueda G., Minagawa J., Ozaki M., Yanagida T., Nishino H. The clinical significance of tissue polypeptide antigen (TPA) in the patients with gynecologic tumor. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1984. May;36(5):779-784

84.- Ferdeghini M., Gadducci A., Prontera C., Castellani C., Annicchiarico C., Gagetti O., Facchini V., Bianchi R. Determination of serum levels of different cytokeratins in patients with uterine malignancies. *Anticancer Res* 1994 May-Jun;14(3B):1393-1397

85.- Callet N., Cohen-Solal Le Nir CC., Berthelot E., Pichon MF. Cancer of the uterine cervix: sensitivity and specificity of serum cyfra 21-1 determinations. *Eur J. Gynaecol Oncol* 1998;19(1):50-56

86.- Hines JF, Ghim SJ, Schlegel R, Jenson B. Prospects for a vaccine against human papillomavirus. *Obstet Gynecol* 1995;86:860-866.

87.- Clark WH. The nature of cancer: Morphogenesis and progressive (self)-disorganization in neoplastic development and progression. *Acta Oncol* 1995;34:3-21.

88.- Muñoz N, Bosch X, Kaldor JM. Does human papillomavirus cause cervical cancer? The state of the epidemiological evidence. *Br J Cancer* 1999;57:1-5.

89.- Shah KV. Papovaviridae. En: *Clinical Virology Manual* Steven Specter, Gerald J Lancz edit. USA Edit Elsevier. 1996:373-386.

90.- Coggin Jr, zur Hausen. Workshop on papillomavirus and cancer. *Cancer Res* 1979;39:545-547.

91.- Zur Hausen H, Schneider A. The role of papillomavirus in human anogenital cancer. En: Salzman NP, Howley PM, ed *The Papovaviridae*. Nueva York: Plenum Press 1987:254-263.

92.- Howley PM. Papillomaviridae and their replication. En: Fields BN ed. *Virology* second ed. New York. Raven Press. 1990:1625-1650.

93.- DiPaolo JD, Popescu N, Alvarez L, Woodeorth C. Cellular and molecular alterations in human epithelial cell transformed by recombinant human papillomavirus DNA. *Crit Rev Oncog*. 1993;4:337-360.

94.- Chiang CM, Dong G, Broker TR, Chow LT. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol*. 1992;66:5224-5231.

95.-A. Garcia, P.V. Gariglio. Aspectos moleculares de los papillomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-terino. *Rev Inv, Clin* 1993;45:85-92

96.- Chow L, Hirochika H, Nasser M, Stoler M, Wolinsk S, Chin M et al. Human papillomavirus gene expression in papillomaviruses. *Cancer Cells*. 1987;5:55-72.

97.- Gius D, Grossman S, Bedell MA, Laimins L. Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J Virol*. 1988;62:665-672.

- 98.- Schwarz E, Freese VK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cell. *Nature*. 1985;314:111-114.
- 99.- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda M, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol*. 1987;61:962-971
- 100.- Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:4680-4684.
- 101.- Reid R MD, Campion MJ, The biology and significance of human papillomavirus infection in the genital tract. *Yale J Biol Med* 1989;61:307-325
- 102.- Mallon RG, Wojciechewicz D, Defendi V. DNA-Binding activity of papillomavirus proteins. *J Virol*. 1987;61:1655-1660.
- 103.- Magrath I, Litvak J. Cancer in Developing Countries: Opportunity and challenge. *JNCI* 1993;85:862
- 104.- Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J Gen Virol* 1985;66:1515-1522.
- 105.- Durst M, Schwarz E, Gissman L. Integration and persistence of human papillomavirus DNA in genital tumors. En: Peto R, Howley PM, ed. *Viral etiology of cervical cancer*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- 106.- Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G. Integration of the human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol*. 1987;61:3295-3298.
- 107.- Lazcano-Ponce E, Rascon-Pacheco, Lozano-Ascencio R, Velasco E. Mortality from carcinoma of the uterine cervix in México: impact of screening 1980-1990. *Acta Cytol* 1996;40:506.
- 108.- Brinton LA. Current epidemiological studies-emerging hypotheses. En: Peto R, Howley PM, ed. *Viral etiology of cervical cancer*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- 109.- Herrero Rolando, Brinton LA, Reeves WC, et al. Factores de riesgo de carcinoma invasor del cuello uterino en America Latina. *Bol Of Sanit Panam* 1990;109:6-23.
- 110.-M. González, M. Puerto, G. Polaco, F. Puerto. Los papillomavirus y su relación con el cáncer cervicouterino. *Rev Biomed*, Enero-Marzo 1994;5:39-47.
- 111.-P. Gariglio, A. Garcia. Papillomavirus humanos y cáncer cérvico-uterino. *Microbio. Enf. Infecc*. 1990;8:45-58.
- 112.- Morin C, Braun L, Casas-Cordero, M. Shah, K.V. Roy, M. Fortier, M. Meisels, A. Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the preoxidase-antiperoxidase technique. *J.N.C.I*. 1981;66:831.
- 113.- Gariglio P, Ocadiz R, Saucedo R. Human papilloma virus DNA sequences and c-myc oncogenes alteration in uterine-cervix carcinoma. *Cancer Cell*. 1987;5:343-348.
- 114.- Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M, Graef AM, Gariglio P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and uterine-cervix carcinoma. *Cancer Res*. 1987;47:4173-4177.
- 115.- Campo MS. Viral and cellular oncogenes in papillomavirus associated cancers. *Br J Cancer*. 1988;58:80-84.

- 116.- Durst M, Croce CM, Gissmann L, Scharz E, Huebner K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1070-1074.
- 117.- Champion MJ. Manifestaciones clínicas y evolución de la infección humana por papillomavirus. *Clin N A Ginecol Obstet.* 1987;2:263-288.
- 118.- Reeves WC, Rawls. Brinton LA. Epidemiology of genital papillomavirus and cervical cancer. *Rev Infect Dis* 1989;3:426-439.
- 119.- Terris M, Wilson F, Smith H, Sprung E, Nelson JH Jr. The relationship coitus to carcinoma of the cervix. *Am J Public Health* 1967;57:840-845.
- 120.-Nelson JH, Averette HE, Richart RM. Dysplasia, carcinoma in situ, and early invasive cervical carcinoma. *Cancer J Clinicians* 1984;34:306-315.
- 121.- Meisels A, Marin C. Problems in cytological screening from condylomatous lesions of the cervix. *Clin Obstet Ginecol.* 1985;12:53-66.
- 122.- Meanwell CA. The epidemiology of human papillomavirus infection in relation to cervical cancer. *Cancer Surveys.* 1988;7:481-497.
- 123.- Alonso MJ, Gomez F, Muñoz E, et al. Comparative study of in situ hibridization and immunihistochemical techniques for detection of human papillomavirus in lesions of the uterine cervix. *Eur J Histochem.* 1992;36:271-278.
- 124.-Theil. T, Rodel B, Spiegelhalter, Moroy T. Short isoform of POU factor Brn-3b can form a heterodimer with Brn-3a that is inactive for octamer motif binding. *J. Biol. Chem.* 1995;30958-30964.
- 125.- Avila H. M.,Lazcano-Ponce E., Berumen-Campos j., Cruz-Valdez A., Alonso P., Gonzalez-Lira Guillermo. Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-ontrol study. *Archives of medical research.* 1997;28:265-271
- 126.-Ndisang D., Budhram-Mahadeo, Latchman D. S. The Brn-3a transcription factor plays a critical role in regulating human papilloma virus gene expression and determinig the growth characteristics of cervical cancer cell. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274:28521-28527.
- 127.- Storey, A. Thomas, M. Kalita, A, Harwood, C. Gardiol, D. Mantovani, F. Breuer, J. Leigh, I.M. Matlashewsko, G., Banks. (1998) *Nature* 393, 229-234.
- 128.- Koss L. Sequence of events in carcinogenesis of the uterine cervix. En: Peto R, Howley PM, ed. *Viral etiology of cervical cancer.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
- 129.- Dyson, N., P. M. Howley, K.Munger, and E. Harlow. 1989. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937
- 130.- Werness, B. A., A. J. Levine, and P. M. Howley. 1990, Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79.
- 131.- Escandon-Romero c., Benitez-Martinez M. G., Navarrete-Espinoza J.,Vazquez-Martinez J. L., Martinez-Montañez O. G., Escobedo-de la Peña J. Epidemiologia del cáncer cervicouterino en el instituto mexicano del seguro social. *Salud Publica de México.* 1992;34:607-614

