



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR.

**INFLUENCIA DE LAS ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7
DEL VPH EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR
ErbB2.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR.

**PRESENTA:
LINDA NELLY PATIÑO URIOSTEGUI**

DIRECTOR

Dr. Fernando Enríquez Rincón

CODIRECTOR

Dra. Paula Figueroa Arredondo

ASESORES

Dr. Juan Pedro Luna

Dr. Juan Salas Benito

Dra. Laurence Marchat Marchau



Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Paula Figueroa Arredondo y el Dr. Fernando Enríquez Rincón en el laboratorio 20 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV.

DEDICATORIAS.

Quiero agradecer a mi Dios y a la vida el permitirme llegar a éste momento tan especial, donde culminan los sueños que hace cinco años surgieron en mi mente y mi corazón. Agradezco a mi dios el darme la fortaleza para ir en busca de mis sueños, soportar la lejanía de mis seres queridos y las adversidades que la propia vida tiene. Le agradezco a ese ser enigmático el nunca alejarse de mí, el ser mi amigo, de llevarme siempre de la mano, por todos los momentos de felicidad que me ha regalado, de poner en mi camino gente buena que me ha brindado su ayuda y de la cual he aprendió cosas de la vida, se que aún quedan muchas cosas por aprender y por realizar, solo le pido a mi dios que me siga llenando de fortaleza y valor en el camino de la vida.

A la vida quiero agradecerle la gran oportunidad que me dio de existir, de cumplir con un sueño, de demostrarme en todo momento, que a pesar de que la vida no este llena de momentos hermosos, son esos momentos difíciles los que nos hacen crecer, madurar y ser mejores seres humanos y que mientras haya luz y fe en nuestro corazón, la llama de la vida seguirá prendida hasta el final de sus días.

DEDICATORIAS.

A mi madre Maria Elena, por su enorme apoyo, por los sacrificios que tuvo que hacer para que yo realizara un posgrado, por su confianza, por creer en mí siempre e incondicionalmente, por ser mas que mi madre mi amiga y por el enorme amor que me tiene. Te amo mamá.

A mi padre Luís por su cariño.

A mi hermano Luís Guillermo, por su enorme amor, apoyo y consejos.

A mi sobrina Mónica, por haber llenado mi vida de felicidad.

A mi tía Maria y a mi tío Roberto, por apoyarme en toda mi maestría, por sus enormes consejos y por estar al pendiente de mí. Gracias

A mis primos Sonia y Mario que a pesar de ser pequeños me han demostrado que con dedicación y empeño se pueden lograr las cosas.

José Luís Velásquez, por ser una persona muy especial en mi vida, la cual me ha enseñado que no hay cosa mas importante que ir en busca de nuestros anhelos, por su enorme paciencia para con migo, por sus valiosos consejos, por su cariño y por su amistad. Gracias por existir.

Eidi Yuridia Chávez, por su amistad en todos estos años, por apoyarme y por su enorme cariño. Gracias Amiga.

Alejandro Millán Vega, por todos sus sabios consejos, por estar a mi lado en mi desarrollo académico, por sus enseñanzas, por enseñarme que la vida se debe afrontar con valor y fortaleza, por ser mí apoyo, por los momentos felices que pasamos juntos y por su amistad. Te quiero.

Ian Ilizaliturri Flores, por regalarme en estos últimos meses momentos muy felices a tu lado, por estar junto a mí, por todo lo que me has enseñado, por tu comprensión y apoyo en los momentos difíciles. Te quiero.

AGRADECIMIENTOS.

Dra. Paula Figueroa Arredondo, por haber confiado en mí en el desarrollo este proyecto y por todo el apoyo que me ha brindado en todos estos años y por ayudarme a realizar mi sueño.

Dr. Fernando Enríquez Rincón, por permitirme estar en su laboratorio, por la paciencia que demostró tenerme, por la confianza que deposito en mi y por ayudar en mi desarrollo académico.

Dr. Juan Pedro Luna Arias, por el interés que siempre mostró en mi formación académica, por sus grandes y sabios consejos, por apoyo en el desarrollo de este proyecto, por sus comentarios siempre tan objetivos.

Dr. Juan Salas Benito, por su disposición y sus comentarios.

Dra. Laurance Marchat Marchau por su valioso tiempo y sugerencias.

Biol. María Luisa Labra Barrios, por la gran ayuda que para mi fue en el desarrollo de este trabajo, por su gran disposición, por su enorme paciencia, por el interés que mostró en mi trabajo, por sus valiosos consejos y sobre todo por ser una gran amiga para mi. Gracias.

I.Q.I. Leticia Zavala Alvarado, por su ayuda en la realización de este proyecto, por su disposición, por los momentos gratos que pasamos, por sus consejos y por su amistad.

Xochitl González Cid, por su apoyo técnico.

Q.B.P. Blanca Estela Reyes Márquez, por su excelente apoyo en el área de microscopia confocal y en el citometro de flujo, por su paciencia, su disposición y amabilidad.

Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S.A de C.V. por la donación de células.

A mis compañeros de laboratorio, Carlos Castañon y Laura Padierna por su apoyo y buenos comentarios.

A mis amigos, Karla Grisel, Antonio, Igor, José Carlos y Eder, por todos esos momentos bellos que pase a su lado, por brindarme siempre una sonrisa, por darme su apoyo, su amistad y por las palabras calidas que me brindaron en los momentos difíciles.

Quiero agradecer a todos los integrantes del laboratorio No 20 del CINVESTAV por hacer de este laboratorio mi segunda casa.

A mis amigos de maestría, Edgar, Dennis, Fabiola, Jorge, Pati y Fernando, por su amistad y apoyo que me brindaron en toda la maestría y por dejarme aprender de ellos.

INDICE.

ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABLAS.....	III
ABSTRACT.....	IV
RESUMEN.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Cáncer cervico-uterino (CaCU).....	1
Factores de riesgo para el desarrollo de CaCU.....	2
Virus del papiloma humano (HPV).....	2
Organización del genoma del HPV.....	3
Desarrollo de la infección.....	3
Estructura y función de la oncoproteína E7.....	8
Estructura y función de la oncoproteína E6.....	10
Receptores y cáncer.....	11
Receptores tirosina-cinasa.....	12
Ligandos de los receptores ErbB.....	12
Estructura de los receptores ErbB2.....	13
Activación de los receptores ErbB.....	14
Receptor ErbB2.....	14
II. ANTECEDENTES.....	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPOTESIS.....	21
V. OBJETIVOS.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares.....	22

VI. MATERIAL Y METODOS.....	23
Líneas celulares.....	23
Anticuerpos.....	24
Extracción de RNA.....	24
RT-PCR.....	24
Inmunocitoquímica.....	25
Citometria de flujo.....	26
Inmunofluorescencia.....	26
VII. RESULTADOS.....	27
Expresión de <i>E6</i> y <i>E7</i> del HPV en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados.....	28
Expresión de <i>erbB2</i> en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados.....	32
Líneas celulares de cáncer cervical y queratinocitos inmortalizados expresan el receptor ErbB2.....	32
Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados.....	34
VIII. DISCUSIÓN.....	46
IX. CONCLUSIONES.....	51
X. PERSPECTIVAS.....	52
XI. BIBLIOGRAFIA.....	54
ANEXO I.....	64
ANEXO II.....	65
ANEXO III.....	67
ANEXO IV.....	68
ANEXO V.....	69

ABREVIATURAS.

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal.
CaCU	Cáncer cervico-uterino.
SILs	Lesiones intraepiteliales escamosas.
CIN	Neoplasia intraepitelial cervical.
CIS	Carcinoma insitu.
RB	Retinoblastoma.
RNA	Acido ribonucleico.
DNA	Acido desoxiribonucleico.
TBP	Proteína de unión a TATA.
Cdks	Cinasas dependientes de ciclinas.
E6-AP	Proteína asociada a E6.
ORFs	Fragmentos de lectura abiertos.
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular.
PI3K	Fosfoinositol-3-cinasa.
ER	Receptor de estrógenos.
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G.
MMPs	Metaloproteínasas de matriz
mTOR	Proteína blanco molecular de la rapamicina.
MAPK	Proteína cinasa activada por mitogeno.

LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1.	Organización genómica del HPV-16.	6
Fig. 2.	Desarrollo de la infección viral.	9
Fig. 3.	Activación de la familia de receptores ErbB.	15
Fig. 4.	Detección de E6 y E7 por RT-PCR en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados con E6 y E7.	31
Fig. 5.	Detección de <i>erbB2</i> por RT-PCR en líneas celulares de cáncer cervical y queratinocitos inmortalizados con E6 y E7.	33
Fig. 6.	Detección de la expresión de ErbB2 en líneas celulares de cáncer cervical por inmunocitoquímica.	35
Fig. 7.	Detección de la expresión de ErbB2 en queratinocitos inmortalizados por inmunocitoquímica	36
Fig. 8.	Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en las líneas SK-BR-3 y MCF-7 por citometría de flujo e inmunofluorescencia en microscopía confocal.	38
Fig. 9.	Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en las líneas celulares SiHa y CaSki por citometría de flujo e inmunofluorescencia en microscopía confocal	40
Fig. 10.	Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en las líneas celulares HeLa y C-33 A por citometría de flujo e inmunofluorescencia en microscopía de confocal.	41
Fig. 11.	Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en queratinocitos inmortalizados E6 y E7 por citometría de flujo e inmunofluorescencia en microscopía confocal.	43
Fig. 12.	Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en queratinocitos inmortalizados E6/7 por citometría de flujo e inmunofluorescencia por microscopía confocal.	44
Fig. 13.	Porcentaje relativo de la expresión de ErbB2 en queratinocitos inmortalizados y en líneas celulares de cáncer cervical por citometría de flujo con el anticuerpo sc-08.	45

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1.	Tipos de HPV y su poder oncogénico.	4
Tabla 2.	Genes y la función de sus productos.	5
Tabla 3.	Oligonucleotidos utilizados en las RT-PCRs.	25

ABSTRACT

ErbB2 is a transmembrane protein that belongs to the receptors tyrosine kinases superfamily subclass I. ErbB2 receptor is the preferred partner of the members that comprises the ErbB family to form heterodimers and the ligand representative of the receptors of the ErbB family is the epidermal growth factor (EGF).

The subclass I of receptors tyrosine kinases, are involved in outstanding cellular processes, such as proliferation and differentiation. Nevertheless ErbB2 participates in the development of different types of cancer, mainly in breast cancer, where ErbB2 is overexpressed and has been correlated to poor prognosis.

Several studies have showed an overexpression of ErbB2 in cervical cancer biopsies and it is related to the aggressiveness of the cancer, however the HPV participation in ErbB2 overexpression is not clear.

The aim of this work was to evaluate the expression of ErbB2 at both the mRNA and protein level in cervical carcinoma cell lines to establishing a possible relation between the HPV oncoproteins E6 and E7 production and the ErbB2 receptor overexpression in these lines as well as in immortalized keratinocytes.

We observed an increased in transcription activity of the gene, in cervical cancer cell lines (SiHa, CasKi, HeLa, C33A) and immortalized keratinocytes (Ker E6, Ker E7, Ker E6/7).

Furthermore, increased ErbB2 expression was observed in HPV16 positive cervical carcinoma cell lines (SiHa, CasKi) and in HPV16 E6E7-immortalized keratinocytes (Ker E6, Ker E7, Ker E6/7) compared to a HPV18 positive cell line (HeLa) or a cervical carcinoma cell line with no HPV genome at all (C33A). These findings suggested that HPV16 E6E7 oncoproteins could upregulate the ErbB2 expression in human cervical keratinocytes and contribute to their malignant transformation.

RESUMEN.

ErbB2 es un receptor que pertenece a la subclase I de la súper familia de receptores con actividad de tirosina cinasa. Este receptor es la pareja preferente de los miembros que comprende dicha familia para formar heterodímeros, cuyo ligando representativo es el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Los receptores tirosina cinasa se encuentran involucrados de manera normal en procesos relevantes de la vida de una célula, como proliferación y diferenciación, sin embargo ErbB2 se ha encontrado participando de manera importante en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, sobre todo en cáncer de mama en donde su sobre-expresión se relaciona con un mal pronóstico.

Existen reportes de sobre-expresión de ErbB2 en biopsias de cáncer cervical, en donde el aumento del receptor se encuentra relacionado con la agresividad del cáncer, así como también con la disminución en la sobrevida del paciente, sin embargo la participación del HPV en la sobre-expresión de ErbB2 no es clara.

El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión del receptor ErbB2 tanto a nivel de su RNAm como a nivel de proteína en líneas celulares provenientes de cáncer cervical. Otros de nuestros objetivos es establecer una posible relación entre la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV y la sobre-expresión del receptor ErbB2 en queratinocitos inmortalizados.

En nuestros resultados observamos que ErbB2 se encuentra transcrito en todas las líneas celulares de cáncer cervical (SiHa, CasKi, HeLa, C33A), así como en los queratinocitos inmortalizados (E6, E7 y E6/7). Por otro lado, encontramos una mayor expresión del receptor en líneas celulares positivas a HPV-16 (SiHa y CaSki) y en queratinocitos inmortalizados con E6 y E7 de HPV16 comparado con línea celular positiva a HPV18 (HeLa) o con la línea celular que no contiene genoma de HPV (C33A) en donde se mantienen bajos los niveles de expresión de éste receptor.

Estos resultados sugieren que existe una relación entre la presencia de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16 y la sobre expresión de ErbB2 lo cual contribuye a la transformación de las células en el cáncer del cuello uterino.

I. INTRODUCCIÓN.

Cáncer cérvico-uterino (CaCU).

El cáncer cervical se considera el segundo cáncer más frecuente en el mundo y es la quinta causa de muerte de cáncer en la mujer. Aproximadamente 470,000 nuevos casos de cáncer cervical se diagnostican anualmente, con una edad promedio de desarrollo de la malignidad de 52 años [1-2]. En países en vías de desarrollo, el cáncer cervical es la malignidad más frecuente en mujeres y constituye alrededor del 24% de todos los cánceres en la mujer [3].

En México, el CaCU ocupa el primer lugar entre los tumores malignos en la población femenina. En el año 2001 se registraron 4,512 defunciones, de las cuales el 47% de los casos se presentaron en mujeres entre los 35 a 54 años de edad. Debido a estas alarmantes cifras, el cáncer cérvico-uterino, se le considera actualmente como un grave problema de salud pública en México [4].

El cáncer cervical se origina en la zona de transformación, la cual está localizada en la capa basal del cérvix en donde las células columnares del endocervix se unen con el epitelio escamoso estratificado de la vagina. Las células que forman la zona de transformación tienen la particularidad de ser más vulnerables a la acción de carcinógenos [3]. El cáncer cervical invasivo está precedido por un amplio espectro de anormalidades progresivas en el epitelio cervical. Estas anormalidades están clasificadas como lesiones intraepiteliales escamosas (SIL por sus siglas en inglés, Squamous Intraepithelial Lesions) de bajo-grado y de alto-grado. Las lesiones preinvasivas son clasificadas como neoplasia intraepitelial cervical (CIN) grado 1, 2, 3, y carcinoma *in situ* (CIS). El grado de severidad de la lesión se mide por la extensión de epitelio cervical normalmente diferenciado que es remplazado por células de la lámina basal no diferenciadas [3].

Factores de riesgo para el desarrollo de CaCU.

En 1999 se demostró que la presencia del virus del papiloma humano (HPV por sus siglas en inglés, Human Papillomavirus) es una causa necesaria [5] pero no suficiente para desarrollar CaCU ya que se ha observado la participación de otros factores que contribuyen a su desarrollo [6-8].

Por medio de estudios epidemiológicos se demostró la asociación de varios factores de riesgo que conducen al desarrollo de cáncer cervical. Entre estos factores se incluye, como factor principal, la carga viral alta y persistente de HPV de alto riesgo [5], el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, el número de parejas sexuales, el número de embarazos, el uso de anticonceptivos orales, el hábito de fumar, factores nutricionales y factores inmunológicos [9-12].

Virus del papiloma humano (HPV)

El virus del papiloma humano (HPV) pertenece a la familia *Papoviridae*, estos son virus desnudos que miden entre 52-55 nm de diámetro, poseen una cápside icosaédrica, un genoma de DNA de doble cadena circular que mide aproximadamente 8000 pb. De manera específica el genoma del HVP-16 mide 7904pb (*GenBank* número de acceso **NC-001526**) [13].

La cápside del HPV está conformada por dos proteínas, la proteína L1 que es el elemento estructural primario, ya que cada partícula viral contiene 360 copias de la misma, organizada en 72 capsómeros. La proteína L2 se encuentra en menor proporción versus L1, en donde una molécula de L2 se encuentra al centro de cada capsómero pentavalente en los vértices del virión. Ambas proteínas juegan un papel importante al mediar la eficiencia de infección del virus [14-15].

Los virus del papiloma humano tienen la capacidad infectar células epiteliales como son: superficies cutáneas (frecuentemente manos y pies) y mucosas, causando una gran variedad de lesiones que van desde verrugas comunes hasta neoplasia cervical y cáncer invasor [16]. Se han identificado al momento más de 100 diferentes tipos virales, de los cuales casi la mitad infectan células epiteliales del tracto genital, estos últimos se clasifican en dos

categorías: de alto y bajo riesgo, de acuerdo a su capacidad oncogénica [17]. Los virus de alto riesgo se asocian con el desarrollo de cáncer ano genital, incluyendo los del cuello uterino, mientras que las infecciones por HPV de bajo riesgo solamente inducen verrugas genitales benignas. Entre los virus de alto riesgo se encuentran HPV-16 y HPV-18, mientras que los de bajo riesgo son HPV-6 y HPV-11. El HPV-16 es el más prevalente de los virus de papiloma humano de alto riesgo en la población general y es el responsable de aproximadamente el 50% de todos los cánceres cervicales (Tabla1) [17].

Organización del genoma del HPV.

El genoma viral se encuentra organizado en ocho principales genes, que están codificados en una sola cadena de DNA viral. Estos se encuentran clasificados como tempranos (E) o tardíos (L), basado en el momento de expresión de cada uno de éstos. Los genes tempranos codifican para proteínas involucradas en la replicación y transcripción viral, así como en la transformación celular. Los genes tardíos codifican para proteínas de la cápside (Tabla 2). El genoma viral también posee una región no codificadora a la cual se le da el nombre de región larga de control (LCR) en donde se encuentran tanto el origen de replicación como algunos de los elementos de control de la transcripción (Fig.1) [18].

Desarrollo de la infección.

El HPV infecta la lámina basal del epitelio escamoso estratificado. La lámina basal está compuesta de células que están constantemente dividiéndose y proporcionan un reservorio de células para las regiones suprabasales. El ciclo de vida del HPV, así como la expresión de las proteínas virales, están estrechamente relacionadas con la diferenciación de la célula huésped infectada [19].

Tabla 1. Tipos de HPV y su poder oncogénico [3].

Tipo de HPV	Oncogenicidad	Relación con el tipo de lesión
6, 11, 42, 43, 44	Baja	Bajo riesgo (condilomas, precancerosas)
16 y 18	Alta	Alto riesgo (precancerosas, invasoras)
31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68	Intermedia	Alto riesgo (lesiones de transito rápido)

Tabla 2. Genes y la función de sus productos [3].

Gen	Función
E1	Participa en el inicio de la replicación y transcripción del DNA viral.
E2	Proteína reguladora de la transcripción y auxiliar en el proceso de la replicación del DNA viral.
E4	Rompe la citoqueratina de la célula.
E5	Proteína de transformación de membrana; interactúa con receptores del factor de crecimiento.
E6	Proteína de transformación, tiene como blanco de degradación a p53.
E7	Proteína de transformación, se une a la proteína de retinoblastoma.
L1	Proteína L1, proteína de la cápside mayor.
L2	Proteína L2, proteína de la cápside menor.

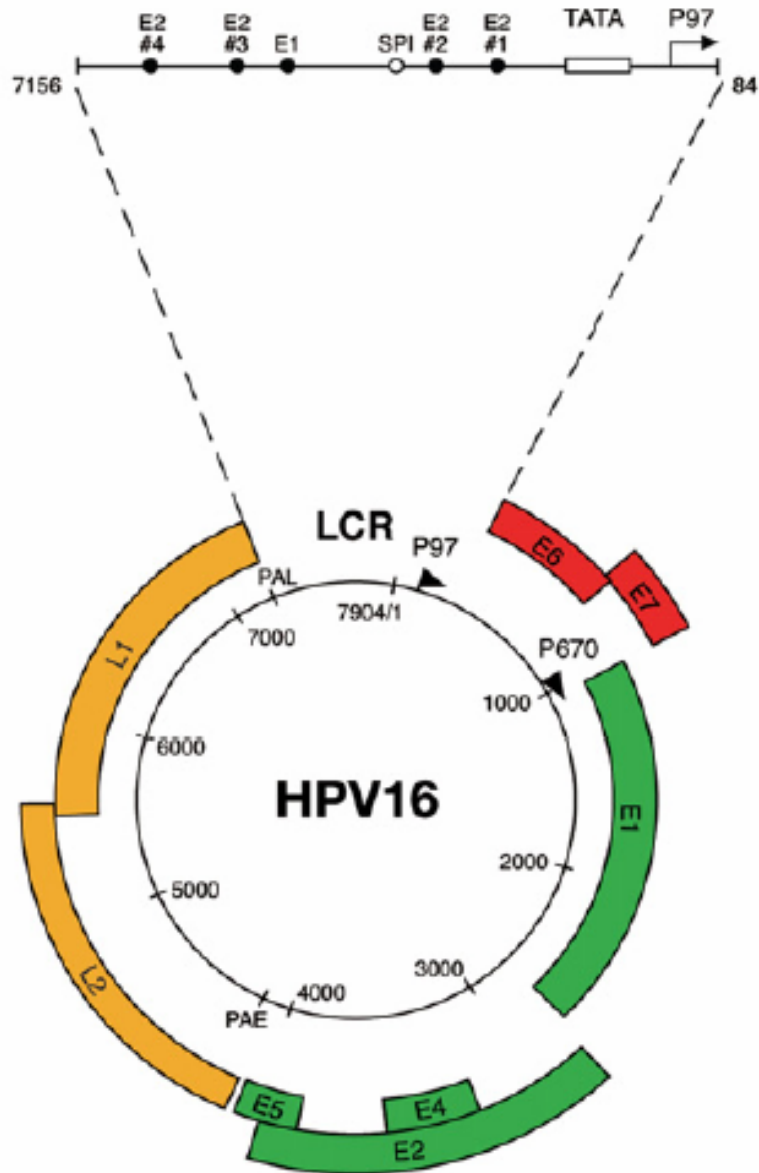


Figura1. Organización genómica del HPV-16. El genoma del HPV-16 de 7904pb es mostrado en un círculo negro, los números indican la posición de nucleótidos. Los ORFs tempranos y tardíos están representados afuera del genoma de doble cadena circular, los seis ORFs tempranos E1, E2, E4 y E5 (en verde) y E6 y E7 (en rojo) son expresados por el promotor p97. Los ORFs tardíos L1 y L2 (en amarillo) son expresados por el promotor p670. Se encuentran dos sitios de poliadenilación PAE (sitio de poliadenilación temprana) y PAL (sitio de poliadenilación tardía) [17]

La infección por papilomavirus ocurre a través de pequeñas lesiones producidas en el epitelio que exponen las células de la lámina basal a la penetración del virus. El receptor que se sugiere que promueve la entrada del HPV a su célula huésped es la $\alpha 6$ integrina, la cual se encuentra formando complejos con las $\beta 1$ y $\beta 4$ integrinas [20-22]. Por otro lado, el heparán sulfato es el mediador de la unión inicial del virus a la célula, seguida de la entrada de las partículas virales por un proceso que ha sido identificado como endocitosis [23]. En este mecanismo de endocitosis se han reconocido dos sistemas; el primero involucra a vesículas revestidas por el complejo proteico de clatrina y es utilizado por el HPV-16 y HPV-18 [24]; el segundo utiliza un grupo de proteínas llamadas caveolinas como es el caso del HPV-31 [25].

Los papilomavirus se desensamblan en endosomas tardíos y/o lisosomas, con la transferencia del DNA al núcleo siendo facilitada por la proteína L2 [24, 26]. La infección conduce al establecimiento del genoma viral como un elemento episomal estable, que conlleva a la replicación del DNA viral que resulta en la producción de 20 a 100 copias extra cromosómicas de DNA del HPV por cada célula de la lámina basal. Un número de factores de transcripción celular activan el promotor viral temprano (p97) para el inicio de la transcripción de los genes *E1* y *E2* que codifican para las proteínas que intervienen en la replicación y la transcripción del genoma viral, estas proteínas son denominadas E1 y E2 [27-28].

La proteína E2 es un factor de transcripción, que controla la expresión de los genes *E6* y *E7*. A concentraciones bajas, la proteína E2 funciona como activador transcripcional, mientras que a concentraciones altas reprime la expresión oncogénica evitando la unión de factores transcripcionales, dando paso a la replicación del genoma viral [29-30].

La oncoproteína E6 se une a la proteína supresora de tumor p53 promoviendo su degradación por medio de su unión con la proteína celular ubiquitina ligasa E6AP, lo que da como resultando en el bloqueo del proceso de apoptosis celular [31-32], mientras que la oncoproteína E7 tiene como blanco inhibir la función de la familia de proteínas del retinoblastoma (Rb) las

cuales están involucradas en la regulación del ciclo celular, de esta manera se produce la pérdida de la regulación de la división celular [33-34].

El paso final del ciclo productivo del virus concluye con la activación del promotor tardío p670 que controla la expresión de las proteínas L1 y L2, las cuales forman las cápsides icosaédricas en donde es empacado el genoma viral para producir las partículas infecciosas [35-37]. En el proceso del ensamble de las cápsides además de las proteínas L1 y L2 se requiere la proteína E2, [38-39] ya que se ha observado que ésta aumenta la eficiencia de la encapsulación del genoma durante la infección natural [40]. El ensamble del virión, así como su maduración se lleva a cabo en las capas superiores del epitelio en donde es liberado, infectando así a otras células (Fig. 2) [39].

Por otra parte, el HPV además de presentar un ciclo productivo, en donde su genoma se mantiene como un elemento episomal que conduce a la producción de partículas virales, su DNA también puede integrarse al genoma de la célula huésped, debido a ciertos factores que promueven dicha integración, a este proceso se le conoce como ciclo viral no productivo o abortivo. La integración rompe al gen *E2*, provocando que la expresión de la proteína E2 no se realice [41]. Por lo tanto los genes E6 y E7 del HPV no están ya regulados negativamente por la proteína E2, llevándose a cabo una sobre expresión de las oncoproteínas E6 y E7 que conducen a la célula a un estado de transformación.

Se ha observado que en muestras de pacientes, el DNA del HPV se encuentra integrado al genoma celular, tanto en cánceres invasivos como en un subgrupo de lesiones de alto grado, mientras que en las lesiones premalignas el genoma viral se encuentra en estado episomal [41].

Estructura y función de la oncoproteína E7.

La proteína E7 del HPV-16 es una proteína nuclear de 98 aminoácidos que presenta tres dominios: CR1 el cual se encuentra en el extremo amino terminal; CR2, el cual contiene un motivo LXCXE donde se une la proteína Rb; y un dominio CR3, por medio del cual forma dímeros vía a un motivo de dedos de zinc [42].

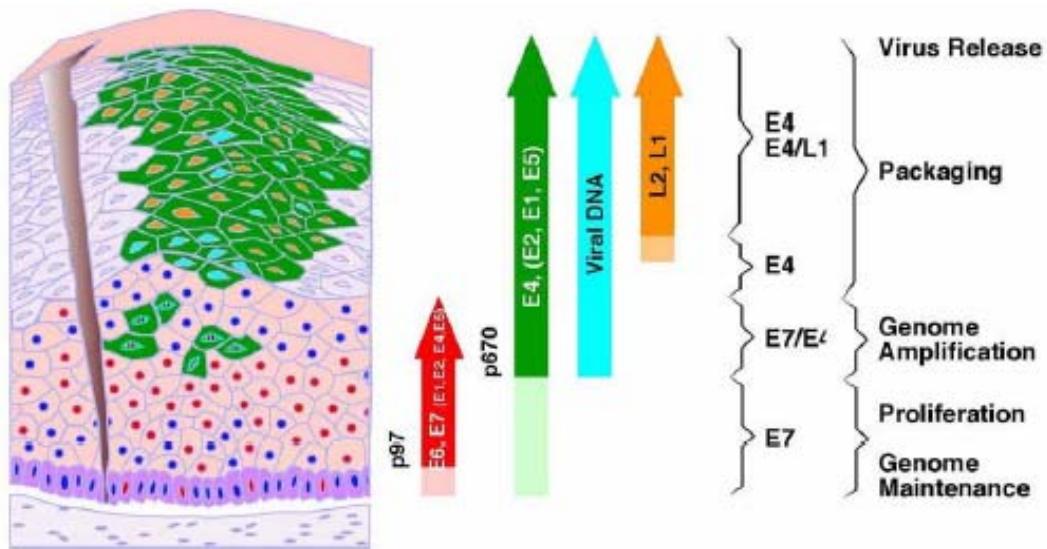


Figura 2. Desarrollo de la infección viral. La diferenciación del epitelio es representado en el diagrama de la izquierda, y los marcadores expresados son representados en flechas a la derecha. El HPV gana acceso a la lamina basal, estableciéndose con un numero bajo de copias en forma episomal. Las proteínas E6 y E7 (núcleo rojo) son expresadas por el promotor temprano, p97 en el HPV-16 en las laminas epiteliales bajas (flecha roja), las células no infectadas o no permisivas están representadas por núcleos azul oscuros. La expresión de E4 (verde) es dependiente del promotor tardío p670 in HPV-16 (flecha verde), es activada después de que termina la expresión de E6 y E7. La expresión de las proteínas de la cápside L1 y L2 (flecha en naranja) seguida de la terminación de la amplificación del genoma que ocurre en un subgrupo de células que expresan E4, E1, E2, E5 (células en verde) [17]

La proteína E7 interactúa con varias proteínas reguladoras del crecimiento celular, especialmente en la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, entre estas proteínas se encuentra la familia de proteínas supresoras de tumor de retinoblastoma (Rb) p107, p130, deacetilasas de histonas (HDAC), factores de transcripción AP-1, proteínas de unión a caja TATA (TBP), ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas (cdks) e inhibidores de cdks, de esta manera E7 desregula el ciclo celular y conduce al incremento de la proliferación celular, inmortalización y finalmente transformación [43].

En células normales la proteína Rb no se encuentra fosforilada y está formando complejos con factores de transcripción de la familia E2F, reprimiendo la transcripción de genes involucrados en la progresión hacia la fase S [44-45]; sin embargo, cuando las células progresan de la fase G₀ a través de la G₁ a la fase S, Rb es hiperfosforilada por cinasas dependientes de ciclinas, liberando al factor de transcripción E2F, el cual activa genes involucrados en la síntesis de DNA y permite la progresión del ciclo celular [44].

Cuando la proteína E7 del HPV se encuentra presente en la célula, secuestra a Rb evitando que forme complejos con E2F, de esta manera induce a las células a entrar prematuramente a la fase S, mientras que Rb es degradado a través de la ruta del proteosoma [46-48], sugiriendo que la oncoproteína E7 es capaz de desacoplar el proceso de diferenciación y progresión del ciclo celular por la transcripción de diferentes grupos de genes [47].

Estructura y función de la oncoproteína E6.

La proteína E6 del HPV de alto y bajo riesgo está compuesta de 150 aminoácidos con dos dominios de dedos de zinc, ésta proteína se encuentra distribuida tanto en el citoplasma como en el núcleo [49]. La proteína E6 es la causante de la inmortalización de las células y junto con la proteína E7 causa la transformación celular [50].

La proteína E6 tiene la capacidad de bloquear la apoptosis y alterar la maquinaria de transcripción, inhibe interacciones célula-célula e incrementa el tiempo de vida de las células, ocasionando la hiper proliferación de células epiteliales, disminución en su diferenciación, conduciendo a la formación de

tumores malignos y benignos [50]. E6 tiene como blanco a p53, y la proteínas como E6 (E6-AP), la proteína de unión a E6 (E6-BP) y otras como paxilina, Bak, Gps2 y la proteína cinasa N (PKN). Además E6 altera el índice de transcripción de genes como los que codifican la subunidad catalítica de la telomerasa humana y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) [43].

La proteína E6 se une a p53 formando un complejo con la ubiquitina ligasa E6AP, la formación de este complejo da como resultado la ubiquitinación de p53 y su subsiguiente degradación a través de la ruta del proteasoma [51-54].

Receptores y cáncer.

Los receptores ErbB están implicados en el desarrollo de algunos tipos de cáncer, el EGFR fue el primer receptor tirosina-cinasa relacionado directamente con algunos tumores en humanos; sin embargo, también se ha encontrado la presencia de ErbB2, participando en el desarrollo de diversos tipos de cáncer [55]. Los receptores ErbB experimentan varios tipos de alteraciones en tumores, como la amplificación del gen, que conduce a la sobreexpresión del receptor. En gliomas, la amplificación del gen *EGFR* es frecuentemente acompañado de rearrreglos estructurales que causan la eliminación de un fragmento del dominio extracelular del receptor [56]. De esta misma forma se ha encontrado amplificado el gen *erbB2* y por lo tanto el producto de éste gen se encuentra sobreexpresado en un subgrupo de tumores de mama [57]; esta sobreexpresión también ocurre en otros cánceres humanos, tales como el de ovario y el gástrico.

Otra de las alteraciones que se han encontrado en los receptores ErbB en el desarrollo de algunos tipos de cánceres son las mutaciones en el dominio tirosina-cinasa. En cáncer de pulmón de células pequeñas se han identificado este tipo de mutaciones tanto en ErbB2 como en EGFR [58-61]. El impacto de estas mutaciones sobre la actividad de ErbB2 sigue siendo explorada.

Receptores tirosina-cinasa.

La subclase I de la súper-familia de receptores tirosina-cinasa está formada por receptores de factor del crecimiento epidérmico (EGF) o ErbB; esta subclase se encuentra compuesta por 4 miembros: ErbB1/ EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4. Cada uno de estos miembros tiene una región de unión a su ligando extracelular con 4 subdominios, incluyendo dos dominios ricos en cisteína, una región transmembranal y un dominio citoplásmico tipo tirosina-cinasa [55, 62].

Los receptores ErbB se expresan en varios tejidos de origen epitelial, mesenquimal y neuronal. En condiciones fisiológicamente normales, la activación de los receptores ErbB esta controlada por la expresión de sus ligandos, los cuales son miembros de la familia del EGF. Dichos ligandos se unen a receptores ErbB induciendo la formación de homodímeros y heterodímeros, activándose así su dominio tirosina-cinasa, el cual sirve como sitio de anclaje para una gran cantidad de proteínas, el reclutamiento de estas conduce a la activación de varias rutas de señalización [63-64].

Ligandos de los receptores ErbB.

La familia de ligandos del EGF se divide en tres grupos: el primero incluye al EGF, al factor de crecimiento transformante- α (TGF α) y a la anfiregulina (AR), los cuales se unen específicamente al EGFR; el segundo grupo incluye a la betacelulina (BTC), el EGF de unión con heparina (HB-EGF) y la epiregulina (EPR), los cuales muestran una especificidad dual de unión con EGFR y ErbB4 [65]. El tercer grupo está compuesto de las neuregulinas (NRGs), las cuales a su vez se dividen en dos subgrupos con base en su capacidad de unión a los receptores ErbB. Las NRG1 y la NRG2 se unen a ErbB3 y ErbB4 [66-68] y las neuregulinas NRG3 y NRG4 se unen únicamente a ErbB4 [69]. Ninguno de los péptidos de la familia EGF se une a ErbB2; sin embargo, MUC4, un miembro de la familia mucina, actúa como un modulador intramembranal de la actividad de ErbB2 [70-73].

A pesar de no tener un ligando soluble, ErbB2 es importante porque formar heterodímeros con cualquiera de los monómeros de la familia de receptores EGF y participar como coreceptor [74-75].

La activación de los miembros de la familia ErbB estimula algunas rutas de señalización y a pesar del gran parecido de moléculas reclutadas por los diferentes receptores activados, los diferentes miembros de la familia ErbB modulan ciertas rutas de señalización, debido a su habilidad individual de unir a proteínas efectoras específicas. Las rutas principalmente activadas por estos receptores son la ruta de las MAP cinasas y la de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K) [64].

Estructura de los receptores ErbB.

La región extracelular de cada receptor ErbB consiste de cuatro dominios, la determinación de la estructura de la unión del ligando a el EGFR fue confirmada en estudios previos, que mostraron la importancia de los dominios I y III en la unión del ligando [76]. Estos estudios también mostraron que hay una interacción directa receptor-receptor promovida por el dominio II del brazo de dimerización; los ligandos no están involucrados en la interacción receptor-receptor [77-78].

La estructura de la región extracelular de ErbB2 es radicalmente diferente de los otros receptores de la familia ErbB2 ya que este tiene una conformación fija que se asemeja al estado activado del ligando: la interacción entre los dominios II y IV está ausente y la dimerización del asa en el dominio II se encuentra expuesto [79].

Esta estructura es consistente con la afirmación que indica que ErbB2 es la pareja preferida de los otros ErbBs activados, ya que es permanentemente atraído hacia la interacción con otros ligandos que se unen a receptores. Esto indica que ERBB2 posee un subdominio único de interacción I y III [79].

Activación de receptores ErbB.

Los ligandos de la familia ErbB, se encuentran como precursores transmembranales, los cuales son cortados y liberados por metaloproteinasas para la activación de los receptores ErbB [63]. La acción de los ligandos hacia sus receptores puede ser de dos formas: parácrina y autócrina.

La liberación de los ligandos resulta de la activación de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) o receptores de estrógeno (ER), que activan a su vez a metaloproteinasas las cuales van a cortar y liberar los prolíngandos, proceso conocido como liberación de ectodominio [80-82]. Una vez que se encuentra soluble el ligando se une a su receptor ErbB, provocando la formación de dímeros y heterodímeros, así como la fosforilación del dominio tirosina-cinasa, que conduce al reclutamiento de proteínas a residuos de tirosina fosforilados, para la activación de diversas rutas de señalización, las cuales llevan a la expresión de genes de sobrevivencia [64] (Fig. 3).

Las proteasas involucradas en la liberación del ectodominio pertenecen a una familia de metaloproteinasas, en particular la familia ADAM (una desintegrina y metaloproteinasa) y metaloproteinasas de matriz (MMPs). Entre las metaloproteinasas ADAM, las de mayor interés se encuentran las ADAM9, ADAM10, ADAM15 y ADAM17 por su asociación en la liberación de ligandos en células cancerosas. En tumores de mama, hay una correlación entre una alta actividad del EGFR y altos niveles de ADAM17 [82-84].

Receptor ErbB2.

El receptor ErbB2, también llamado HER2, neu, p185, es una molécula muy estudiada en la actualidad en relación al desarrollo del cáncer. El gen erbB2 está localizado en el cromosoma 17q21 y codifica a una glicoproteína transmembranal de 185 kDa, con actividad tirosina-cinasa intrínseca [85]. Notablemente, el receptor ErbB2 puede mediar la transducción de señales de todos los miembros de la familia de receptores ErbB cuando ellos se unen a sus ligandos [74].

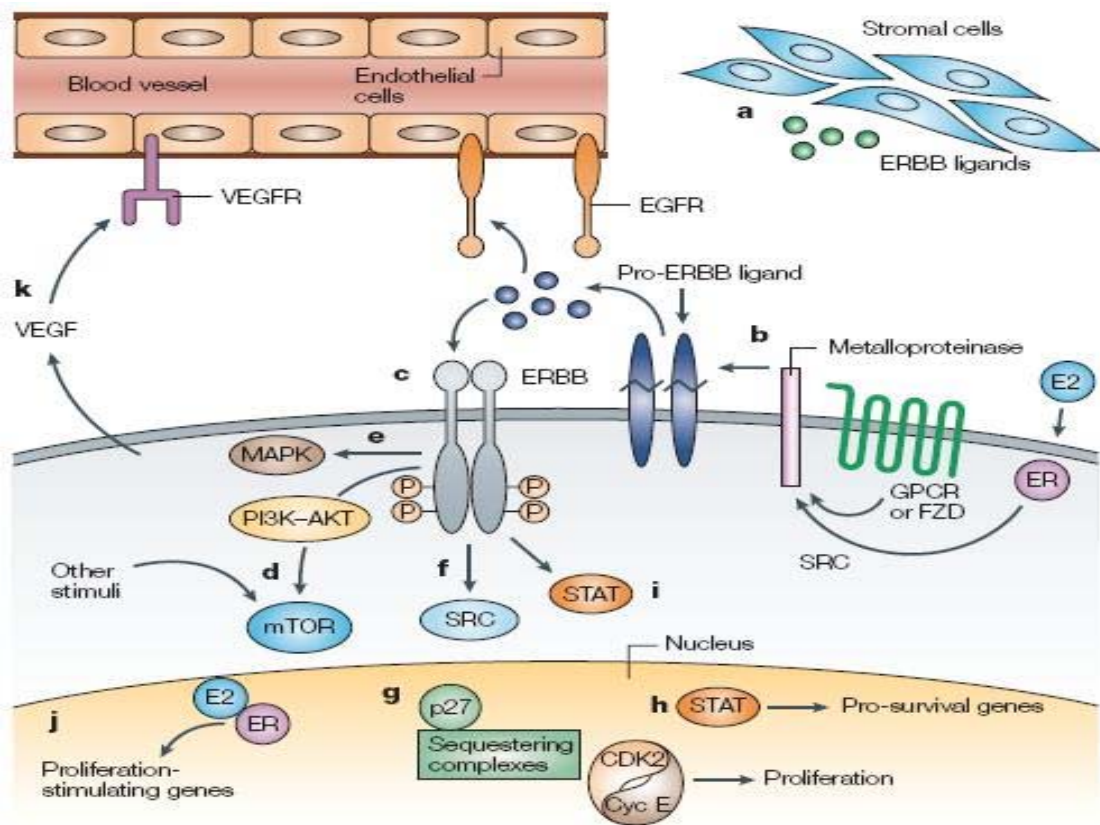


Figura 3. Activación de la familia de receptores ErbB. (a) ligandos ErbB con función parácrina, son liberados de células estromales. (b) Regulación autocrina. La producción de ligandos resulta de la activación de GPCRs o ER, los cuales causan la liberación de ligandos pro-EGF mediado por metaloproteinasas. (c) Los receptores ErbB activados estimulan numerosas rutas de señalización por el reclutamiento de proteínas al dominio tirosina-cinasa fosforilado en su dominio carboxilo terminal. (d) La ruta del fosfatidil inositol -3-cinasa (PI3K)-AKT, es estimulada a través del reclutamiento de la subunidad adaptadora p85 del receptor PI3K. Uno de los blancos de esta vía es la activación de mTOR, el cual actúa como un sensor central de nutrientes y energía. (e) La ruta de las MAPK es activada por el reclutamiento de proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2 (GRB2) o SHC al receptor. (f) La proteína SRC cinasa es activada por receptores ErbB y por GPCRs. Estas rutas de señalización llevan a la activación de efectores nucleares, (g) uno de estos es el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p27, el cual tiene un importante papel en el control de la proliferación, (h) (j) otros de los factores nucleares que se activan son las proteínas STAT y ER. (k) Los receptores ERBB también estimulan la transcripción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) a través de las rutas de las MAPK [55].

Por lo tanto, el receptor ErbB2 puede estar involucrado en la regulación de una variedad de funciones vitales que están controladas por algunos de los miembros de la familia de receptores ErbB, entre tales funciones se encuentran, el crecimiento celular, la diferenciación y la proliferación [85].

ErbB2 fue inicialmente identificado en neuroglioblastoma de ratas, a las cuales se les indujo esta enfermedad químicamente, de allí el que se le otorgue el nombre de neu. A diferencia de la proteína normal, la forma oncogénica expresada en éste modelo de rata posee una mutación puntual en lo que comprende la región transmembranal, la cual se sugiere como la causa principal de su efecto transformante, por incrementar la frecuencia del receptor para formar agregados. La mutación ocurre en la posición 664 de la secuencia de la proteína, llevándose a cabo una sustitución de una valina por un glutamato. Sin embargo, tal mutación puntual no ha sido observada en tumores humanos [85].

El gen *erbB2* juega un importante papel en el desarrollo del cáncer. Este se encuentra amplificado y/o sobreexpresado en aproximadamente el 30% de carcinomas mamarios y algunos otros tipos de cáncer, tales como de próstata, páncreas, colon y ovario [57, 86, 87]. El receptor ErbB2 se usa como un marcador de pronóstico, debido a que se ha observado, que los pacientes que presentan tumores que sobreexpresan a este receptor presentan un mal pronóstico clínico, en comparación con aquellos que no lo sobreexpresan [88].

La sobreexpresión de ErbB2 aumenta las propiedades relacionadas con la metástasis, como son, invasión, angiogenesis y sobrevivencia de las células cancerosas, lo que conduce a un incremento de la metástasis del cáncer [89-91].

El grupo de Yu [89-90] demostró que la sobreexpresión de ErbB2 podría aumentar el potencial metastásico de células cancerosas de mama y de pulmón mediante ensayos de metástasis experimental sobre un grupo de transfectantes de cáncer de mama y de pulmón expresando diferentes niveles de ErbB2. También demostraron que la sobreexpresión de ErbB2 puede sobreregular las actividades de proteasa de MMP-9 y MMP-2, incrementando la invasión de células de cáncer de mama [90]. La sobreexpresión de ErbB2 también puede incrementar la expresión de VEGF en células de cáncer de mama, junto con el aumento de la actividad de MMP-9, conduciendo a una

fuerte respuesta angiogénica [92]. La sobreexpresión de ErbB2 también puede conferir resistencia a la apoptosis en células de cáncer de mama [91].

II. ANTECEDENTES.

La proliferación de una célula normal está regulada por factores extracelulares que activan cascadas de transducción de señales a partir de receptores de superficie los cuales a través de moléculas citoplásmicas efectoras controlan el inicio y la progresión del ciclo celular. Las mutaciones en los genes que regulan esta red de señalización, conducen a alteraciones en la proliferación celular, contribuyendo así a la malignidad de las células. La familia de receptores ErbB está involucrada en varios procesos importantes del ciclo de vida de una célula, como son: proliferación y diferenciación. El daño en la estructura, en la expresión o en la amplificación del gen de alguno de los miembros de esta familia ErbB, puede romper con el equilibrio de las funciones biológicas de una célula.

Uno de los receptores de esta familia que se ha encontrado participando en una gran variedad de tumores humanos es *erbB2*, el cual se encuentra sobre-expresado en un 30% de casos de cáncer de mama, lo cual se correlaciona con un mal pronóstico [57, 86, 87]. En este tipo de cáncer, el mecanismo molecular involucrado en la sobreexpresión de ErbB2 es la sobrerregulación de la transcripción y la amplificación del gen correspondiente [93-94].

Salmón y col. (1987) analizaron 189 tumores de pacientes con cáncer de mama, encontrando al gen *erbB2* amplificado de 2-20 veces en el 30% de los tumores, siendo esto un importante indicador de pronóstico de un fenotipo más agresivo en cáncer de mama [57].

En 1987 Fioled y col. transfectaron células NIH/3T3 con el gen *erbB2* y demostraron que la sobreexpresión de esta proteína esta asociada con la transformación maligna de las células NIH/3T3, además, este aumento de los niveles de ErbB2, también fue observado en células de tumores de mama [95].

El gen *erbB2* también se sobreexpresa en otros cánceres tales como los de próstata, colon, páncreas, pulmón y cáncer cervical en donde ésta alteración también ha sido considerada como un marcador de mal pronóstico [96]. Estudios recientes en pacientes con cáncer de vejiga urinaria mostraron que existe sobreexpresión en el 80% de los tumores primarios y en el 62% de los de tumores con metástasis [97].

Otro tipo de cáncer en donde se ha encontrado la participación de ErbB2, es en el cáncer cérvico-uterino. Mitra y col. (1994) demostraron que el gen *erbB2* puede llegar a encontrarse amplificado de 5 a 68 copias por célula en carcinomas de células escamosas de cuello uterino; además, el gen *erbB2* en algunos casos puede mostrar mutaciones o rearrreglos [98].

Sato y col. (1991) analizaron 30 muestras de las cuales 23 provinieron de carcinoma endometrial y 7 de adenocarcinoma cervical. En cada una de ellas se les midió la expresión de la proteína ErbB2, observando que la proteína se expresa en un 30.4% de las muestras provenientes de carcinoma endometrial y en un 28.6% de las muestras de adenocarcinoma cervical, detectándose ErbB2 en la membrana plasmática [99].

Otro de los puntos que se han abordado es la de establecer una correlación entre el HPV-16 y HPV-18 con la sobreexpresión de ErbB2, así como también el pronóstico de sobrevivencia al encontrarse presente el HPV. Hasta el momento no se ha podido establecer una correlación entre la presencia de HPV en cáncer cervical y la sobreexpresión de ErbB2 [100].

III. JUSTIFICACIÓN.

La incidencia del cáncer cervical en América Latina es alta, éste tumor es el segundo cáncer mas común en la mujer y la segunda causa de muerte por cáncer, detectándose aproximadamente 470 000 nuevos casos al año [1-2].

En México ocupa el primer lugar entre los tumores malignos en la población femenina, provocando aproximadamente 4 512 defunciones al año, entre una edad promedio de 35 a 54 años de edad [4], por lo que se considera un grave problema de salud publica.

El agente etiológico del cáncer cervical es el HPV el cual se transmite por vía sexual, por lo que en varios países de América Latina han implementado campañas de prevención, como son las campañas de educación sexual para el control de la transmisión del HPV y de esta manera evitar la alta incidencia de cáncer cervical.

Sin embargo en México el porcentaje de mujeres diagnosticadas en etapas avanzadas de cáncer cervical sigue siendo alto, lo cual implica un mayor costo al país, al tratar de curarlas por medio de quimioterapia y radioterapia, las cuales dañan al paciente.

Por lo tanto es importante el estudio de la expresión de ErbB2 con el fin de ser usado como un blanco terapéutico que ayude en el tratamiento del cáncer cervical ya que se ha encontrado participando en el desarrollo de una gran proporción de cánceres, como es el cáncer de mama y el cáncer cervical, en donde esta molécula se asocia con un mal pronóstico.

Por lo que es pertinente evaluar la sobreexpresión de ErbB2 en cáncer cervical asociado con HPV y establecer una probable participación de las proteínas oncogénicas E6 y E7 en dicha expresión.

IV. HIPOTESIS.

Las oncoproteínas E6 y E7 del HPV se encuentran involucradas en la alteración de varios procesos celulares, provocando la inmortalización y transformación celular. Por tanto suponemos que la presencia de las oncoproteínas virales podrían estar favoreciendo la sobreexpresión del receptor ErbB2.

V. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Determinar los niveles de expresión del receptor ErbB2 en líneas celulares de cáncer cervical, así como también evaluar una posible participación las oncoproteínas E6 y E7 en la expresión de éste receptor en queratinocitos inmortalizados con dichas oncoproteínas, a nivel de transcripción y de traducción.

Objetivos particulares.

1. Evaluar la expresión de *erbB2* a nivel de RNAm en líneas celulares derivadas de cáncer cervical.
2. Medir la expresión del receptor ErbB2 y su localización, en líneas celulares derivadas de cáncer cervical.
3. Determinar la participación de las oncoproteínas E6 Y E7 en la expresión del receptor ErbB2, midiendo el nivel de RNAm de *erbB2* y el grado de expresión de la proteína, utilizando queratinocitos inmortalizados con dichas oncoproteínas.
4. Determinar la localización del receptor ErbB2 en los queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6, E7 y E6/7.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

Líneas Celulares.

Se utilizaron líneas celulares provenientes de cáncer cervical: HeLa (HPV-18) la cual contiene una copia del genoma viral por célula, SiHa (HPV-16) que contiene de 1-2 copias del genoma del virus por célula y CaSki (HPV-16) presenta alrededor de 600 copias del genoma vira por célula y C-33A (HPV negativo). Entre las otras líneas celulares utilizada se encuentran las provenientes de cáncer de mama, como son: la línea SK-BR-3 usada como control positivo (donada por los Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S.A de C.V), ya que sobre expresa el receptor ErbB2 y la línea MCF-7 usada como control negativo, debido a que esta reportada a expresar los niveles normales del receptor ErbB2.

Las líneas de cáncer cervical como las de cáncer de mama se crecieron en monocapa utilizando el medio de cultivo Tagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de SFB, 2mM de L-Glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina. Las células se propagaron en una incubadora a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

Como modelo de estudio para evaluar la acción de las oncoproteínas del HPV sobre el receptor ErbB2 se utilizaron queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6 y E7 (Ker E6, Ker E7 y Ker E6/7) del HPV-16. Los queratinocitos inmortalizados se crecieron en monocapa utilizando medio para queratinocitos (GibCo), suplementado con EGF humano recombinante (0.036267 µg/µl), extracto pituitario bovino (12.6 mg/µ) y penicilina/estreptomycin 1.0%. Estas células se propagaron en una incubadora a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

Anticuerpos.

Anti-c-ErbB2 Ab-1 (Calbiochem); anticuerpo policlonal dirigido contra la región tirosina cinasa del receptor ErbB2.

Anti-c-ErbB2 Ab5 (Calbiochem); anticuerpo monoclonal, dirigido contra el dominio extracelular del receptor ErbB2.

Neu (9G6) sc-08 (Santa Cruz); anticuerpo monoclonal, dirigido contra en dominio extracelular del receptor ErbB2.

Anticuerpo IgG conjugado con Fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Laboratories); anticuerpo policlonal, anti-ratón.

Kit Histostain-Plus (Zymed)

Extracción de RNA

Se realizó extracción de RNA de las de las líneas celulares de cáncer cervical y queratinocitos inmortalizados para posteriormente realizar RT-PCRs.

Se sembraron tres cajas p100 de cada una de las líneas celulares y queratinocitos previamente citados, se dejaron crecer a una confluencia del 80%, para ser utilizadas. Una vez alcanzado la confluencia deseada, a cada una de las cajas se les retiro el medio de cultivo y se agrego 1ml de Trizol (Invitrogen) por caja para ser procesadas como se describe en el Anexo I.

Una vez realizada la extracción, el RNA obtenido de cada una de las líneas se cuantifico por absorción a 260 nm a una dilución 1:20.

RT-PCR.

La detección de los genes *E6* y *E7* del HPV en líneas celulares de cáncer cervical y queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas, así como para las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas como controles, se realizo por medio de RT-PCRs. Por otra parte se evaluó el nivel de RNAm del gen *erbB2* en las líneas celulares de cáncer cervical, en los queratinocitos inmortalizados y en las líneas provenientes de cáncer de mama esto también se realizó por medio de ensayos de RT-PCRs.

Para la realización de la retrotranscripción se partió de 2.5µg de RNAm de cada una de las líneas celulares y de los queratinocitos inmortalizados para un volumen final de 21µl, los reactivos que se utilizaron en la retrotranscripción fue, oligonucleotidos de T, dNTPs a una concentración de 20mM y SuperScript II Transcriptasa Reversa 200U (Invitrogen). Anexo II

Posteriormente se realizaron PCRs para los genes, β -2-MG partiendo de 1 µl de cDNA, este se utilizo como control interno, para la amplificación del gen *erbB2* se utilizo 2.5 µl de cDNA y para los genes *E6* y *E7* se empleo 2µl de cDNA, la enzima utilizada en estas reacciones es la Taq DNA polimerasa recombinante 5 U/µl (Invitrogen) Anexo II

Los oligonucleotidos utilizados en las PCRs para la amplificación de cada gen así como la temperatura de alineamiento de cada par de oligonucleotidos se muestran en la Tabla 3.

Posteriormente los productos de las RT-PCRs fueron analizadas en un gel de agarosa al1% a 100 V con 150 mA por 30 min.

Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados en las RT-PCRs.

Gen	Oligo	Secuencia	Tm	Tamaño del producto
β -2-MG	S	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT	60	294pb
	AS	ATACTCATCTTTTTTCAGTGGGGGT		
<i>erbB2</i>	S	AGCTCTGCTACCAGGACACG	55	168pb
	AS	TCAGGCTCTGACAATCCTCA		
E6 HPV16	S	ACTGCAATGTTTCAGGACCC	55	344pb
	AS	TCAGGACACAGTGGCTTTTG		
E7 HPV16	S	CCCAGCTGTAATCATGCATG	55	269pb
	AS	TGCCCATTAACAGGTCTTCC		

Inmunocitoquímica.

Por medio de inmunocitoquímicas se detectó la expresión del receptor ErbB2 en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados.

Las líneas celulares provenientes de cáncer cervical, así como los queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6 y E7, se crecieron en cubreobjetos a una confluencia del 60%, enseguida se fijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se bloquearon las peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 3%, seguida de una incubación con la solución de bloqueo del Kit Histostain-Plus (Zymed). Una vez bloqueadas las laminillas, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-c-ErbB2 Ab1 (calbiochem) a una dilución 1:100, posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado de amplio espectro, al cual se le agregó el conjugado de estreptavidina-peroxidasa para ser revelado con diaminobencidina (DAB), todos estos reactivos fueron utilizados del Kit Histostain-Plus, por último, las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Harris y se montaron en medio de Gelyvatol para su observación en el microscopio óptico a un aumento de 40X (Anexo III).

Citometría de Flujo.

Por medio de citometría de flujo se midió el grado de expresión del receptor ErbB2 en las líneas celulares provenientes de cáncer cervical y en los queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas del HPV, utilizando como control positivo a la línea SK-BR-3 y como control negativo a la línea MCF-7.

Las células se crecieron en monocapas a una confluencia del 80-90%, se lavaron con PBS 1X y posteriormente se desprendieron utilizando una solución de EDTA de 5 mM para las líneas celulares de cáncer de cervical y las líneas provenientes de cáncer de mama y al 9 mM para los queratinocitos inmortalizados, enseguida las células se fijaron con paraformaldehído al 4%. Una vez desprendidas las células, estas se lavan con PBS 1X, colectando el paquete celular por medio de centrifugación el cual se incubó con 20µl de anticuerpo primario, para esta técnica se probaron dos anticuerpos el Neu

(9G6) sc-08 (Santa Cruz) a una dilución 1:20 y el Ab5 (Calbiochem) a una dilución 1:20, en seguida se incubo con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (FITC) a una dilución 1:100 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y la cuantificación se realizó por citometria de flujo en un analizador FACScan de Becton-Dickinson que se encuentra en el departamento de Biología Celular del CINVESTAV, en donde se analizaron 10 000 eventos por experimento (Anexo IV)

Inmunofluorescencia.

Se determino la localización del receptor ErbB2 en cada una de las líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6 y E7 del HPV, utilizando como control positivo a la línea SK-BR-3 y como control negativo a la línea MCF-7, la cual expresa los niveles basales.

Cada una de las líneas celulares se sembró en cubreobjetos y se dejaron crecer a una confluencia del 60%, en seguida se fijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente se bloquearon con albúmina al 3% en PBS 1X, seguida de una incubación con RNAsa A (Usbiological) a una concentración de 10 µg/ml. En seguida se incubó con el anticuerpo primario Neu (9G6) sc-08 (Santa Cruz) a una dilución 1:20 y posteriormente se incubo con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína (FITC) diluido 1:100 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Por ultimo las células se contratiñeron con yoduro de propidio a una concentración de 20 µg/ml. Las laminillas se montaron en una solución de Gelvatol y se observaron en un microscopio confocal Leica (modelo DMIRE2) localizado en el departamento de Biología Celular del CINVESTAV. Las muestras se observaron a un aumento de 63X y se realizaron cortes de 1 µ (Anexo V).

VII. RESULTADOS.

Se ha observado en diversos estudios que el gen *erbB2* se encuentra sobre-expresado en diversos tipos de cáncer en humano, tal como en cáncer de mama, en el cual el 30% de los casos presentan sobreexpresión del receptor ErbB2 también denominado oncogen HER-2/neu. Otros tipos de cáncer en los que se ha observado dicha sobre-expresión son el cáncer de próstata, páncreas, colon, ovario y cáncer cervical. Esta proteína ha cobrado una gran importancia ya que se ha comprobado que esta asociada con un mal pronóstico.

Por lo antes mencionado, decidimos evaluar la expresión del receptor ErbB2 en líneas de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6 y E7 del HPV. Para cumplir con nuestros objetivos se realizaron ensayos de RT-PCR, inmunocitoquímica, citometría de flujo e inmunofluorescencia. Como controles se emplearon líneas celulares de cáncer de mama, utilizando a la línea SK-BR-3 como control positivo y la línea MCF-7 como control negativo.

Expresión de E6 y E7 del HPV en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados.

Para comprobar la presencia de E6 y E7 así como la transcripción de estos oncogenes en las líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6 y E7, se realizaron pruebas de RT-PCR.

Los productos de las RT-PCRs se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Observamos en la línea celular SiHa (HPV-16) dos bandas, una con un peso de 344 pb que corresponde al transcrito completo de la oncoproteína E6 y una banda de 161 pb que corresponde al RNAm viral producido por un “splicing” alternativo que codifica para una oncoproteína de menor tamaño (E6*), esto es debido a que el par de oligonucleotidos utilizados permite la amplificación simultánea de estos dos transcritos. De esta manera se comprobó la presencia de E6 y su transcripción en esta línea celular (Fig. 4a).

En la línea celular CaSki (HPV-16) se obtuvo solamente una banda que corresponde al tamaño de 161 pb con una intensidad muy similar a la obtenida en la línea SiHa que corresponde a los transcritos de la oncoproteína E6*, esto es indicativo de la presencia del gen que codifica para dicha proteína (Fig. 4a).

En la línea celular HeLa (HPV-18), no se obtuvo ningún producto de la RT-PCR que se le realizó para el gen *E6*, esto es debido a que la región del transcrito de E6 del HPV-18 donde se alinean los oligonucleotidos utilizados no son complementarios (Fig. 4a), por lo que posteriormente se utilizaron oligonucleotidos específicos para los transcritos del HPV-18.

En la línea celular C-33 A (HPV negativo) no se observó ninguna banda que correspondiera al tamaño de cDNA del gen E6 que se está amplificando, esto concuerda con lo que esperaba, ya que ésta línea celular no contiene el genoma del HPV (Fig. 4a).

En los queratinocitos inmortalizados con E6 y E6/7 (HPV16) se obtuvieron dos bandas como lo esperábamos, una de 344 pb y otra de 161 pb, que corresponden al tamaño del RNAm completo y al del RNAm de menor tamaño producto del “Splicing” alternativo que codifican para E6 y E6* respectivamente. Por otro lado en los queratinocitos E7 como era de esperarse no obtuvimos ninguna banda, esto debido a que estas células no fueron inmortalizadas con el gen E6 (Fig.4a).

También se realizaron ensayos de RT-PCR para el gen E6 en las líneas celulares provenientes de cáncer de mama (SK-BR-3 y MCF-7), que se utilizaron como controles para la expresión de ErbB2, como era de esperarse no obtuvimos ningún amplificado debido a que el origen tumoral de éstas líneas no está relacionado con el HPV (Fig. 4a).

De la misma manera, por medio de ensayos de RT-PCR se detectó la expresión del gen *E7* en cada una de las líneas celulares provenientes de cáncer cervical (SiHa, CaSki, HeLa, C-33 A) utilizadas. Como se observa en la figura 4b, las líneas celulares SiHa y CaSki (HPV-16) muestran una banda de 269 pb que corresponde al fragmento amplificado por los oligonucleotidos utilizados para el gen *E7*, lo cual nos indica que este gen se encuentra presente y se está expresando.

En la línea celular HeLa (HPV-18), no fue posible amplificar el gen *E7* con los oligonucleotidos utilizados (Figura 4b), por lo que se decidió utilizar otro par de oligonucleotidos específicos para las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-18 (donados por el doctor Patricio Gariglio), estos oligonucleotidos se alinean en una parte del RNAm de E6 y el otro en una región de E7 amplificando simultáneamente los transcritos de las dos oncoproteínas dando como resultado una banda de 218 pb, la cual podemos observar en la figura 4d.

En la línea C-33 A no obtuvimos ningún amplificado debido a que éstas células no contienen el genoma viral, por que su origen tumoral no esta relacionado con el HPV (Fig. 4b).

Se realizaron de la misma forma ensayos de RT-PCRs para los queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas del HPV-16 para verificar la presencia del gen *E7* así como su transcripción. En los queratinocitos E7 y E6/7 se obtuvo una banda de 269 pb la cual corresponde a los transcritos del gen *E7*. En el caso de los queratinocitos E6 no se obtuvo ningún amplificado como se esperaba esto es debido a que estas células no fueron inmortalizadas con el gen *E7* (Fig. 4b).

En las líneas celulares SK-BR-3 y MCF-7 no se obtuvo ninguna banda para E7 como se esperaba, ya que estas son líneas celulares provenientes de cáncer de mama no tienen una relación con el HPV (Fig. 4b)

Como control interno, se amplificó el gen de la β -2-MG el cual es un gen constitutivo, dando una banda de 294 pb, esto se realizó para cada línea celular (Fig. 4c)

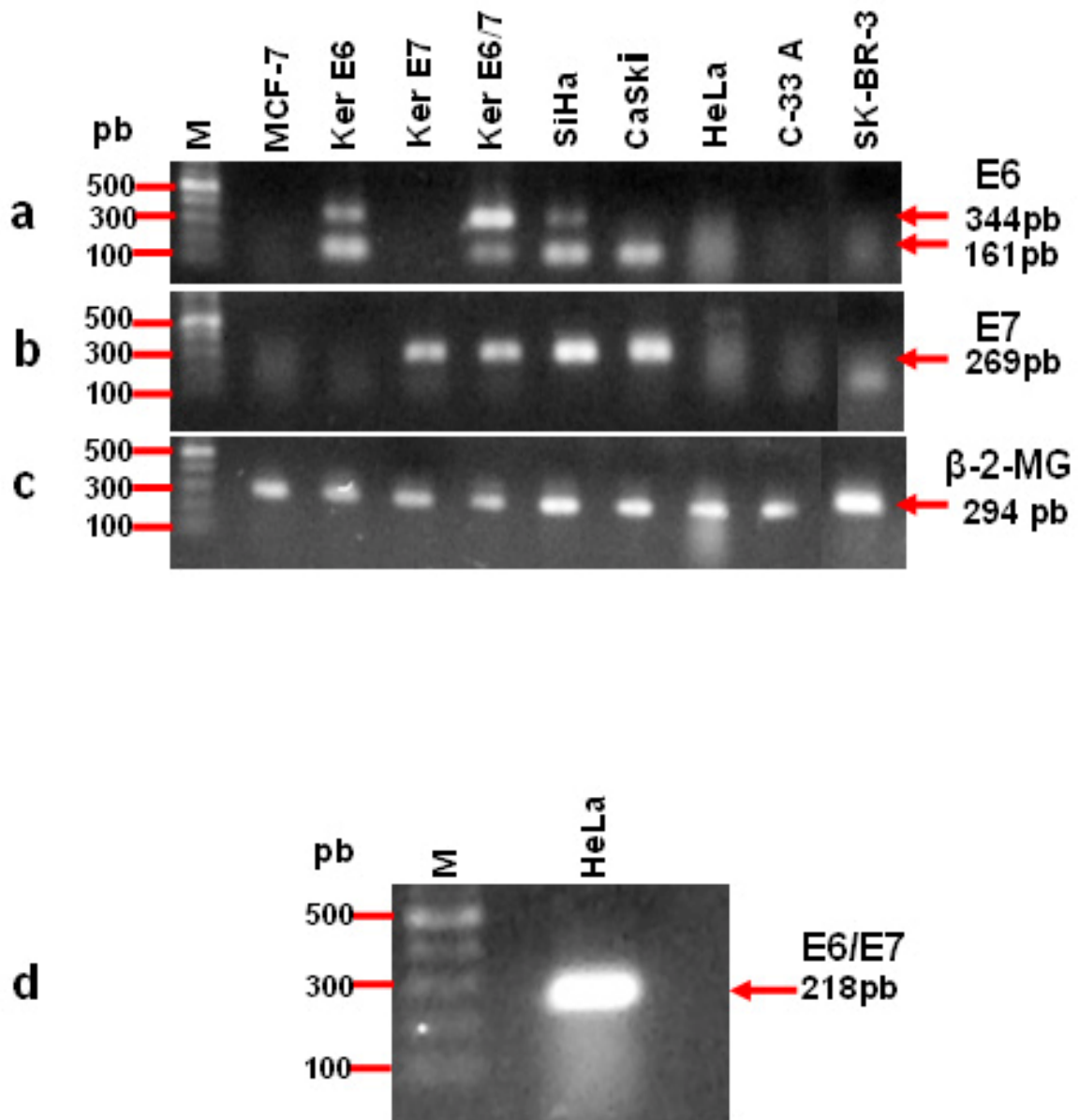


Figura 4. Detección de *E6* y *E7* por RT-PCR en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados con *E6* y *E7*, analizado en un gel de agarosa al 1%. **(a)** M corresponde al marcador de peso molecular de 100pb. En la línea celular Ker E6, Ker E6/7 y SiHa observamos los amplificados de E6 y E6* con un tamaño de 344 pb y 161 pb respectivamente. En CaSki se muestra una banda de 161pb correspondiente a E6*. En la línea celular MCF-7, Ker E7, HeLa, C-33 A y SK-BR-3 no se obtuvo ningún amplificado de E6. **(b)** En la línea celular Ker E7, Ker E6/7, SiHa y CaSki se observa el amplificado de E7 con peso molecular de 269 pb. En MCF-7, Ker E6, HeLa, C-33 A y SK-BR-3 no se amplificó el gen. **(c)** En este panel se muestra los amplificados de β -2-MG de cada línea celular. **(d)** M corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb y en el segundo carril se observa una banda de 218 pb que corresponde al amplificado de E6 y E7 en HeLa con oligonucleótidos específicos para HPV-18.

Expresión de *erbB2* en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados.

Para determinar la expresión de *erbB2* se realizaron ensayos de RT-PCRs, los cuales fueron analizados en un gel de agarosa al 1%.

Se observó que en las líneas celulares provenientes de cáncer cervical (SiHa, CaSki, HeLa y C-33 A) una banda de 168pb correspondiente al fragmento amplificado de *erbB2*. En los queratinocitos E6, E7 y E6/7 de igual forma se logró amplificar *erbB2* (Fig. 5a). Como control positivo de la expresión de *erbB2* se utilizó la línea SK-BR-3 la cual está reportada que sobreexpresa la proteína producto de este gen y como control negativo se tomó a la línea MCF-7 la cual está reportada que expresa los niveles basales del receptor ErbB2 (Fig. 5a).

De esta manera pudimos ver que todas las líneas celulares se encuentran expresando *erbB2*, sin embargo pareciera que en la línea CaSki y en los queratinocitos E7 y E6/7 se estuviera expresando mayores niveles pero esto se debe corroborar por técnicas cuantitativas como RT-PCR en tiempo real.

Como control interno se amplificó a β -2-MG para cada línea celular como se muestra en la figura 5b.

Las líneas celulares de cáncer cervical y queratinocitos inmortalizados expresan el receptor ErbB2.

Una vez que se observó que el gen *erbB2* se está transcribiendo en las líneas celulares de cáncer cervical, quisimos ver si el RNAm producido se estaba traduciendo en estas líneas celulares, para cumplir con nuestro objetivo se realizaron ensayos de inmunocitoquímica.

Para la realización de las inmunocitoquímicas cada línea celular se sembró en cubreobjetos a una confluencia del 60%, posteriormente se fijaron con paraformaldehído y se incubaron toda la noche con el anticuerpo Ab-1 (Calbiochem) dirigido contra el dominio intracelular del receptor ErbB2, para revelar se utilizó el complejo DAB y fueron visualizadas en el microscopio óptico con un aumento de 40X.

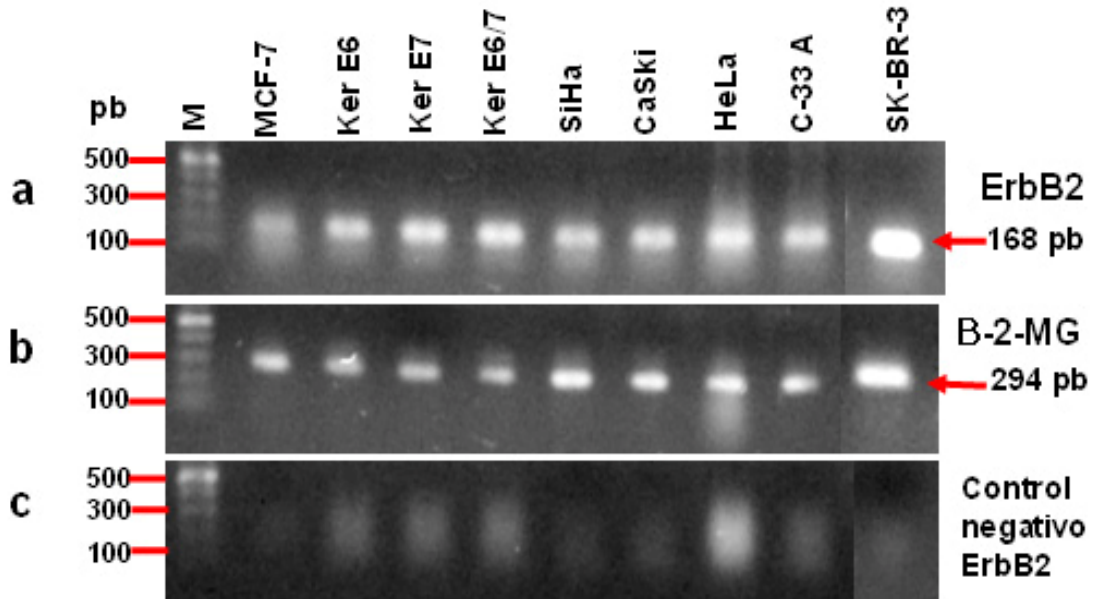


Figura 5. Detección de *erbB2* por RT-PCR en líneas celulares de cáncer cervical y queratinocitos inmortalizados con *E6* y *E7*, analizado en un gel de agarosa al 1%. **(a)** M corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb. En la línea celular MCF-7 se muestra una banda de 168 pb la cual corresponde a los niveles basales de *erbB2*, esta línea celular se tomo como control negativo. En la línea Ker E6, Ker E7 y Ker E6/7 se obtuvieron amplificadas los cuales corresponden a *erbB2*. De igual manera en SiHa, CaSki, HeLa y C-33 A se obtuvo una banda de 168 pb la cual corresponde al fragmento amplificado de este gen. En la línea celular SK-BR-3 se muestra el control positivo de la expresión de *erbB2*. **(b)** En este panel se muestra los amplificadas β -2-MG de cada una de las líneas celulares, el cual fue utilizado como control interno. **(c)** En este panel se muestran RT-PCRs para *erbB2*, a las cuales no se les coloco transcriptasa reversa, este fue utilizado como control negativo interno.

Los resultados obtenidos muestran que las líneas SiHa y CaSki (HPV-16) así como la línea HeLa (HPV-18) se encuentran expresando el receptor ErbB2, al igual que la línea celular C-33 A (HPV negativo) (Fig. 6)

Enseguida evaluamos si se estaba llevando a cabo la expresión de ErbB2 en los queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6, E7 y E6/7 por medio de inmunocitoquímica y observamos que las tres líneas celulares lo expresan, sin embargo la expresión obtenida en los queratinocitos E7 y E6/7 parece ser mayor a la obtenida en los queratinocitos E6 (Fig. 7).

Curiosamente, la marca que corresponde a ErbB2 en todas las líneas celulares pareciera encontrarse distribuida uniformemente en el citoplasma, lo cual se debe corroborar mediante microscopia confocal, debido a que la técnica utilizada no proporciona información sobre la ubicación de la proteína.

Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en líneas celulares de cáncer cervical y en queratinocitos inmortalizados.

Una vez detectado que el receptor ErbB2 se encuentra expresado en las líneas celulares de cáncer cervical, así como en los queratinocitos E6, E7 y E6/7, se prosiguió a medir el nivel de expresión del receptor, así como evaluar la localización de éste en cada una de las líneas celulares, esto se realizó por medio de ensayos de citometría de flujo e inmunofluorescencias analizadas por microscopia confocal.

En el caso de las citometrías de flujo se colocaron 5×10^5 células por tubo en cada experimento por línea celular, cada una de las líneas se probó con el anticuerpo sc-08 anti-ErbB2 (Santa Cruz) y el Ab-5 anti-ErbB2 (Calbiochem) y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-ratón acoplado a fluoresceína, las muestras se sometieron a citometría de flujo donde se analizaron 10 000 eventos por muestra. Como control de isotipo se utilizó un anticuerpo anti-ratón IgG inespecífico.

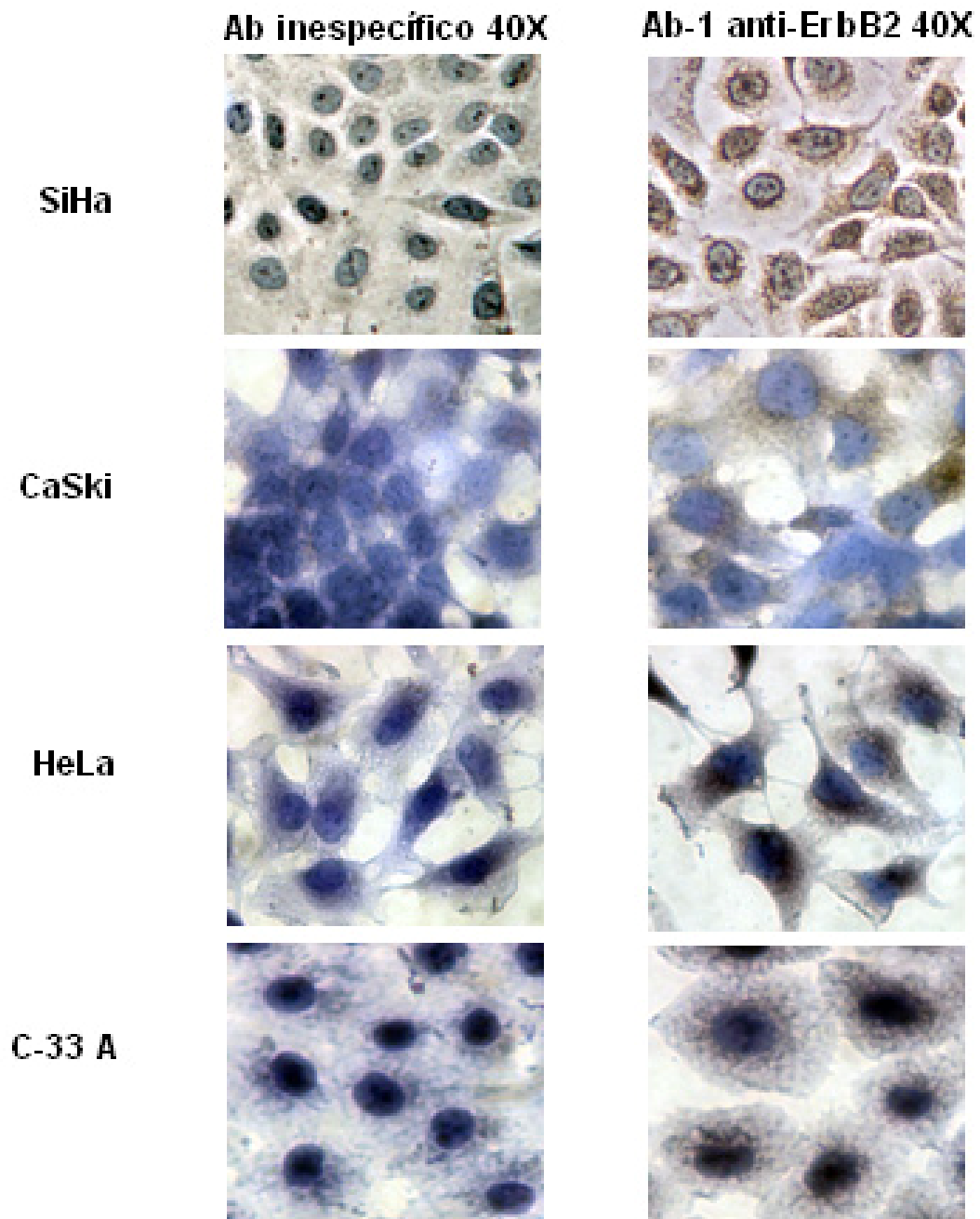


Figura 6. Detección de la expresión de ErbB2 en líneas celulares de cáncer cervical por inmunocitoquímica. Las figuras de la izquierda corresponden al control de cada una de las líneas celulares con un anticuerpo IgG de ratón inespecífico. Las figuras de la derecha corresponden a las muestras tratadas con el anticuerpo IgG Ab1 anti-ErbB2 (Calbiochem). Podemos observar que en las líneas celulares SiHa, CaSki, HeLa y C-33 A una marca de color sepia que corresponde a la proteína ErbB2, estas fueron observadas en microscopio óptico a 40X.

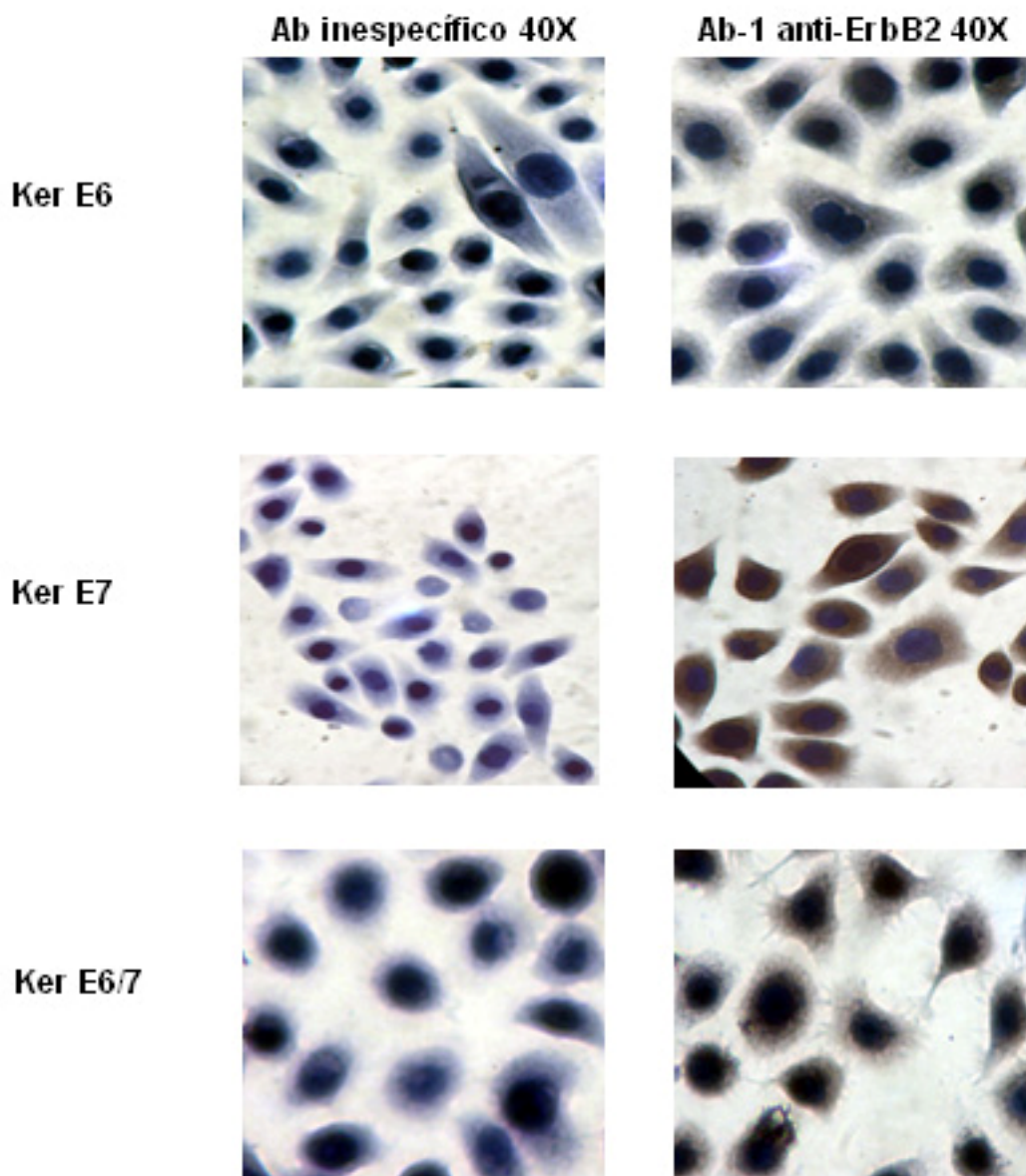


Figura 7. Detección de la expresión de ErbB2 en queratinocitos inmortalizados por inmunocitoquímica. Las figuras que se muestran a la izquierda corresponden al control de cada línea celular con un anticuerpo IgG inespecífico. En las figuras de la derecha se muestran las células con el anticuerpo Ab-1 anti ErbB2 (Calbiochem). Se observa la expresión del receptor ErbB2 en color sepia en los queratinocitos E6, E7 y E6/7. Las muestras fueron vistas en microscopio óptico a 40X.

Para la realización de las inmunofluorescencias, cada línea celular se sembró en cubreobjetos a una confluencia del 60%, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído y enseguida se incubaron con el anticuerpo Sc-08 anti-ErbB2 (Santa Cruz). Posteriormente se incubaron con un anticuerpo acoplado a fluoresceína, usando como contra tinción el yoduro de propidio. Las preparaciones fueron visualizadas en microscopia confocal a un aumento de 63X, las fotografías fueron tomadas en tres canales, en el de fluoresceína (verde), en yoduro de propidio (rojo) y en Nomarski.

En la figura 8 Ia se muestra el nivel de expresión de ErbB2 en la línea celular SK-BR-3 utilizando los anticuerpos sc-08 y Ab-5, en donde se observó un incremento del 92.73% y el 51.06% respectivamente en el número de células marcadas con respecto al control de isotipo (IgG inespecífico), siendo más específico el anticuerpo sc-08. La expresión determinada por citometría de flujo se observó en la membrana celular al realizar inmunofluorescencia analizada por microscopia confocal como se observa en la figura 8 Ic, d y e, en donde la marca en verde que corresponde a la proteína expresada se encuentra delimitada en la membrana celular y en rojo se muestran los núcleos.

Cabe mencionar que esta línea celular fue utilizada como control positivo, para evaluar la expresión de cada una de las líneas celulares, ya que esta reportada a sobreexpresar el receptor ErbB2.

Posteriormente se evaluó la expresión del receptor ErbB2 en la línea MCF-7, por citometría de flujo, obteniendo un 2.0% de células marcadas con el anticuerpo sc-08 y un 0.7% con el anticuerpo Ab-5 con respecto al control de isotipo (Fig. 8 IIa), estos valores corresponden a los niveles basales del receptor, ya que como se ha mencionado esta línea celular no lo sobreexpresa, por lo que fue utilizada como un control negativo de la expresión de ErbB2, estos resultados concuerdan con la expresión observada en las inmunofluorescencias, en donde la marca observada en la membrana celular fue muy baja (Fig. 8 IIc, d, e).

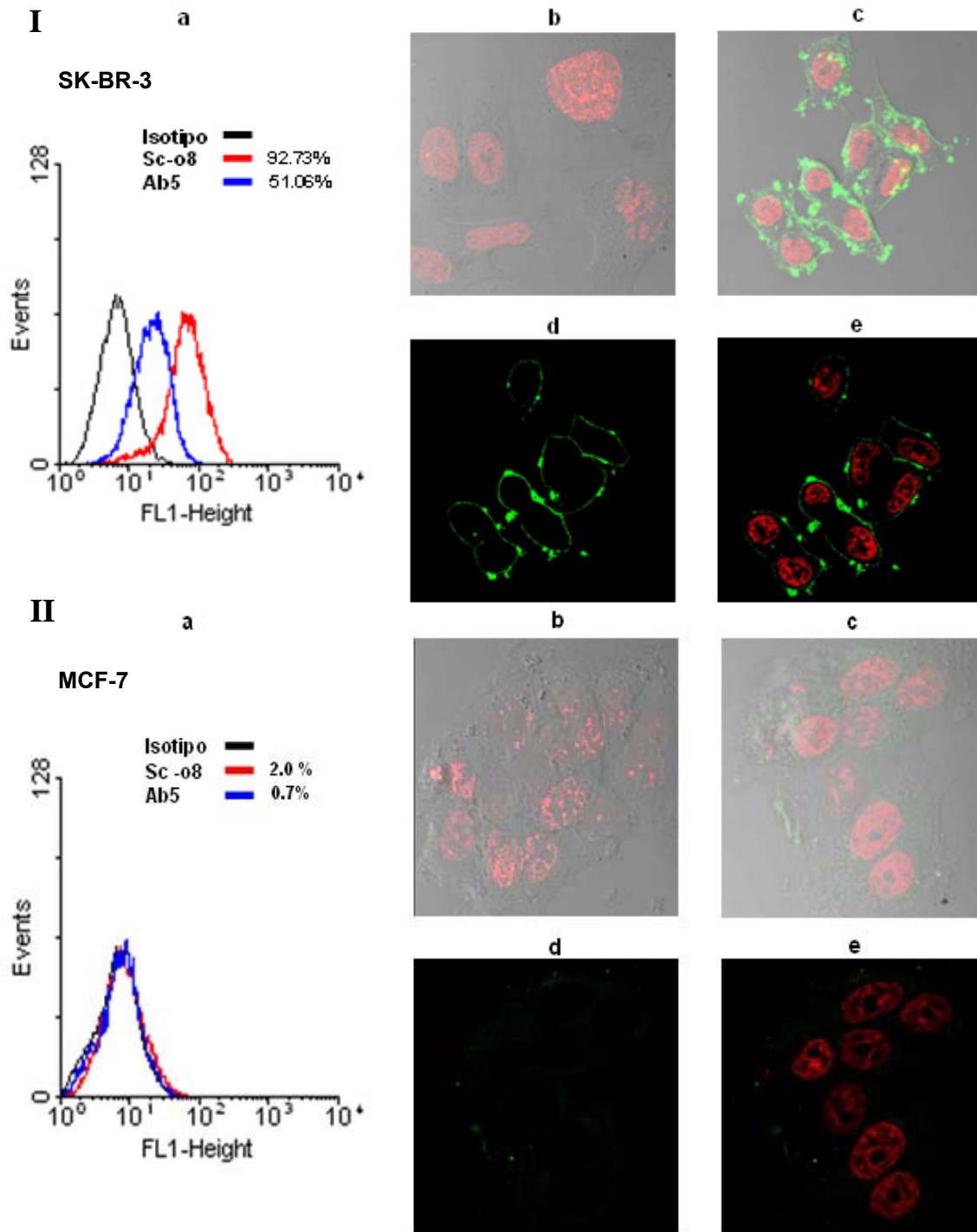


Figura 8. Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en las líneas SK-BR-3 y MCF-7 por citometría de flujo e inmunofluorescencia en microscopía confocal. En el panel I se muestra el análisis de SK-BR-3 y en el panel II corresponde a MCF-7. **(Ia, IIa)** Se muestran los valores obtenidos por citometría de flujo de la expresión de ErbB2 en SK-BR-3 y MCF-7. **(Ib, IIb)** Se muestra una proyección del control de isotipo (IgG inespecífico) de cada una de estas líneas celulares en el canal fluoresceína, yoduro de propidio y Nomarski. **(Ic, IIc)** Corresponde a la proyección de los cortes de las muestras tratadas con el anticuerpo sc-o8 anti-ErbB2, en el canal fluoresceína, yoduro de propidio y Nomarski. **(Id, IId)** Se muestra en el canal de fluoresceína un corte medio de las células SK-BR-3 y MCF-7, la marca observada corresponde a la expresión de ErbB2. **(Ie, IIe)** Corresponde a un corte medio visualizado en el canal de fluoresceína y yoduro de propidio. Las muestras analizadas en microscopía confocal fueron observadas a 63X.

En seguida evaluamos el nivel de expresión de ErbB2 en las líneas celulares de cáncer cervical, así como la ubicación de dicho receptor. Por citometría de flujo se encontró un incremento del 81.42% y 13.61% de células marcadas con los anticuerpos sc-08 y Ab-5 respectivamente en la línea celular SiHa (HPV-16) (Fig. 9 Ia), al realizar la inmunofluorescencia observamos que la marca en verde que corresponde a la expresión de ErbB2 se encuentra en la membrana celular (Fig. 9 Ic, d, e)

Al analizar la línea celular CaSki (HVP-16) se observó un incremento de células marcadas del 78.18% al utilizar el anticuerpo sc-08 y un 59.18 % con el anticuerpo Ab-5 con respecto al isotipo (Fig. 9 IIa), dicha marca se observó en la membrana celular, cuando se realizaron inmunofluorescencias, las cuales fueron analizadas por microscopía confocal (Fig. 9 IIc, d, e).

En ambas líneas celulares (SiHa y CaSki) se detectó con el anticuerpo sc-08 una mayor expresión, la cual es considerablemente mayor a la obtenida en nuestro control negativo.

Se determinaron los niveles de la proteína ErbB2 por citometría de flujo en la línea celular HeLa (HPV-18) obteniendo un 9.62% de células marcadas con el anticuerpo sc-08 y un 1.03% con el anticuerpo Ab-5 (Fig.10 Ia), al analizarlas por inmunofluorescencia en microscopía confocal observamos una baja marca que corresponde a los valores obtenidos por citometría, la cual se encuentra en la membrana (Fig.10 Ic, d, e).

En la línea celular C-33 A (HPV negativo) se obtuvo un 30.99% y un 51.65% de células marcadas con los anticuerpos sc-08 y Ab-5 respectivamente (Fig.10 IIa), observando por inmunofluorescencia en microscopía confocal la marca en color verde que corresponde a la expresión de ErbB2 en la membrana celular (Fig.10 IIc, d, e)

A pesar de que HeLa contiene el genoma del HPV-18 el cual es de alto riesgo, no se observó la sobreexpresión del receptor ErbB2, manteniendo los niveles basales de éste, sin embargo inesperadamente en la línea C-33 A negativa a HPV obtuvimos valores mayores al de nuestro control negativo, sin embargo estos valores fueron menores a los observados en las líneas celulares que contienen el HPV-16.

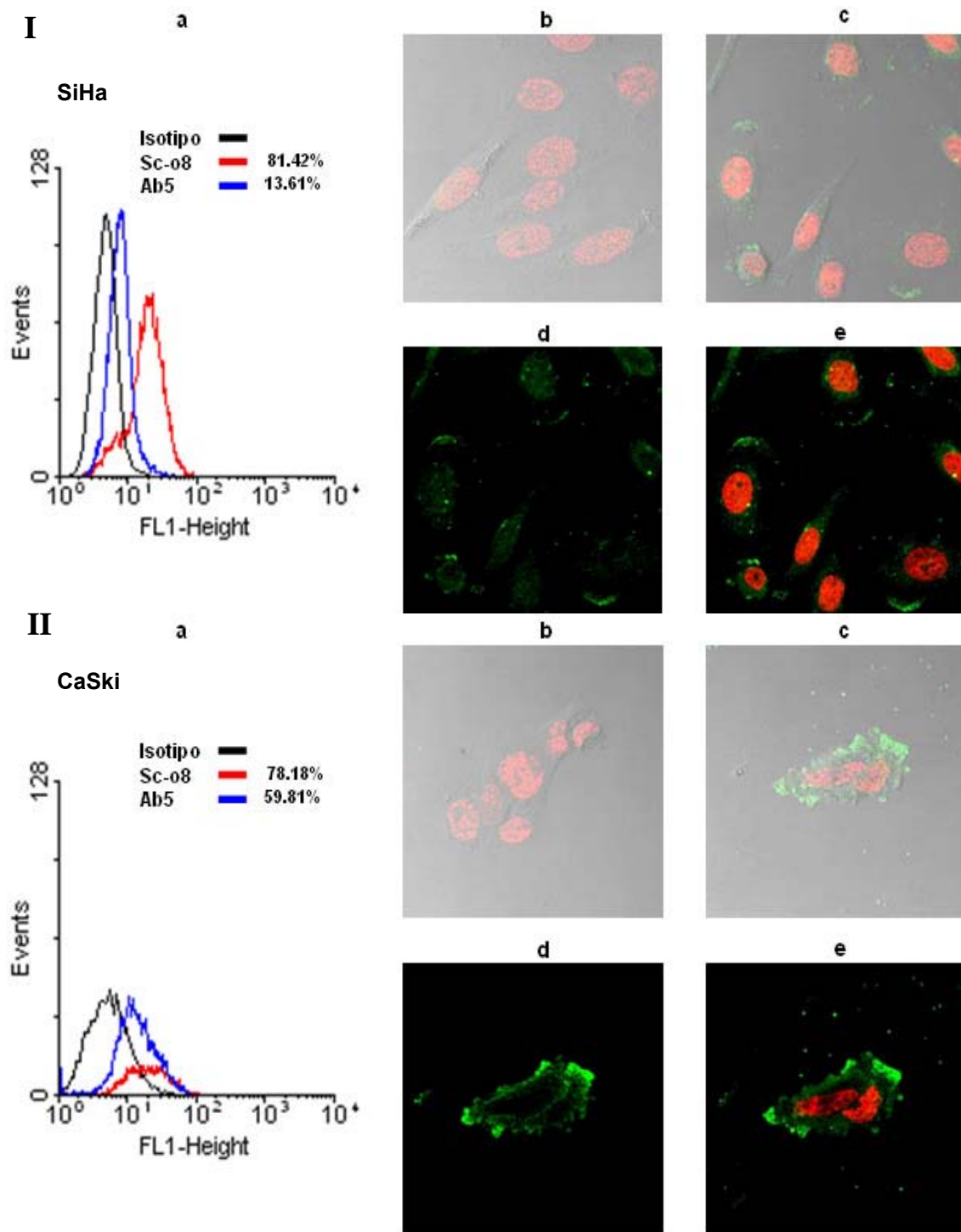


Figura 9. Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en las líneas celulares SiHa y CaSki por citometría de flujo e inmunofluorescencia en microscopia confocal. En el panel I se muestra el análisis de SiHa y en el panel II el de CaSki. **(Ia, IIa)** Se muestra los valores obtenidos de la expresión de ErbB2 por citometrías de flujo de las líneas SiHa y CaSki. **(Ib, IIb)** Se muestra una proyección de los controles de isotipo (IgG inespecífico) de cada una de estas líneas celulares en el canal de fluorescencia, yoduro de propidio y Nomarski. **(Ic, IIc)** Se presenta la proyección de los cortes de las muestras tratadas con el anticuerpo sc-08 anti-ErbB2 de SiHa y CaSki, en el canal de fluorescencia, yoduro de propidio y Nomarski. **(Id, IIId)** Se muestra un corte medio observado en el canal de fluorescencia, la marca corresponde a la expresión de ErbB2. **(Ie, IIe)** Se observa un corte medio en el canal de fluorescencia y yoduro de propidio. Las muestras analizadas en microscopia confocal se observaron a 63X.

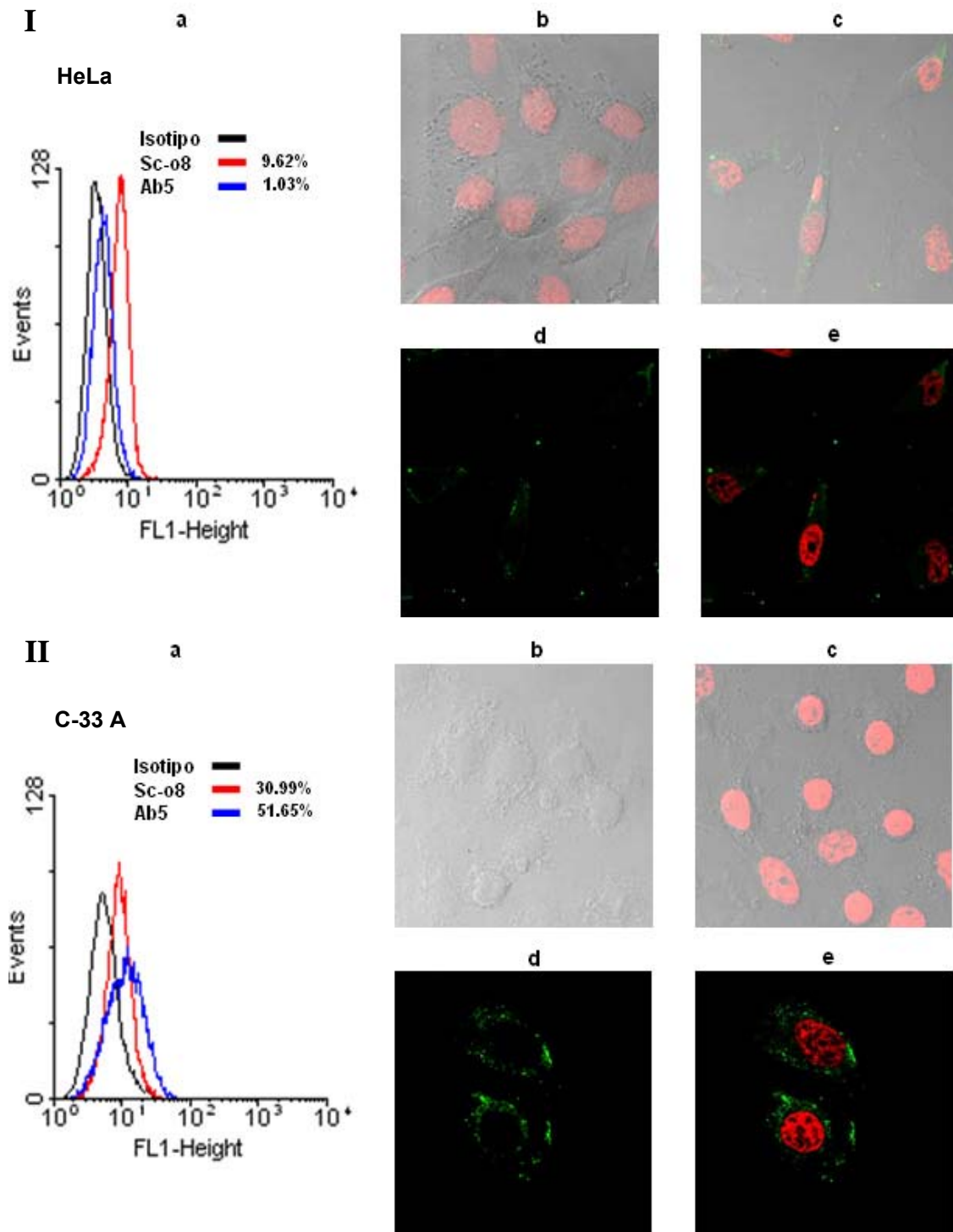


Figura 10. Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en las líneas celulares HeLa y C-33 A por citometría de flujo e inmunofluorescencia en microscopia de confocal. En el panel I se muestra el análisis de HeLa y en el panel II el de C-33 A. **(Ia, IIa)** Se muestran los resultados obtenidos de la expresión de ErbB2 por citometría de flujo en HeLa y C-33 A. **(Ib, IIb)** Se muestra una proyección de los controles de isotipo (IgG inespecífico) de cada una de estas líneas, en el canal de fluoresceína, yoduro de propidio y Nomarski. **(Ic, IIc)** Se presenta la proyección de los cortes de HeLa y C-33 A tratadas con el anticuerpo sc-08 anti-ErbB2 en el canal de fluoresceína, yoduro de propidio y Nomarski. **(Id, IId)** Se muestra un corte medio visto en el canal de fluoresceína, la marca observada corresponde a la expresión de ErbB2. **(Ie, IIe)** Se presenta un corte medio en el canal de fluoresceína y yoduro de propidio. Las muestras analizadas en microscopia confocal se observaron a 63X.

Una vez analizado la expresión de ErbB2 en las líneas celulares de cáncer cervical y al ver que la mayoría de estas lo sobreexpresan, lo que prosiguió fue ver el nivel de expresión y ubicación de éste receptor en los queratinocitos inmortalizados para evaluar la actividad de las oncoproteínas E6 y E7 en la expresión del receptor.

Al analizar por citometria de flujo a los queratinocitos inmortalizados E6, E7 y E6/7 se obtuvieron los siguientes valores, en los queratinocitos E6 se obtuvo el 84.56% de células marcadas con el anticuerpo sc-08 y con el Ab-5 un 76.56% con respecto al control de isotipo (Fig.11 Ia), mientras que en los queratinocitos E7 el porcentaje de células que se marcaron fueron del 90.61% y del 87.88% con los anticuerpos sc-08 y Ab-5 respectivamente (Fig.11 IIa). En los queratinocitos E6/7 obtuvimos valores del 83.19% con el anticuerpo sc-08 y con el anticuerpo Ab-5 el 66.24% (Fig. 12a).

Posteriormente realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo sc-08 en los queratinocitos E6, E7 y E6/7, las cuales fueron analizadas por microscopia confocal, en donde observamos que la marca en verde que se observa en los queratinocitos E6 (Fig.11 Ic, d, e) y los queratinocitos E7 (Fig.11 IIc, d, e) que corresponde a la expresión de ErbB2 se encuentra en la membrana celular, de esta manera también fueron analizados los queratinocitos E6/7 donde la expresión del receptor se observa en la membrana celular (Fig. 12c, d, e).

Se obtuvo una mayor afinidad del anticuerpo sc-08 para detectar el receptor ErbB2. Con respecto a los valores obtenidos con este anticuerpo podemos decir que en las líneas celulares de cáncer cervical que contienen el genoma del HPV-16 (SiHa y CaSki) se encuentran sobreexpresando el receptor ErbB2 al compararlas con el control negativo, de la misma manera las tres líneas celulares de queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6, E7 y E6/7 (HPV-16) se encuentra sobreexpresado éste receptor, obteniendo por citometria de flujo valores muy similares a los obtenidos a nuestro control positivo (Fig. 13).

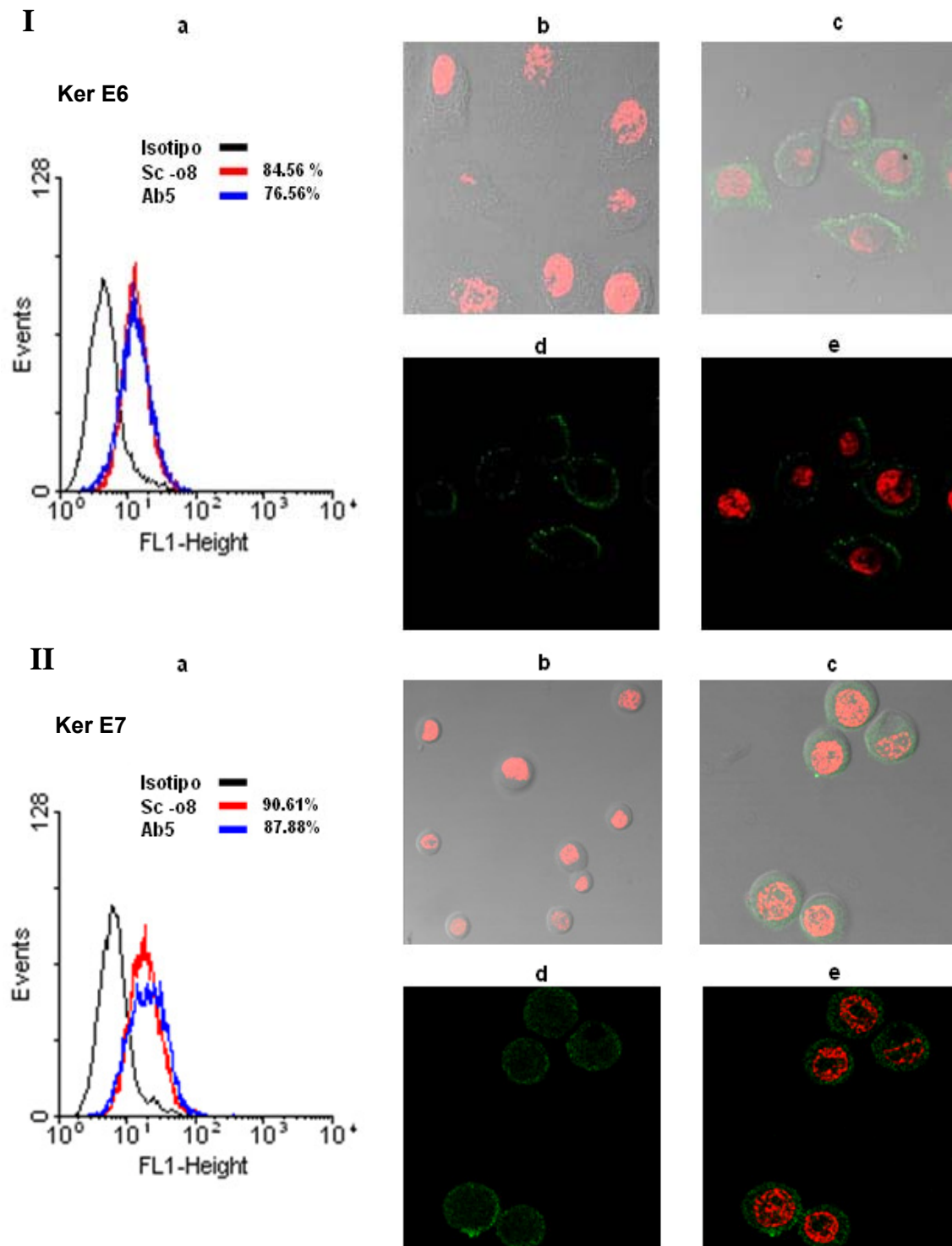


Figura 11. Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en queratinocitos inmortalizados E6 y E7 por citometría de flujo e inmunofluorescencia en microscopía confocal. En el panel I se muestra el análisis de los queratinocitos E6 y en el panel II el de los E7. **(Ia, IIa)** Se presentan los valores obtenidos de la expresión de ErbB2 por citometría de flujo en los queratinocitos E6 y E7. **(Ib, IIb)** Se muestra una proyección de los controles de isotipo (IgG inespecífico) de cada una de estas líneas celulares, en el canal de fluoresceína, yoduro de propidio y Nomarski. **(Ic, IIc)** Se muestra una proyección de los cortes de los queratinocitos E6 y E7 tratados con el anticuerpo sc-08, en el canal de fluoresceína, yoduro de propidio y Nomarski. **(Id, IId)** Se muestra un corte medio observado en el canal de fluoresceína, esta marca corresponde a la expresión de ErbB2. **(Ie, IIe)** Se presenta un corte medio en el canal de fluoresceína y yoduro de propidio. Las muestras analizadas en microscopía confocal se observaron a 63X.

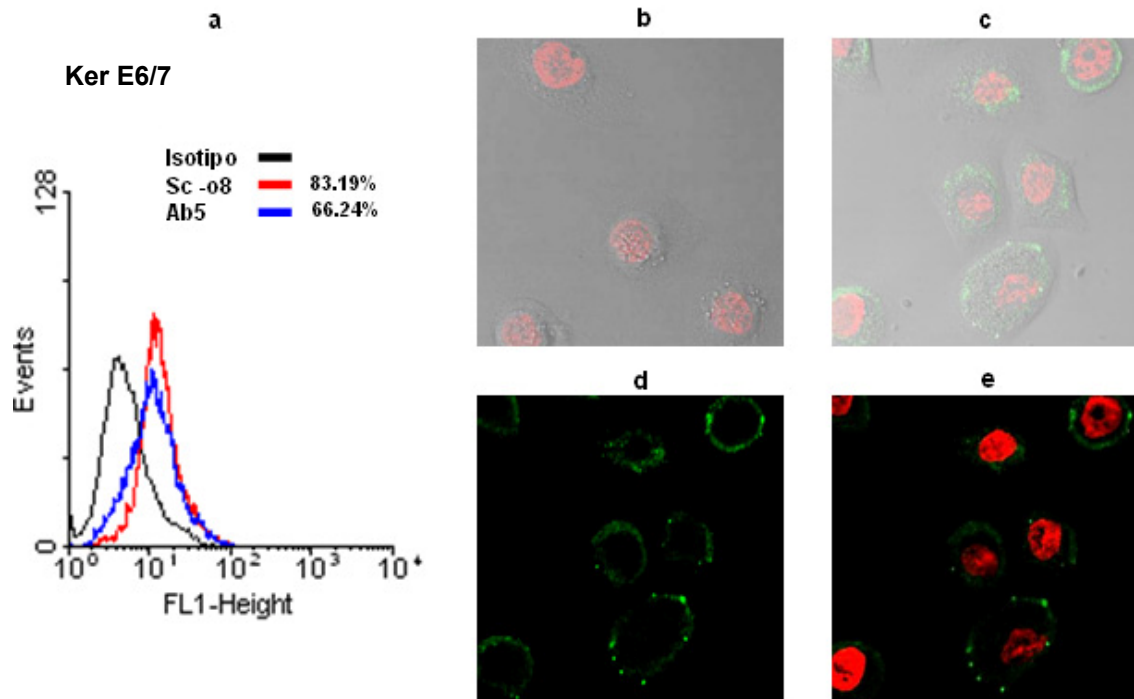


Figura 12. Cuantificación y localización del receptor ErbB2 en queratinocitos inmortalizados E6/7 por citometría de flujo e inmunofluorescencia por microscopía confocal. **(a)** Se muestran los valores obtenidos de la expresión de ErbB2 por citometría de flujo en los queratinocitos E6/7. **(b)** Se presenta una proyección del control de isotipo (IgG inespecífico) en el canal de fluoresceína, yoduro de propidio y Nomarski. **(c)** Se muestra una proyección de los cortes de los queratinocitos tratados con el anticuerpo sc-08, en el canal de fluoresceína, yoduro de propidio y Nomarski. **(d)** Se presenta un corte medio de esta línea celular en el canal de fluoresceína, la marca que se observa corresponde a la expresión de ErbB2. **(e)** Se muestra un corte medio en el canal de fluoresceína y yoduro de propidio. La muestra analizada en microscopía confocal se observaron a 63X

Mientras tanto en la línea celular HeLa (HPV-18) el número células marcadas fue del 83.11% menor con respecto al control positivo, sin embargo inesperadamente en la línea celular C-33 A (HPV negativo) se obtuvo un mayor número de células marcadas versus la línea celular HeLa (Fig.13)

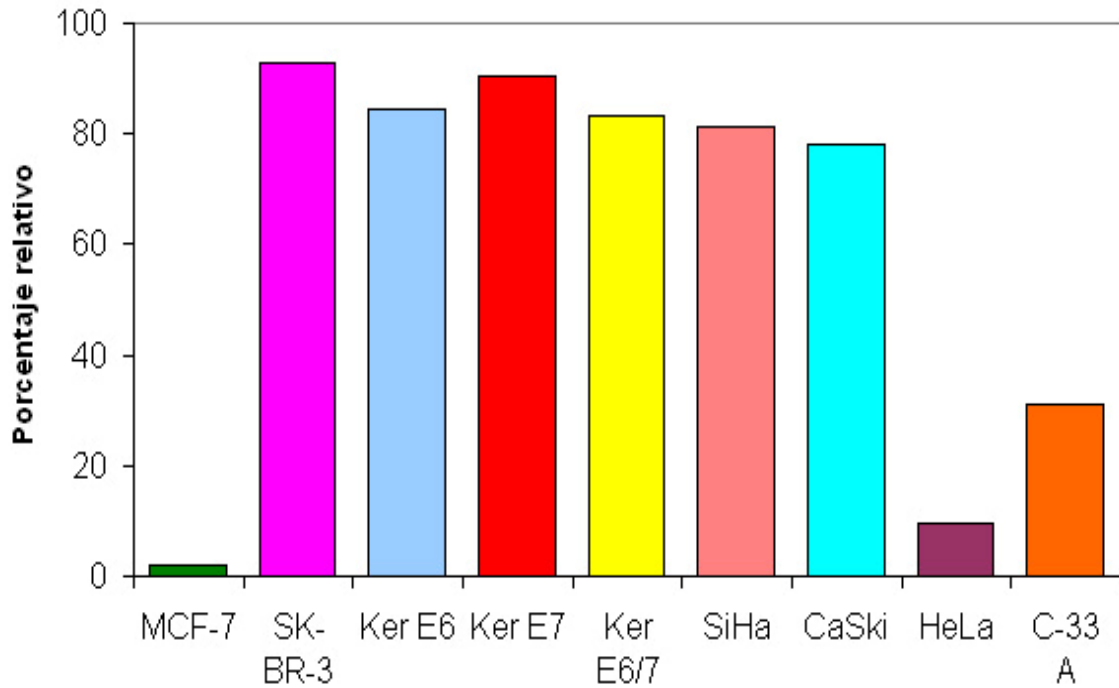


Figura 13. Porcentaje relativo de la expresión de ErbB2 en queratinocitos inmortalizados y en líneas celulares de cáncer cervical por citometría de flujo con el anticuerpo sc-08. En esta figura se observan los valores obtenidos de una corrida de experimentos representativa analizada por citometría de flujo con el anticuerpo sc-08 a una dilución 1:20, se analizaron 10 000 eventos de cada una de las líneas celulares de queratinocitos inmortalizados y de las líneas provenientes de cáncer cervical.

VIII. DISCUSIÓN.

El receptor ErbB2 es una glicoproteína, de tipo tirosina cinasa, el cual esta involucrado en la diferenciación celular, crecimiento, proliferación y desarrollo, de diversos tejidos de origen mesenquimal y neuronal. ErbB2 es la pareja mas frecuente con la que los miembros de la familia ErbB forman heterodimeros, de esta manera son mayores las interacciones receptor-receptor, aumentando la capacidad de interacción de ErbB2 a los ligandos de los miembros de su familia con los que forma heterodimeros, aumentando el potencial de diversificación.

El receptor ErbB2 se ha encontrado participando en procesos carcinogénicos en cáncer de mama, en donde ya se tiene una evidencia mas clara de su participación [86-87], también sea encontrado involucrado en cáncer de colon, próstata, páncreas, pulmón y cáncer cervical [96]. En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, se evidencio la posible sobreexpresión del receptor ErbB2 por diferentes métodos en líneas de cáncer cervical (SiHa, CaSki, HeLa, C-33 A) así como en biopsias de cáncer cervicouterino.

Por lo antes ya mencionado, los objetivos de este trabajo fueron; 1) demostrar la presencia del receptor ErbB2 en líneas celulares de cáncer cervical (SiHa, CaSki; HeLa, C-33 A), estimar el nivel de transcripción del gen que lo codifica, así como medir el nivel de expresión y localización de éste receptor en las células previamente mencionadas, 2) determinar una posible influencia de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV en la expresión del receptor ErbB2, estimando el nivel de transcripción de *erbB2*, así como el nivel de expresión y localización del receptor en queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas.

Para estimar el nivel de transcripción de *erbB2* en las líneas de cáncer cervical así como en los queratinocitos inmortalizados, se realizaron ensayos de RT-PCRs. Al parecer todas las líneas celulares presentan un nivel de transcripción mayor al control tomado como negativo (MCF-7), mientras tanto entre estas líneas celulares parece ser que la línea Ker E7, Ker E6/7 y CaSki

tienen niveles mayores de expresión, mientras que la línea celular negativa a la infección del HPV (C-33 A) inesperadamente parece ser que tiene un nivel de transcripción mayor con respecto al control negativo, sin embargo mediante este método no se puede ver las diferencias del nivel de transcripción entre estas líneas celulares ya que este no es un método cuantitativo, por lo que se tendría que realizar RT-PCR en tiempo real para poder cuantificar el nivel de transcripción.

En estudios previos de cáncer de mama, han establecido una relación entre el número de copias del RNAm de cada uno de los genes que codifican para los receptores de la familia ErbB2 y la supervivencia de los pacientes, teniendo como resultado, que a una mayor actividad transcripcional de los genes que codifican para EGFR, ErbB2 y ErbB3 el pronóstico de supervivencia del paciente es menos alentador, por lo contrario, los pacientes con número mayor de copias de RNAm de ErbB4 tienen un tiempo de supervivencia mayor [101].

Para determinar la presencia del receptor ErbB2 en las líneas celulares de cáncer cervical y queratinocitos inmortalizados, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para cada línea con el anticuerpo Ab-1 anti-ErbB2. En nuestros resultados observamos que en la línea SiHa, CaSki, HeLa y C-33 A se encuentra expresado el receptor, al parecer sin ninguna diferencia en el nivel de expresión, sin embargo pareciera que éste se encuentra distribuido en el citoplasma, lo cual no correlaciona con la actividad funcional de un receptor.

De la misma manera se realizaron inmunocitoquímicas en los queratinocitos E6, E7 y E6/7, nuestros resultados indican que estos se encuentran expresando el receptor ErbB2, donde la marca que corresponde a la expresión de éste, curiosamente pareciera encontrarse distribuida en el citoplasma celular. A pesar de que el anticuerpo utilizado reconoce a la región citoplásmica del receptor, se esperaba ver más intensa la marca a nivel de la cara interna de la membrana.

Una vez determinado la presencia de ErbB2 en todas las líneas celulares éste se cuantificó por citometría de flujo, utilizando el anticuerpo sc-08 y Ab-5 los cuales reconocen la región extracelular del receptor, de estos dos anticuerpos se obtuvieron mejores resultados con el anticuerpo sc-08.

Al analizar las líneas celulares SiHa y Caski (HPV-16) se obtuvieron valores mayores del 70% de células marcadas con respecto al control negativo (MCF-7), lo cual nos habla de una sobreexpresión del receptor en estas líneas celulares, ya que los resultados obtenidos son muy semejantes al de nuestro control positivo (SK-BR-3)

Asombrosamente al analizar la línea HeLa de la cual se esperaba obtener valores por arriba del 50% de células marcadas ya que esta se encuentra infectada con un tipo de HPV de alto riesgo (HPV-18), observamos que solo el 9.62% de las células expresaron ErbB2, tal porcentaje no es significativo de una sobreexpresión. La diferencia observada en el porcentaje de células marcadas entre HeLa (9.62%) y las líneas celulares SiHa (81.42%) y CaSki (78.18%) puede deberse a diferencias en algunas regiones de las oncoproteínas E6 y E7 entre el HPV-16 y HPV-18, las cuales les proporcionarían diferente actividad funcional, para aumentar los niveles de ErbB2. Sin embargo estos resultados se tienen que comprobar utilizando un modelo de queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-18.

Al evaluar la línea C-33 A (HPV negativo) obtuvimos que el 30.99% de células marcadas, valor que fue mayor al esperado y curiosamente es también mayor al obtenido en la línea HeLa, esto nos podría hablar de dos cosas, de que en este tipo de células de cáncer cervical la expresión de ErbB2 fuera mayor de manera normal, para determinar esto necesitaríamos contar con un cultivo primario de queratinocitos, el cual no se pudo obtener en el laboratorio, otro punto sería, que no es necesaria la presencia del HPV para alterar la expresión del receptor, sin embargo la presencia del virus como la de HPV-16 es importante para contribuir en el aumento de dos o tres veces más en la expresión de ErbB2.

Por ultimo para evaluar una posible influencia de las oncoproteínas E6 y E7 en la sobreexpresión de ErbB2, se cuantifico la expresión de éste receptor en los queratinocitos inmortalizados por citometria de flujo. En los Ker E6 las células que se marcaron con el anticuerpo sc-08 anti-ErbB2 corresponde al 84.56%, mientras que en los Ker E7 se obtuvo un 90.61% de células marcadas,

un 6% mayor que los Ker E6. En los queratinocitos E6/7 por citometria de flujo se observó el 83.19% de células marcadas con el anticuerpo sc-08. Estos resultados nos indican que no hay una participación específica por alguna de las oncoproteínas (E6, E7) ya que ambas aumentan los niveles de expresión del receptor ErbB2 a niveles muy semejantes, indicando una sobreexpresión en los Ker E6, Ker E7 y Ker E6/7, sin embargo, si existe una diferencia importante en la expresión del receptor entre la presencia del HPV-16 y la del HPV-18.

Nuestros resultados correlacionan con trabajos previos en donde se ha demostrado que un número mayor al basal de este receptor en cáncer cervical contribuye al desarrollo de un carcinoma más agresivo [97].

Con el fin de visualizar la localización del receptor ErbB2 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia analizadas en microscopia confocal en las líneas celulares de cáncer cervical y en los queratinocitos inmortalizados.

Los resultados obtenidos de las líneas celulares SiHa y CaSki (HPV-16), evidenciaron la presencia del receptor ErbB2 a nivel de membrana celular, de la misma manera la presencia de éste receptor en la línea celular HeLa (HPV-18) y C-33 A (HPV negativo) se encuentra expresado a nivel de membrana. La intensidad de la marca que se observa en estas líneas celulares, que corresponde a la expresión de ErbB2 concuerda con los resultados obtenidos en la citometria de flujo.

De la misma manera se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para los queratinocitos inmortalizados E6, E7 y E6/7 para determinar la localización de ErbB2, los resultados de estos ensayos nos mostraron que en las tres líneas celulares en receptor ErbB2 se encuentra expresado a nivel de membrana celular.

De esta manera este trabajo aportó evidencias de la presencia del receptor ErbB2 en líneas celulares de cáncer cervical, así como la sobreexpresión de éste receptor, influenciada por las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16 y su localización a nivel de membrana celular. Por lo que es importante conocer la actividad funcional de ErbB2, así como el mecanismo por el cual E7 y E6

estarían contribuyendo a la sobreexpresión del receptor ErbB2, ya que esto sería útil para establecer estrategias terapéuticas en el control del cáncer cervical

IX. CONCLUSIONES.

1.- *erbB2* se encuentra transcribiéndose en las todas líneas celulares de cáncer cervical, así como en las líneas de queratinocitos transformados con las oncoproteínas E6 y E7.

2.- El receptor ErbB2 se encuentra expresado en todas las líneas celulares de cáncer cervical y en los queratinocitos E6, E7 y E6/7.

3.- Las líneas celulares de cáncer cervical, SiHa y CaSki (HPV-16) mostraron una sobreexpresión de ErbB2, sin embargo en la línea HeLa el nivel de expresión de éste receptor es bajo. La línea C-33 A mostró una menor expresión de ErbB2 en comparación con las líneas que contienen el genoma del HPV-16, sin embargo, esta fue mayor que la que se obtuvo en Hela la cual es HPV-18.

4.- ErbB2 se encuentra sobreexpresado en los queratinocitos E6, E7 y E6/7, a pesar de que la expresión del receptor ErbB2 obtenido en los queratinocitos E6 fue ligeramente menor con respecto a la expresión obtenida en los queratinocitos E7 esta cantidad de expresión en los queratinocitos E6 es significativa.

5.- La localización de ErbB2 en las líneas celulares de cáncer cervical, así como en los queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas se encuentra localizado a nivel de membrana celular.

6.- La sobreexpresión del receptor ErbB2 esta influenciada por la participación específica de las dos oncoproteínas (E6 y E7), sin embargo éste aumento en la expresión del receptor esta relacionado con la presencia del tipo de HPV.

X. PERSPECTIVAS.

En este trabajo determinamos que todas las líneas celulares de cáncer cervical usadas y las líneas de queratinocitos inmortalizados se encuentran transcribiendo a *erbB2*. Además determinamos que las líneas celulares HPV-16 positivo sobreexpresan al receptor ErbB2, así como también determinamos la participación de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16 en la sobreexpresión de éste receptor.

Sin embargo es importante determinar el nivel de transcripción de *erbB2* por métodos cuantitativos como es la RT-PCR en tiempo real, para determinar si existe una sobrerregulación del gen a este nivel por las oncoproteínas, utilizando como control queratinocitos de cultivo primario no inmortalizados.

En el caso que los niveles de RNAm sean similares a los basales, esto nos hablaría de una sobrerregulación postranscripcional, lo cual se comprobaría midiendo el tiempo de vida media de ErbB2, utilizando un inhibidor de la síntesis proteica como la cicloheximida y monitoreando la degradación por Western blot a diferentes tiempos.

Es interesante saber el número de copias del *erbB2* por célula ya que se ha observado que en cáncer de mama éste receptor se encuentra amplificado en un 30% de los tumores, y este podría ser otro de los mecanismos que estén contribuyendo a la sobreexpresión de éste, esto se podría realizar por ensayos de Southern blot en las líneas celulares de cáncer cervical.

También es necesario determinar la actividad funcional del receptor en las líneas SiHa, CaSki y en los queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas E6 y E7 en donde se encontró sobreexpresado, esto se podría realizar por medio de ensayos de Western blot, determinando si este receptor se encuentra fosforilado en su dominio tirosina-cinasa.

Algo muy interesante de estudiar es el efecto contrario observado de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-18 sobre la expresión de ErbB2, para

determinar que estas oncoproteínas disminuyen la expresión del receptor se tendría que evaluar el efecto de E6 y E7 en un modelo de queratinocitos inmortalizados con las oncoproteínas del HPV-18 y medir los niveles de expresión de ErbB2 por análisis de citometría de flujo.

X. BIBLIOGRAFIA.

1. **Maxwell-Parkin D., Bray F., Ferlay J. and Pisani P.** 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer.* **94**: 153-156.
2. **Pisani P., Bray F. and Maxwell-Parkin D.** 2002. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer.* **97**: 72-81.
3. **V. Shah K. and M. Howley P.** 1996. Papillomaviruses. Fields virology. Third Edition. Lippin Cott-Raven Publishers. 2077-2106.
4. **Tirado-Gómez L., Mohar-Betancourt A., López-Cervantes M., García-Carrancá A., Franco-Marina F., Borges G.** 2005. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Publica.* **47**: 342-350.
5. **Walboomers J.M.M. et al.** 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**. 12-19.
6. **Bosch Fx. and Muñoz N.** 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus. Res.* **89**: 183-190.
7. **Muñoz N.** 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.* **19**: 1-5.
8. **Burd EM.** 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 1-17.
9. **Kjellberg L., Dillner J. et al.** 2000. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br. J. Cancer.* **82**: 1332-1338.
10. **De Villiers EM.** 2003. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int. J. Cancer.* **103**: 705-708.
11. **Cuzick J., De Stavola B.L., Russell M.J. and Thomas B.S.** 1990. Vitamin A, vitamin E and the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer.* **62**: 651-652.
12. **Ho Y.F. G., L. Romney S. et al.** 1998. HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia. *Int. J. Cancer.* **78**: 281-285.

13. **Zur Hausen H.** 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1288**: F55-78
14. **Modis Y., Trus B.L. and Harrison S.C.** 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* **21**: 4754-4762.
15. **B. Buck C., D. Thompson C., S. Pang Y.Y., R. Lowy D. and T. Schiller J.** 2005. Maturation of papillomavirus capsids. *J. Virol.* **79**: 2839-2846
16. **S. Longworth M. and A. Laimins L.** 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 362-372.
17. **Doorbar J.** 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Science.* **110**: 525-541.
18. **Butz K. and Hoppe-Seyler F.** 1993. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* **67**: 6476-6486.
19. **Hummel M., B. Hunson J. and A. Laimins L.** 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* **66**: 6070-6080.
20. **J. McMillan N. A., Payne E., H. Frazer I. and Evander M.** 1999. Expression of the $\alpha 6$ integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology.* **261**: 271-279.
21. **Evander M., H Frazer I., Payne E., Mei Qui Y., Hengst K. and J McMillan N. A.** 1997. Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**: 2449-2456.
22. **Bossis I. and I. Meneses P. et al.** 2005. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J. Virol.* **79**: 6723-6731.
23. **G. Joyce j., M. Kerller P. et al.** 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 5810-5822.
24. **M. Day P., R. Lowy D. and T. Schiller J.** 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* **307**: 1-11.

25. **Bousarghin L., Touzé A., Sizaret P. Y. and Coursaget P.** 2003. Human papillomavirus type 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol.* **77**: 3846-3850.
26. **M. Day P., C. Baker C., R. Lowy D. and T. Schiller J.** 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 14252-14257.
27. **L Conger K., Liu J. S., Kou S. R., T. Chow L. and S.-F. Wang T.** 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase α /primase. *J. Biol. Chem.* **274**: 2696-2705.
28. **G. Frattini M. and A. Laimins L.** 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12398-12402
29. **Kim K., A. Garner-Hamrick P., Fisher C., Lee D. and F. Lambert P.** 2003. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J. Virol.* **77**: 12450-12459.
30. **Bechtold V., Beard P. and Raj K.** 2003. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J. Virol.* **77**: 2021-2028.
31. **Scheffner M., A. Werness B., M. Huibregtse J., J Levine A. and M. Howley P.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* **63**: 1129-1136.
32. **A. Werness B., J. Levine A. and M. Howley P.** 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* **248**: 76-79.
33. **Dyson N., M. Howley P., Munger K. and M. Harlow P.** 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* **243**: 934-937.
34. **Munger K., A. Werness B., Dyson N., C. Phelps W., Harlow E. and M. Howey P.** 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* **8**: 4099-4105.

35. **Florin L., Sapp C., E. Streeck R. and Sapp M.** 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. Virol.* **76**: 10009-10014.
36. **Doorbar J. and H. Gallimore P.** 1987. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J. Virol.* **61**: 2793-2799.
37. **Florin L., Schäfer F., Sotlar K., E. Streeck R. and Sapp M.** 2002. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein L2. *Virology.* **295**: 97-107.
38. **M. Day P., B. S. Roden R., R. Lowy D. and T. Schiller J.** 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* **72**: 142-150.
39. **Zhao K. N., H. Frazer I. et al.** 2000. BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology.* **272**: 382-393.
40. **B. Buck C., V Pastrana D., R. Lowy D. and T. Schiller J.** 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J. Virol.* **78**: 751-757.
41. **Klaes R., Doeberitz K. et al.** 1999. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* **59**: 6132-6236.
42. **Phelps W., Yee C., Münger K. and Howley P.** 1988. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell.* **53**: 539-546.
43. **Chakrabarti O. and Krishna S.** 2003. Molecular interactions of “high risk” human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J. Biosci.* **28**: 337-348.
44. **J. Weintraub S., C. Dean D. et al.** 1995. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature.* **375**: 812-815.

45. **Edmons C. and H. Vousden K.** 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virol.* **63**: 2650-2656.
46. **Berezutskaya E., Yu B., Morozov A., Raychaudhuri P. and Bagchi S.** 1997. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Diff.* **8**: 1277-1286.
47. **J. Jewers R., Hildebrandt P., W. Ludlow J. Kell B. and J. McCance D.** 1992. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J. Virol.* **66**: 1329-1335.
48. **Wang J., Sampath A., Raychaudhuri P. and Bagchi S.** 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene.* **20**; 4740-4749.
49. **Zur Hausen H.** 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer.* **2**: 342-350.
50. **Kiyona T., J. Klingelutz A. et al.** 1998. Both Rb/p16^{INK4a} inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* **396**: 84-88.
51. **M. Huibregts J., Scheffner M. and M. Howley P.** 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* **10**: 4129-4135.
52. **Hubbert N., Sedman S. and Schiller J.** 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.* **66**: 6237-6241.
53. **Huibregtse J., Scheffner M. and Howley P.** 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 775-784.
54. **Maki C., Huibregtse J. and Howley P.** 1996. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53¹. *Cancer Res.* **56**: 2649-2654.
55. **Hynes N. and Lane H.** 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature. Rev. Cancer.* **5**: 341-354.

56. **Ekstrand A., Sugawa N., James C. and Collins V.** 1992. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and / or C-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 4309-4313
57. **Salmón D., Clark G., Wong S., Levin W., Ullrich A. and McGuire W.** 1997. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 / neu oncogene. *Science.* **235**: 177-181.
58. **Paez J., Meyerson M. et al.** 2004. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* **304**: 1497-1500.
59. **Lynch T., Haber D. et al.** 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **350**: 2129-2139.
60. **Stephens P., Stratton M. et al.** 2004. Intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature.* **431**: 525-526.
61. **Lee J., Lee S. et al.** 2006. ERBB2 kinase domain mutation in the lung squamous cell carcinoma. *Cancer. Lett.* **237**: 89-94.
62. **Yarden Y. and Sliwkowski M.** 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nature. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**: 127-137.
63. **Olayioye M., Neve R., Lane H. and Hynes N.** 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19**: 3159-3167.
64. **Schlessinger J.** 2004. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science.* **306**: 1506-1507.
65. **Riese J., Kim E., Elenius K., Buckley S., Klagsbrun M., Plowman G. and Stern D.** 1996. The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor- α , heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J. Biol. Chem.* **271**: 20047-20052.
66. **Riese D., Raaij T., Plowman G., Andrews G. and Stern D.** 1995. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5770-5776.

67. **Carraway K., Lai C. et al.** 1997. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3 / ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature*. **387**: 512-516.
68. **Chang H., Riese D., Gilbert W., Stern D. and McMahon U.** 1997. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*. **387**: 509- 511.
69. **Zhang D., Godowski P. et al.** 1997. Neuregulin-3 (NRG3): A novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 9562-9567.
70. **Ramsauer V., Carraway C., Salas P. and Carraway K.** 2003. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized. *J. Biol. Chem.* **278**: 30142-30147.
71. **Jepson S., Carraway K. et al.** 2002. Muc4/Sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27^{kip}, but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinase B / Akt pathways. *Oncogene*. **21**: 7524-7532.
72. **Funes M., Miller J., Lai C., Carraway K. and Sweeney C.** 2006. The mucin Muc4 potentiates neuregulin signaling by increasing the cell-surface populations of ErbB2 and ErbB3. *J. Biol. Chem.* **281**: 19310-19319.
73. **Ramsauer V., Carraway K. et al.** 2006. Muc4-ErbB2 complex formation and signaling in polarized CACO-2 epithelial cells indicate that Muc4 acts as an unorthodox ligand for ErbB2. *Mol. Biol. Cell.* **17**: 2931-2941.
74. **Graus-Porta D., Beerli R., Daly J. and Hynes N.** 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16**: 1647-1655.
75. **Graus-Porta D., Beerli R., Daly J. and Hynes N.** 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16**: 1647-1655.
76. **Burgues A., Yokohama S. et al.** 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell.* **12**: 541-552.

77. **Ogiso H., Yokoyama S. et al.** 2002. Cristal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*. **110**: 775-787.
78. **Garrett T., Ward C. et al.** 2002. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α . *Cell*. **110**: 763-773.
79. **Garrett T., Ward C. et al.** 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell*. **11**: 495-505.
80. **Prenzel N., Ullrich a. et al.** 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*. **402**: 884-888.
81. **Daub H., Weiss F., Wallasch C. and Ullrich A.** 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signaling by G-protein-coupled receptors. *Nature*. **379**: 557-560.
82. **Pages M., Rojo F., Albanell J., Baselga J. and Arribas J.** 2003. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J*. **22**: 1114-1124.
83. **Izumi Y., Mekada E. et al.** 1998. A metalloprotease-disintegrin, MDC9 / meltrin- γ / ADAM9 and PKC are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*. **17**: 7260-7272.
84. **Gschwind A., Hart S., Fischer O. and Ullrich A.** 2003. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J*. **22**: 2411-2421.
85. **Brennan P., Kumogai T., Berezov A., Murali R. and Greene M.** 2000. HER2 / Neu: mechanisms of dimerization / oligomerization. *Oncogene*. **19**: 6093-6101.
86. **Slamon D., Press M. et al.** 1989. Studies of the HER-2 / neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. **244**: 707-712.
87. **Slamon D.** 1988. Amplification of c-erbB2 and aggressive human breast tumors?. *Science*. **240**: 1795-1798

88. **Berchuck A., Bast R. et al.** 1990. Overexpression of HER-2 / neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* **50**: 4087-4091.
89. **Yu D., Wang S., Dulski K., Tsai C., Nicolson G. and Hung M.** 1994. c-erbB-2 / neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer. Res.* **54**. 3260-3266.
90. **Tan M., Yao J. and Yu D.** 1997. Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic matastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res.* **57**: 1199-1205.
91. **Yu D., Jing T., Liu B., Yao J., Tan M., McDonnell T. and Hung M.** 1998. Overexpression of ErbB2 blocks taxol-induced apoptosis by upregulation of p21^{Cip1}, which inhibits p34^{Cdc2} kinase. *Mol. Cell.* **2**: 581-591.
92. **Petit A., kerbel R. et al.** 1997. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and vivo. *Amer. J. Pathol.* **151**: 1523-1530.
93. **Bempt I., Vanhentenrijk V., Drijkonigen M., Wlodarska I., Vandenberghe P. and Wolf-Peeters C.** 2005. Real-time reverse transcription-PCR and fluorescence in-situ hybridization are complementary to understand the mechanisms involved in HER-2 / neu overexpression in human breast carcinomas. *Histopathology.* **46**: 431-441.
94. **Hollywood D. and Hurst H.** 1993. A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene c-erbB-2 in mammary tumour lines. *EMBO J.* **12**: 2369-2375
95. **Fiore P., Pierce J., Graus M., Cegato O., King C. and Aaronson S.** 1987. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science.* **237**: 178-181.
96. **Hale R., Buckley C., Fox H. and Williams.** 1992. Prognostic value of c-erbB2 expression in uterine cervical carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **45**: 594-596.

97. **Gardmark T., Wester K., Torre M., Carlsson J. and Malmstrom P.** 2005. Analysis of HER2 expression in primary urinary bladder carcinoma and corresponding metastases. *BJU International*. **95**: 982-986.
98. **Mitra A., Murty V., Pratap M., Sodhani P. and Chaganti R.** 1994. ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res*. **54**: 637-639.
99. **Sato S., Ito K., Ozawa N., Yajima a. and Sasano H.** 1991. Expression of c-myc, epidermal growth factor receptor and c-erbB2 in human endometrial carcinoma and cervical adenocarcinoma. *J. Exp. Med*. **165**:137-145.
100. **Ngan H., Cheung A., Liu S., Cheng D., Ng T. and Wong L.** 2001. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 in squamous cell carcinoma of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. *Tumor Biol*. **22**: 176-183.
101. **Bieche I., Onody P., Tozlu S., Driouch K., Vidaud M. and Lidereau R.** 2003. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int. J. Cancer*. **106**: 758-765.

ANEXO I

EXTRACCIÓN DE RNA POR EL METODO DE TRIZOL.

- 1.- Se parte de cultivos en cajas p100 con una confluencia del 80%.
- 2.- Se retira el medio de cultivo por decantación.
- 3.- Adicionar 1ml de Trizol frió por caja, homogenizar y desprender las células.
- 4.- Pasar a tubos de Eppendorf, aproximadamente 1ml.
- 5.- Incubar 5 min. a temperatura ambiente.
- 6.- Adicionar 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol.
- 7.- Se le da vortex por 15 seg. Y se incuba 3 mit. a temperatura ambiente.
- 8.- Se centrifuga a 1300 rpm por 20 min. a 4°C.
- 9.- Se forman tres fases: una transparente que corresponde al RNA, una intermedia que corresponde al DNA y una roja que corresponde a proteínas, recuperar la fase acuosa transparente.
- 10.- Precipitar la fase acuosa con 250 µl de alcohol isopropilico, agitar por inversión de 5 -10 veces.
- 11.- Incubar 10 min. a temperatura ambiente.
- 12.- Se centrifuga a 1300 rpm por 15 min. a 4°C.
- 13.- Retirar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1ml de etanol al 75%.
- 14.- Se le da vortex por 15 seg.
- 15.- Centrifugar a 8000 rpm por 5 min. a 4°C.
- 16.- Se retira el sobrenadante y dejar secar la pastilla por 30 min.
- 17.- Disolver la pastilla semiseca en 100µl de agua DEPC.
- 18.-Cuantificar el RNA y almacenar a -70 °C.

ANEXO II

TRANSCRIPCIÓN REVERSA-PCR (RT-PCR).

PRECIPITACIÓN DE RNA.

- 1.- Se parte de 2.5 µg de RNA, a los cuales se les agrega 1/10 partes de acetato de sodio al 3M con de pH 5.5, a la suma del volumen de la muestra mas el volumen del acetato de sodio, se le agrega 3 volúmenes mas de etanol absoluto.
- 2.- Se le da vortex por 1 min.
- 3.- Se incuba en hielo por 30 min.
- 4.- Centrifugar a 13000 rpm por 20 min. a 4 °C.
- 5.- Retirar el sobre-nadante.
- 6.- Resuspender la pastilla en 200µl de etanol al 75% / 25% de acetato de sodio a 0.1M a pH 5.2.
- 7.- Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a 4 °C.
- 8.- Desechar el sobre-nadante y dejar secar.
- 9.- Resuspender la pastilla en 7.5µl de agua DEPC.
- 10.- Adicionar 2 µl de Buffer 5X RT pH 7.6, 0.5µl de DNAsa I libre de RNAsa. Para un volumen de 10 µl.
- 11.- Incubar a 65 °C por 15 min.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

- 1.- Al volumen final de la precipitación (10µl) se agrega 0.5µl de Oligo dT (173.9 ng/µl)
- 2.- Incubar a 65 °C por 10 min.
- 3.- Pasar a hielo por 1 min.
- 4.- Agregar 4µl de Buffer 5X RT, 0.5µl dNTPs (20 mM), 2µl DTT 0.1 M, 1µl RNAsin, 1µl de agua DEPC.
- 5.- Mezclar e incubar a 50 °C por 2 min.
- 6.- Agregar 1µl de Super Script II RT (200 U)
- 7.- Mezclar e incubar a 50 °C por 60 min.
- 8.- Incubar a 70 °C por 15 min.
- 9.- Agregar 1µl de RNAsa H (2U).
- 10.- Incubar a 37 °C por 20 min.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

PCR β -2-MG

1 μ l β -2-MG (S)
1 μ l β -2-MG (AS)
0.25 μ l dNTPs
1 μ l de MgCl 50 mM
18 μ l de agua DEPC
0.25 μ l de Taq DNA pol
1 μ l de cDNA

Ciclos

94 °C – 5 mit.
94 °C-30 seg. }
60 °C-30 seg. } 40 ciclos
72 °C-1 mit. }
72 °C-2 mit.
16 °C- α

PCR ErbB2

1 μ l ErbB-2 (S)
1 μ l ErbB-2 (AS)
0.25 μ l dNTPs
2.5 μ l Buffer 10X PCR
1.5 μ l de MgCl 50mM
16.15 μ l de agua DEPC
0.1 μ l de Taq DNA pol
2.5 μ l de cDNA

94 °C – 5 mit.
94 °C-30 seg. }
55 °C-30 seg. } 40 ciclos
72 °C-1 mit. }
72 °C-2 mit.
16 °C- α

PCR E6 y E7

1 μ l Oligo (S)
1 μ l Oligo (AS)
0.25 μ l dNTPs
2.5 μ l Buffer 10X PCR
1 μ l de MgCl 50 mM
17 μ l de agua DEPC
0.25 μ l de Taq DNA pol
2 μ l de cDNA

94 °C – 5 mit.
94 °C-30 seg. }
55 °C-30 seg. } 40 ciclos
72 °C-1 mit. }
72 °C-2 mit.
16 °C- α

ANEXO III

INMUNOCITOQUIMICA.

- 1.- Se cultivan las células en cubreobjetos a una confluencia del 60%
- 2.-Se fijan con paraformaldehido (en PBS 1X) al 4% como mínimo 30 min.
- 3.- lavar 3 veces con PBS 1X por 10 min.
- 4.- Bloquear las peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 3% por 30 min en PBS 1X.
- 5.- Lavar 3 veces con PBS 1X por 10 min.
- 6.-Se bloquea para uniones inespecíficas con la solución A del Kit Histostain-Plus Zymed.
- 7.- Se drena la solución, no lavar.
- 8.- Se incuba con el anticuerpo primario Ab-1 a una dilución 1:100, en cámara húmeda, por toda la noche a 4C.
- 9.- Lavar 3 veces con PBS-1X por 10 min.
- 10.- Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado por 20 min. a temperatura ambiente del Kit Histostain-Plus Zymed.
- 11.- Lavar 3 veces con PBS 1X por 2 min.
- 12.- Se incuba con el conjugado enzimático (Streptoavidina-peroxidasa), incubar 10 min. a temperatura ambiente.
- 13.-Lavar 3 veces con PBS 1X por 2 min.
- 14.- Revelar con el cromógeno DAB por 10 min.
- 15.- Contrateñir con hematoxilina de 5-10 min.
- 16.- Montar las muestras con gelvatol.

ANEXO IV.

CITOMETRIA DE FLUJO.

- 1.--Se crecen las líneas celulares a una confluencia del 80-90%.
- 2.-Quitar el medio de las células y lavar 3 veces con PBS 1X / SFB 1%.
- 3.- Adicionar de 3 ml de EDTA de 5-9 mM y dejar reposar de 10-20 min.
 1. Bajar las células con un gendarme y pasarlas a un tubo falcón.
 2. Se centrifugan a 1500 rpm por 5 min. para eliminar el EDTA.
 3. Se resuspende la pastilla en PBS para lavarlas y se centrifuga.
 4. A la pastilla se resuspende en paraformaldehído al 4% ajustando el volumen celular
 5. Contar las células con Azul de Tripano a una dilución 1:2.
 6. Se coloca de $2-5 \times 10^5$ células en cada tubo.
 7. Se centrifuga a 1500 rpm por 5 min. se decanta quedando la pastilla de células.
 8. Eliminar el sobre-nadante.
12. Lavar la pastilla con PBS 1X+SFB al 1% de 2-3 veces, se centrifuga a 1500 rpm por 5min.
13. Eliminar el sobre-nadante.
14. Agregar 20µl del anticuerpo primario sc-08 a una dilución 1:20, mezclar por agitación.
12. Incubar por 30 min.
13. Agregar 1ml de PBS 1X+SFB 1% agitar y lavar 3 veces.
14. Eliminar el sobre-nadante y agregar 20µl del anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína a una dilución 1:100 del anticuerpo secundario.
15. Incubar por 30 min. en la oscuridad.
16. Lavar 3 veces con 1 ml de PBS 1X+SFB 1%.
17. Se resuspende la pastilla en un volumen final de 350 µl de PBS 1X+SFB 1%.

ANEXO V

INMUNOFLUORECENCIA.

- 1.- Las células se cultivaron en cubreobjetos a una confluencia del 60%.
- 2.- Se retira el medio y se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS 1X a pH 7.2, por lo menos 30 min.
- 3.- Lavar 5 veces por 2 min. con BPS filtrado por 0.22µm.
- 4.-Bloquear con BSA al 3% en PBS 1X durante 30 min.
- 5.-Lavar de 1-2 veces con PBS 1X por 2 min.
- 6.-incubar 60 min. con RNAsa A libre de DNAsa a una concentración de 10µg/ml
- 7.-Lavar 2 veces con PBS 1X por 2 min.
- 8.-Incubar con el 1er anticuerpo sc-08 a una dilución de 1:20 en albúmina 3%-PBS 1X, durante toda la noche en cámara húmeda.
- 9.- Lavar 5 veces por 2 min. con PBS 1X.
- 10.-Incubar con el segundo anticuerpo fluoresceínado a una dilución 1:100 por 1 hrs a temperatura ambiente.
- 11.-Lavar exhaustivamente al menos 8 veces por 2 min. con PBS 1X.
- 12.-Finalmente se lava con agua bidestilada de 2-3 veces.
- 13.-Se contratiñe con yoduro de propidio a una concentración 20µg/ml de 1-3 min.
- 14.-Lavar con agua bidestilada exhaustivamente.
- 15.- Las muestras se montan en una solución de Gelvatol.