



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

**"PATRON DE EXPRESION DE LA FAMILIA DE
GENES HOXB EN CERVIX NORMAL Y
LESIONES MALIGNAS DEL CUELLO
UTERINO HUMANO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
P R E S E N T A:
RICARDO LOPEZ ROMERO

DIRECTOR. DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS
ASESORES. DR. HECTOR MAYANI VIVEROS
DRA. ROCIO ORTIZ MUÑIZ



**BIOLOGIA
EXPERIMENTAL**

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 1999.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO), Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, bajo la dirección y tutoría del Dr. Mauricio Salcedo Vargas, Investigador Asociado “B” del Instituto Mexicano del Seguro Social.

10073422: 10073422

La Maestría en Biología Experimental está incluida en el Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del convenio 309-0.1407PN, por lo cual, ofrezco mi más sincero agradecimiento y reconocimiento a esta institución por el apoyo económico que me otorgó durante mis estudios de maestría a través de la beca número 115042.

El autor de la presente tesis agradece ampliamente a la Fundación TELMEX por su confianza y apoyo económico recibido mediante la beca número 315-000-1468.

Así mismo, agradece a la Coordinación de Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo a través del proyecto FP-0038/440.

Agradecimientos

-Al Dr. Mauricio Salcedo Vargas por dirigir la presente tesis y haberme apoyado durante la realización de la misma. Gracias por sus consejos.

-A la Dra. Rocío Ortíz Muñiz por su disposición incondicional que me mostró en todo momento; por toda su ayuda gracias.

-Al Dr. Hector Mayani Viveros por su apoyo brindado y sus sugerencias tan acertadas, gracias.

-A la Universidad Autónoma Metropolitana por ser una institución que fomenta en sus estudiantes el desarrollo científico y humano.

-Al Programa de Maestría en Biología Experimental por darnos la oportunidad de crecer como personas y profesionistas.

-A la Coordinadora de la Maestría en Biología Experimental, Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz por su excelente trabajo dentro del programa y por el apoyo incondicional que ha mostrado con todos sus estudiantes, muchas gracias.

-A la plantilla de profesores de la Maestría en Biología Experimental por compartir sus conocimientos con todos sus estudiantes.

-A las Dras. Minerva Lazos y Mercedes Hernández, del Departamento de Patología del Hospital General de México por su apoyo para la obtención y diagnóstico histopatológico del material biológico.

-Al Mto. Hector Serrano, de la UAM-I quien en todo momento estuvo dispuesto a ayudarme, por su tiempo, sugerencias y todos sus consejos tan valiosos, muchas gracias.

-Al Dr. Corey Largman del Martinez VA Medical Center, Martinez, CA. USA, por la donación de las sondas HOXB utilizadas en el presente trabajo.

-A todos mis amigos del laboratorio: Iván, Bety, Alf, Carmen, Dairo, Ramón, Carlos Franco, Carlos Pérez, Sonia, Viky y Ruth por su convivencia y amistad dentro y fuera del laboratorio.

-A mi amigo Iván Martínez, una vez más, quien con su ayuda logramos darle la vuelta a la RT-PCR.

-A mis compañeros de la UIMEO: Kena, Ale, al compañero Fer, Margarita, Juan José, Alfonso y Paty, por su amistad.

-A los chicos del Departamento de Histotecnología de la UIMEO, Paty Piña, Carmen Baltazar y Víctor Pérez por su apoyo técnico.

-A mis amigos de la maestría: Genaro, Tere, Linda y Emilio con quienes las clases fueron un verdadero agrado.

-A la Dra. Concepción Gutiérrez y a la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por el apoyo económico otorgado para la impresión de la presente tesis.

-A la Dra. Rocío Ortiz y al Mto. Ernesto Rodríguez de la UAM-I por su ayuda para la impresión a color de las figuras de esta tesis.

-A mi amiga Leticia Cortés (UAM-I y CINVESTAV) por su asesoría técnica y su ayuda desinteresada, pero sobre todo por su amistad, gracias Lety.

-Al Dr. Arturo Salame Méndez, de la UAM-I por todos sus consejos, por su invitación para superarme cada día y por su amistad, a usted y a su esposa muchas gracias.

-A todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera participaron en la realización de este trabajo, sinceramente, muchas gracias.

Con especial reconocimiento para mi Comité Tutorial:

Dr. Mauricio Salcedo Vargas.

Dr. Hector Mayani Viveros.

Dra. Rocío Ortiz Muñiz.

Por dirigir cada una de las etapas de esta tesis, por sus sugerencias y comentarios que enriquecieron su contenido, por la revisión final de la misma, por su interés y desempeño que me han brindado en el comienzo de mi vida como investigador. A todos ustedes muchas gracias.

Dedicatoria

Con todo mi amor para mi esposa Claudia. Por que desde que te conocí has sabido demostrarme en todo momento tu cariño y ternura, por impulsarme cada día a ser mejor y por que con tu apoyo hoy he conseguido este logro.

Con mi más profundo amor y agradecimiento para mis padres, Carlos y Carmen, por creer en mí siempre y darme la oportunidad de demostrarles cuanto los amo.

A mis hermanos, Carlos, Enrique Gabriel y Miguel Angel con quienes he tenido tantos momentos de alegría, por todas esas risas que tanto añoro y por haber compartido conmigo lo mejor de la vida.

A mis hermanas Carmen y Sharon por demostrarme en todo momento su cariño y haberme enseñado el lado tierno de la vida.

A mis dos pequeños bribones, Federico Judá y Miguel Angel quienes a pesar de sus travesuras llenan nuestras vidas de constantes alegrías.

Indice

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 1 |
| Introducción..... | 2 |
| Cáncer..... | 2 |
| Genes homeóticos y genes HOX..... | 3 |
| Antecedentes..... | 8 |
| Antecedentes directos..... | 12 |
| Justificación..... | 14 |
| Planteamiento del problema..... | 16 |
| Hipótesis..... | 17 |
| Objetivos..... | 17 |
| Objetivo general..... | 17 |
| Objetivos particulares..... | 17 |
| Naturaleza del estudio..... | 18 |
| Materiales y métodos..... | 18 |
| 1.- Extracción de RNA..... | 18 |
| 2.- Síntesis y amplificación de secuencias génicas HOX..... | 19 |
| 3.- Electroforesis en gel y visualización de los productos..... | 19 |
| 4.- Detección de transcritos HOXB mediante hibridación <i>in situ</i> | 20 |
| Resultados..... | 24 |
| 1. Detección de transcritos mediante la reacción de RT-PCR..... | 24 |
| 1.1 Perfil de expresión de los genes HOXB en cérvix humano normal..... | 24 |
| 1.2 Perfil de expresión de genes HOXB en tejido neoplásico del cérvix humano..... | 25 |
| 1.3 Expresión constitutiva de los genes B8 y B9 en el cérvix humano..... | 26 |
| 2. Detección de transcritos mediante la técnica de hibridación <i>in situ</i> no radiactiva..... | 29 |
| 2.1 Patrón de expresión <i>in situ</i> de los transcritos de genes HOXB1, B4, B8 y B9..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.2 Expresión in situ de transcritos HOXB3 y B13 en cérvix normal y su desregulación en carcinomas cervicales..... | 30 |
| 2.3 Ausencia de transcritos HOXB5 y B6 en cérvix humano..... | 31 |
| Discusión..... | 36 |
| Conclusiones..... | 41 |
| Bibliografía..... | 42 |
| Apéndice I. Lista de figuras..... | 48 |

“PATRON DE EXPRESION DE LA FAMILIA DE GENES HOXB EN CERVIX NORMAL Y LESIONES MALIGNAS DEL CUELLO UTERINO HUMANO”

RESUMEN

En México, la neoplasia más común en la población femenina es el cáncer cérvico-uterino (CaCU), y su desarrollo se ha asociado a diversos factores siendo uno de los principales la infección por virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo, además de otros eventos como la activación de oncogenes celulares, inactivación de genes supresores de tumor, etc. Por otra parte, se ha demostrado que los genes homeóticos HOX son parte importante en el desarrollo de diversos tejidos y que su alteración génica puede provocar malformaciones morfológicas y oncogénesis. De esta manera se ha demostrado que el grupo de genes HOXB presenta un patrón de expresión característico para cada órgano sano y que este patrón de expresión está alterado en aquellos órganos con cáncer. Con base en esto, en el presente trabajo se estudió el patrón de expresión del grupo de genes HOXB en el cérvix humano con y sin neoplasia. Se analizaron 8 genes en muestras de cérvix normal, lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y carcinomas cervicales por medio de RT-PCR e hibridación *in situ* no radiactiva. Los resultados mostraron que 1) en el cérvix normal se expresan los genes HOXB1, B3, B4, B8, B9 y B13; 2) en los carcinomas, sólo están activos HOXB1, B4, B8 y B9; 3) no hay expresión de HOXB5 y B6 en el cérvix humano (con y sin neoplasia) y 4) existe la desregulación de los genes HOXB3 y B13 en el tejido neoplásico. Estos datos sugieren que otro de los eventos involucrados en la carcinogénesis del cérvix uterino humano puede ser la inactivación de genes homeóticos.

INTRODUCCION

CANCER

El cáncer cérvico-uterino (CaCU), es una de las neoplasias más comunes que afectan a la mujer, y es considerada la segunda causa de muerte en el mundo, ocupando en México el primer lugar en defunciones.

El CaCU se inicia probablemente con lesiones premalignas (neoplasias intraepiteliales cervicales ó NICs I, II y III; Genest y col., 1993), y los virus de papiloma humano o HPV, son considerados como uno de los principales agentes etiológicos tanto de lesiones premalignas, así como de tumores del cuello uterino humano (Mott, 1987; zur Hausen, 1989). Al parecer, el genoma del HPV se integra en el genoma celular de tumores de cérvix y de líneas celulares derivadas de tumores tales como HeLa y Caski, y sus oncoproteínas E6 y E7 interfieren con las proteínas reguladoras del ciclo celular p53 y Rb, respectivamente (revisado en Park y col., 1995).

La familia de estos virus, comprende más de 80 tipos identificados en humanos (zur Hausen, 1996), de los cuales, los tipos 16 y 18, considerados como los más agresivos, han sido identificados como los agentes principales causantes de cerca del 90% de los cánceres de cérvix (Tay, 1995).

La interacción de proteínas virales y proteínas celulares endógenas convergen en la desregulación de la progresión del ciclo celular y parecen ser críticas para el desarrollo de cáncer de cérvix.

Aunque la integración del DNA viral dentro del genoma celular parece ser un importante paso en el desarrollo del cáncer cervical, este solo evento claramente

no es el único responsable para la carcinogénesis cervical (Sasagawa y col., 1997), ya que muchos tumores infectados contienen el DNA viral en forma episomal (DNA viral circular mantenido en una forma libre, extracromosomal, llamado "episoma"; revisado en Park y col., 1995). Por tal motivo, el desarrollo del cáncer cervical es un proceso que no puede ser explicado simplemente por la infección con tipos específicos de HPV. Es evidente entonces que son diversos los factores que promueven la aparición de células transformadas y el establecimiento del fenotipo neoplásico y que no solamente la aparición del cáncer de cérvix está dado por la infección por tipos específicos de HPV.

Por lo tanto, se ha puesto gran interés en conocer otros posibles factores que participen en el desarrollo del cáncer de cérvix. De ésta manera, se ha demostrado que muchos genes son expresados diferencialmente (encendiéndose y/o apagándose), en los tumores si se comparan con los tejidos sanos de donde provienen, y últimamente, ha sido postulada una posible asociación entre el desarrollo del cáncer y aquellos genes que controlan la transcripción génica, como por ejemplos los genes homeóticos.

GENES HOMEOTICOS Y GENES HOX

Como parte importante en el desarrollo de algunos organismos, se encuentra la participación de los genes homeóticos (HOM). Tres modelos principales de regulación génica especifican las características básicas de la función y el cuerpo del embrión de *Drosophila melanogaster* y en los sucesivos estadios del desarrollo: 1) los genes maternos que se expresan en el huevo antes de la

fertilización (oocito); 2) los genes de segmentación que se transcriben a partir del genoma celular después de la fertilización y 3) los genes homeóticos que se expresan más tarde afectando a las características únicas de cada segmento individual del cuerpo (Lehninger y col., 1993).

Los genes homeóticos son expresados durante la embriogénesis de *D. melanogaster* con un patrón complejo de especificidad posicional y temporal y se ha estudiado ampliamente la participación de éstos en la diferenciación de diversos órganos durante su desarrollo embrionario (Lawrence y Morata, 1994). Los genes HOM forman la cascada de actividad de factores de transcripción los cuales subdividen al embrión en unidades progresivas pequeñas (parasegmentos) dando a cada uno la unidad de identidad particular. Los genes HOM son, por lo tanto, responsables de proveer la información correcta para dar las coordenadas espaciales para que las células se diferencien de acuerdo a su posición dentro del embrión. Estos genes están agrupados dentro de los complejos *Antennapedia* (ANT-C) y *Bitórax* (BX-C) colectivamente referidos como homeóticos (HOM-C) (revisado en Duboule y Morata, 1994; Andrew y Scott, 1992; Krumlauf, 1994; Colleta y col., 1994; Mc Ginnis y Krumlauf, 1992; Whiting y col., 1991) los cuales participan en el desarrollo de los segmentos individuales a lo largo del eje anteroposterior (AP) de su cuerpo (Bentley y col., 1993; Gutman y col., 1994). Cada complejo contiene diferentes genes con funciones análogas; aquellos genes en el complejo *bitórax* controlan las diferencias entre los segmentos abdominal y torácico del cuerpo, mientras que aquellos del complejo *antennapedia* controlan las diferencias entre los segmentos del tórax y la cabeza.

Una característica importante que guardan los genes homeóticos de *Drosophila*, es la presencia de una secuencia de 183 nucleótidos altamente conservada durante la evolución y que se denomina homeobox la cual codifica para un dominio de 61 aminoácidos llamado homeodominio (Shen y col., 1989; Lill y col., 1995; Carè y col., 1996; Kongsuwan y col., 1989; Friedman y col., 1994). El homeodominio presenta un segmento del tipo hélice-giro-hélice capaz de unirse a secuencias de ADN (Revisado en Gehring y col., 1994; Laughon, 1991; Tiberio y col., 1994; Bentley y col., 1993; Lehninger y col., 1993; Levine y Hoey, 1988) y por lo tanto los genes que lo contienen pueden actuar como factores de transcripción (Friedman y col., 1994; Zappavigna y col., 1991), tanto en autorregulación como en transregulación (Bentley y col., 1993).

El homeobox fue identificado originalmente en los genes homeóticos de *Drosophila* y como ha sido altamente conservado en la evolución, se han podido descubrir varios homólogos de éstos genes en diversas clases animales, que incluyen nemátodos, moluscos, erizos de mar, peces, ranas, aves y mamíferos. Dentro de los mamíferos, los genes homeóticos son denominados como Hox para los murinos y HOX para los humanos.

Como se muestra en la Figura 1, específicamente en mamíferos, 39 genes HOX han sido identificados y clasificados en cuatro grupos referidos como A, B, C y D (Scott, 1992; Zeltser y col., 1996) los cuales se localizan en los cromosomas humanos 7, 17, 12 y 2, respectivamente (Boncinelli y col., 1989; Chariot y Castronovo, 1996; Cillo y col., 1992; Carè y col., 1996; Carè y col., 1994; Rieger y

col., 1994), específicamente en las regiones 7p15.3, 17q21.3, 12q13.3 y 2q31 (Cillo y col., 1996; Apiou y col., 1996).

El ordenamiento de los genes dentro de cada complejo HOX es esencialmente el mismo que el complejo HOM de *Drosophila*, sugiriendo que los 4 grupos completos de los vertebrados se originaron por duplicaciones de un solo complejo primordial y que ha preservado su organización básica (Alberts y col., 1994).

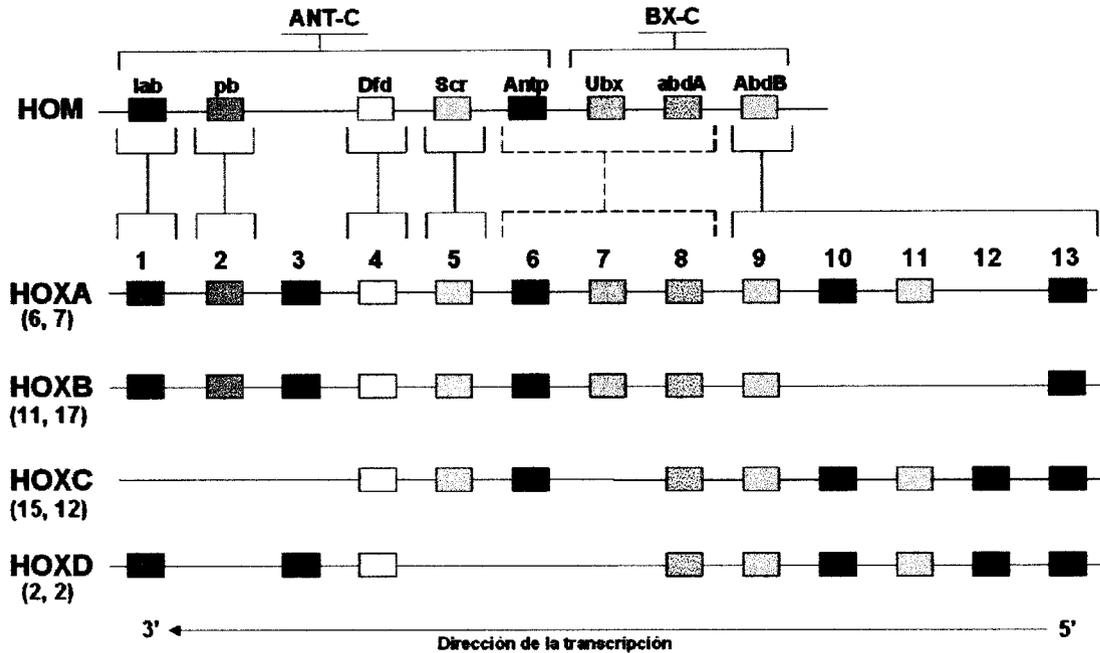


Figura 1. Comparación del complejo HOM de *Drosophila* y los complejos Hox de los mamíferos.

El grupo de genes HOM de *Drosophila melanogaster*, es mostrado en su orden cromosomal y está distribuido en los complejos *Antennapedia* (ANT-C) y *Ultrabithorax* (BX-C), los cuales incluyen a los genes *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex com reduced* (*Scr*), *Antennapedia* (*Antp*) y *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abdA*), *Abdominal-B* (*AbdB*), respectivamente (revisado en Andrew y Scott, 1992). Cada columna de genes, (mostrada por el mismo color), indica la correspondencia, basada sobre la homología en la secuencia del homeobox, entre el complejo HOM y los cuatro grupos Hox de los mamíferos (ratón y humano). Los números 1-13 indican los parálogos identificados hasta el momento (rectángulos de colores). Los números entre paréntesis indican los cromosomas sobre los cuales están localizados los diferentes grupos Hox de ratón y humano, respectivamente. El parálogo 3 no tiene correspondencia en el complejo HOM. Los parálogos 6, 7 y 8 están por determinarse si son homólogos al complejo HOM ó son duplicación independiente de algún gen tipo *Antennapedia*.

ANTECEDENTES

Recientemente la implicación de los genes HOX en el desarrollo del cáncer ha sido reforzada por diversas observaciones independientes: 1) existe una regulación coordinada de genes HOX que juega un papel importante en la proliferación, crecimiento y diferenciación normal de células hematopoyéticas (Magli y col., 1991), 2) existe una expresión alterada de los genes HOX entre tejido sano y con cáncer de riñón (Cillo y col., 1992), piel (Rieger y col., 1994), pulmón (Flagiello y col., 1996), mama (Chariot y Castronovo, 1996) y colon (De Vita y col., 1993), 3) la expresión constitutiva de genes HOX puede ser oncogénica en ratón (ver De Vita y col., 1993), 4) fallas en la expresión de genes HOXB provocan leucemias eritroides y linfoides (Petrini y col., 1992), 5) genes HOXB participan en la proliferación transformación celular (Krosi y col., 1998).

Existen reportes en los que se sugiere la participación de los genes homeobox en el desarrollo normal de diversos tejidos humanos; por ejemplo los genes Msx-1 y Msx-2 en el desarrollo fetal y postnatal de la glándula mamaria (Phippard y col., 1996).

En otros estudios, una estrecha unión ha sido establecida entre homeoproteínas y moléculas de adhesión como blancos de las primeras (Jones y col., 1993; Edelman y Jones 1993), las cuales juegan un papel central en diferentes procesos celulares tales como el crecimiento, diferenciación, señalización y organización citoesquelética entre otras. Algunas secuencias para la unión de homeoproteínas han sido identificadas en la región promotora del gen que codifica para la molécula de adhesión N-CAM, donde los dos genes

adyacentes, HOXB9 y HOXB8 pueden diferencialmente estimular la actividad promotora de N-CAM y la baja expresión de N-CAM pudiera ser parte importante en el proceso de metástasis.

Posteriormente ha sido sugerido que L-CAM (una de las primeras caderinas en ser aislada) es regulada por el gen HOXD9. De esta manera los genes HOX podrían estar controlando la expresión de moléculas morforeguladoras (Cillo y col., 1996). De igual manera en otros estudios se observó que la sobre-expresión de genes Hox en ratones transgénicos originó una alteración regional de los componentes corporales indicando la influencia que tienen las proteínas HOX sobre la morfogénesis de los vertebrados (Mc Ginnis y Krumlauf, 1992). Recientemente, esto ha sido reforzado por la identificación de mutaciones de genes HOX ocurridas naturalmente en ratón y humano (Goff y Tabin, 1996).

De igual manera se ha sugerido la participación de genes HOXA, B y C en el desarrollo de las células seminales hematopoyéticas (HSC) en sus diferentes etapas de diferenciación (Giampolo y col., 1994; Vielle-Grosjean y Huber 1995; Lawrence y Largman, 1992; Rieger y col., 1994; Bijl y col., 1996) así como en diversos tipos de leucemia (Nakamura y col., 1996 y Borrow y col., 1996). La implicación de los genes HOX en este tejido, ha sido sugerida por estudios en los cuales la modulación de la expresión de los genes HOX ha resultado en un incremento o disminución de hematopoyesis, por ejemplo, inhibición de la formación de colonias de eritrocitos por supresión de genes HOX específicos de los grupos B o C (Johnson y col., 1992). Se ha sugerido, por ejemplo, que el gen HOXB7 participa en la regulación génica en los tejidos hematopoyético y linfoide

(Deguchi y col., 1991), y además tiene una participación muy importante en la diferenciación mielomonocítica murina y humana (Lill y col., 1995) ya que este gen se encuentra activamente expresado en células mielomonocíticas en diferenciación pero está ausente en monocitos maduros, lo que sugiere la participación de este gen en ciertas etapas específicas en la diferenciación de células de origen monocito-macrófago. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Carè y colaboradores (1996) en los que se sugiere que el gen HOXB7 es expresado en altos niveles en melanocitos en proliferación (probablemente a través del factor de crecimiento bFGF), pero no en melanocitos maduros. Al parecer, el gen HOXB3 participa en la proliferación y diferenciación mieloide temprana y en el desarrollo linfoide (Sauvageau y col., 1997).

Por otra parte, se ha sugerido que los genes HOXB3, B6, B7, B9 y HOXB2, B4, B7 y B9, son activos en las líneas leucémicas KG1 (Petrini y col., 1992) y K562 (Magli y col., 1991 y Petrini y col., 1992) respectivamente; por el contrario, transcritos de este grupo B no son encontrados en células hematopoyéticas diferenciadas normales (linfocitos T, B y monocitos). De esta forma, se le ha atribuido a los genes HOX un papel muy importante en la diferenciación celular normal hematopoyética así como en neoplasias de este tejido.

También se ha observado la participación de los genes HOX en otros tejidos. El gen Hoxc6 es expresado en tejidos precancerosos de mama de ratón pero no es expresado en tumores diferenciados; en contraste, Hoxa1 es expresado únicamente en cáncer mamario murino pero no en las glándulas normales ni en tejidos mamaros precancerosos (Friedman y col., 1994; revisado en Anbazhagan

y Raman 1997). De igual manera, los trabajos preliminares de Chariot y colaboradores (1995) y Chariot y Castronovo (1996), sugieren que el gen HOXA1 puede jugar un papel importante en la transformación maligna y/o progresión a tumor en las células epiteliales de la glándula mamaria humana.

En otros casos, transcritos de HOXA4 han sido detectados en queratinocitos diferenciados de piel humana normal principalmente en la capa suprabasal de la epidermis mientras que en las células neoplásica no están presentes (Rieger y col., 1994). En los murinos, se ha visto que la mayoría de los miembros de los grupos de genes Hox son expresados en la piel normal, mientras que el repertorio es sustancialmente limitado en los papilomas y carcinomas, aunque en particular el gen Hoxb7 aumenta considerablemente sus niveles de expresión en la progresión de papiloma a carcinoma (Chang y col., 1998).

Se ha observado entonces que el patrón de expresión de los genes HOX es diferente en tejidos sanos en comparación con tejidos con cáncer del mismo órgano, debido probablemente a cambios en los mecanismos de transcripción inherentes durante la progresión maligna o tal vez a la heterogeneidad celular de los tejidos sanos y con cáncer, como se ha encontrado en riñón (Cillo y col., 1992), hígado, colon (DeVita y col., 1993), pulmón (Tiberio y col., 1994 y Flagiello y col., 1996) y piel murina (Chang y col., 1998).

En suma, estos trabajos sugieren que tipos específicos de genes HOX pueden ser clave en algunas etapas de diferenciación celular o en el mantenimiento de células diferenciadas y que la alteración de estos puede ser importante en eventos como transformación celular y/o progresión tumoral.

222883

ANTECEDENTES DIRECTOS

Se ha sugerido, la participación de los genes HOX en la fertilidad femenina y masculina en ratones y humanos; la mutación de Hoxa11 (Hsieh-Li y col., 1995) y Hoxa10 (Satokata y col., 1995) en los ratones machos provoca una malformación en los vasos deferentes que los hace parecer como epidídimo. Esta aparente transformación homeótica interrumpe el libre descenso de los testículos al escroto lo que refleja una espermatogénesis defectuosa ya que generalmente los testículos de los mamíferos requieren de la reducida temperatura escrotal para completar la espermatogénesis. Las hembras con estos dos genes mutados producen óvulos viables, sin embargo no se lleva a cabo la implantación de los embriones a causa de un ambiente uterino defectuosos resultando en infertilidad para las hembras. En ambos casos, los mecanismos moleculares de estas anomalías no se conocen claramente.

El gen HOXA13 ha sido asociado a un síndrome de malformaciones en extremidades y genitales (Hand-Foot-Genital, HFG). En este síndrome, una mutación en el gen A13 provoca que no se sintetice una parte del homeodominio impidiendo así que la proteína pierda su función de factor de transcripción provocando en las personas con HFG acortamiento de los dígitos en las extremidades. Además, las hembras con HFG, típicamente involucran un útero parcial o totalmente dividido debido a defectos en la fusión de los tubos Mulerianos (Mortlock e Innis, 1997 y Scott, 1997).

Algunos genes de los grupos A y D se han encontrado en estructuras del tracto normal femenino y masculino durante el desarrollo embrionario así como en

el órgano adulto. Se tienen reportes en los que se ha demostrado la expresión de genes A9, A10, A11 y A13 (Taylor y col., 1997) así como los genes D10-D13 (Dollé y col., 1991) en estructuras embrionarias genitales de ratones machos y hembras, y se ha visto que la expresión de éstos genes se mantiene en los animales adultos femeninos y masculinos, así como en el humano adulto femenino (Taylor y col., 1997). Estos resultados sugieren que varios genes HOX están participando en la formación y diferenciación de estructuras embrionarias, así como posiblemente en el mantenimiento de estructuras genitales adultas.

Tomando en conjunto estos datos, es probable que los genes HOXB se expresen en el cérvix uterino normal así como en sus lesiones malignas y de igual forma sus patrones de expresión puedan ser diferentes como se ha encontrado en otros órganos. Como en la actualidad no se tienen reportes de la posible participación de estos genes en el cérvix uterino humano, tanto en el tejido sano como en las lesiones malignas, este estudio estuvo enfocado en determinar los patrones de expresión de los genes HOXB en ambos tejidos (sin y con neoplasia). Una vez determinados estos, quedaría por conocer cual es el papel que juegan aquellos genes HOX activos.

JUSTIFICACION

Hoy en día, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y se calcula que cada año mueren en el mundo cerca de 4,300,000 personas a causa de esta enfermedad. De los diferentes tipos de cáncer, el CaCU es el causante de cerca de 160,000 muertes al año (Burger y col., 1996) y en México figura entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad.

El CaCU es actualmente uno de los principales problemas de salud y socioeconómicos de nuestro país debido a que se encuentra en el primer lugar de neoplasias que aquejan a la mujer en México.

Se han reportado varias evidencias que manifiestan la participación de diversos factores que están relacionados con la progresión a un CaCU y sin embargo no se ha podido completar el esquema etiológico de este padecimiento. Como consecuencia, no se ha podido encontrar la cura para este cáncer, ni tampoco una terapia adecuada, por lo que es necesario que se continúen los estudios en este campo, así como la detección e identificación de otros factores relacionados con el CaCU. Se sugiere entonces continuar con el estudio de los procesos carcinogénicos para tratar de encontrar otros factores que estén involucrados en el desarrollo del CaCU.

Por otro lado, se ha reportado la participación de genes HOX en el desarrollo normal de estructuras embrionarias en los diferentes grupos de organismos; así también se ha comprobado que estos genes participan también a lo largo del desarrollo postnatal de estos organismos de una manera tejido específico. Se ha demostrado la expresión de los genes HOX en diversos tejidos cancerosos y se

ha visto que su patrón de expresión en muchos casos es diferente respecto al que se obtiene en los correspondientes tejidos sanos, sugiriéndose de esta manera que los genes HOX pueden tener un papel en los procesos oncogénicos.

Con base en los reportes que se tienen acerca de la participación de los genes HOX en diversos órganos con tejido epitelial (Susuki y col., 1993), surge la posibilidad de que puedan estar participando también en epitelio de cérvix humano tanto en el tejido normal así como en las lesiones malignas; además de que en la actualidad no se tienen reportes que ligen de alguna manera los procesos de carcinogénesis en el cérvix humano con la expresión de genes HOX.

Por tales motivos, resulta de gran interés conocer cual es la participación de estos genes en los procesos normales y lesiones malignas del cérvix uterino humano.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCU es una enfermedad con etiología múltiple y su desarrollo, probablemente se presenta a lo largo de diferentes etapas que inician tal vez en una displasia y culminan en un carcinoma. Los factores que están involucrados en el desarrollo del CaCU no se han determinado completamente; actualmente se conoce la participación de los diferentes tipos oncogénicos de HPV, de genes supresores como p53 y Rb, la actividad sexual y el número de parejas sexuales entre otros.

Tomando en cuenta la identificación de los genes HOX en el desarrollo normal y de transformaciones malignas de diferentes tejidos conocidos (mama, pulmón riñón, leucemia), surge la posibilidad de que los genes HOX estén expresados también en el desarrollo de otros tejidos neoplásicos (Carè y col., 1996) en éste caso probablemente en el cérvix humano.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo, se pretende obtener el patrón de expresión de los genes HOX en los carcinomas del cuello uterino humano y compararlo con el correspondiente patrón de expresión en el tejido sano (sin neoplasia).

222883

HIPOTESIS

El patrón de expresión de la familia de genes HOXB del cérvix uterino normal será diferente al patrón de expresión del tejido neoplásico (carcinoma).

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer el patrón de expresión del grupo de genes HOXB en el cérvix uterino humano

Objetivos particulares

1.- Determinar la presencia de transcritos de los genes HOXB1, B4, B8 y B9 en muestras de cérvix uterino normal mediante la técnica de retrotranscripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

2.- Determinar la presencia de transcritos de los genes HOXB1, B4, B8 y B9 en lesiones malignas (carcinomas) del cérvix uterino humano mediante la técnica de RT-PCR.

3.- Determinar por medio de hibridación *in situ* (HIS) no radiactiva la localización de los transcritos HOXB1, B4, B5, B6, B8, B9 y B13 en el epitelio del cérvix normal, así como en las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y lesiones malignas.

NATURALEZA DEL ESTUDIO

El presente trabajo fue del tipo retrospectivo observacional en el cual se trabajaron tejidos normales sin neoplasia (n=11), lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (n=10) y lesiones malignas (n=7) del cérvix uterino mediante las metodologías de HIS y RT-PCR.

MATERIALES Y METODOS

1.- EXTRACCIÓN DE RNA.

Se tomó tejido de cérvix normal así también de lesiones malignas y se procedió a extraer el RNA total por medio de la técnica descrita con anterioridad por Chomczynski y Sacchi (1987) con algunas modificaciones de acuerdo al método de TriPure (Boehringer) (Figura 2). Aproximadamente 50-100 mg de tejido se incubaron en 500 µl de solución desnaturalizante (tiocianato de guanidina) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se adicionaron otros 500 µl de reactivo TriPure y se agitó la muestra en vórtex durante 5 minutos para luego adicionar 200 µl de cloroformo frío, se agitó en vórtex y se incubó por 10 minutos

a temperatura ambiente seguido de centrifugación a 12,000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. En este paso se formaron tres fases: una fase acuosa que contenía el RNA total, una interfase y una fase orgánica conteniendo DNA y proteínas, respectivamente. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 1 ml de isopropanol frío homogeneizando por inversión y se dejó precipitando el RNA toda la noche a 4 °C. Se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C y se deshecho el sobrenadante, se lavó el botón de RNA con 1 ml de etanol al 70% agitando en vórtex y se centrifugó a 9,500 r.p.m. por 5 minutos a 4 °C; se decantó el etanol y se dejó secar el RNA a temperatura ambiente. El botón de RNA se resuspendió en 50 µl de agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Posteriormente se incubaron a 60 °C durante 15 minutos y se almacenaron en alícuotas a -20 °C hasta su utilización.

2.- SÍNTESIS Y AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS GENICAS HOX.

Un microgramo de RNA total fue sometido a una reacción de RT-PCR (Figura 2) de un solo paso mediante el kit RT-PCR System (Boehringer) con las condiciones de ciclaje, temperatura y oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes HOXB1 (Carè y col., 1994), B4 (Giampolo y col., 1994), B8 y B9 (Petrini y col., 1992).

3.- ELECTROFORESIS EN GEL Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.

Se tomó una alícuota de 10 µl de cada uno de los productos de reacción de RT-PCR y se transfirieron a un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se

sometieron a electroforesis; los productos fueron visualizados en un transvisualizador de luz UV para ácidos nucleicos. Las imágenes se obtuvieron e imprimieron por computadora.

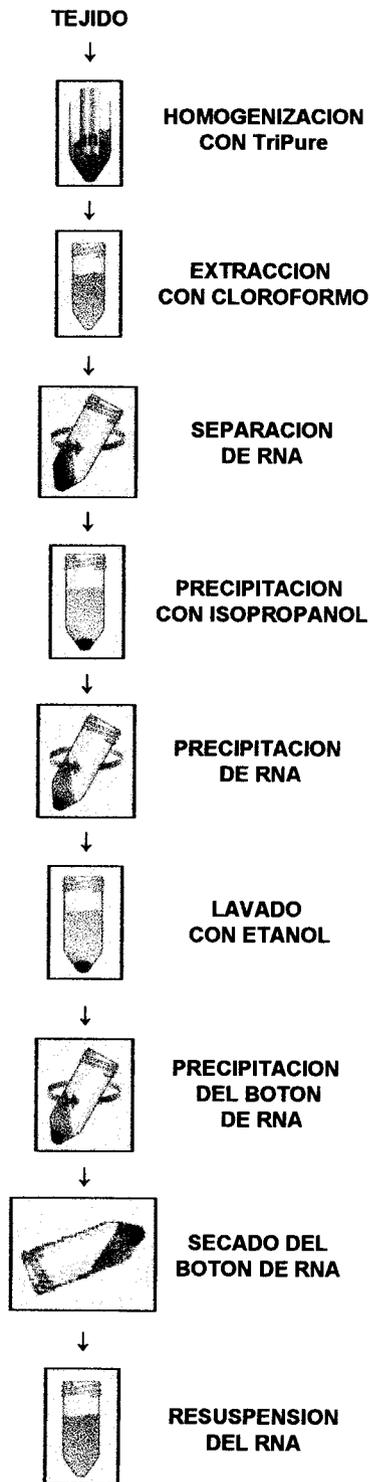
4.- DETECCIÓN DE TRANSCRITOS HOXB MEDIANTE HIBRIDACION *in situ*.

Las sondas utilizadas en este trabajo se purificaron mediante el kit High Pure PCR Product Purification Kit (BOEHRINGER) y el marcaje se hizo mediante la técnica de Biotin-Nick Translation Mix (BOEHRINGER) utilizando el biotinil-16-dUTP de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Figura 3).

Las sondas B1, B4, B5, B6, B8, B9 y B13 que se analizaron en este estudio fueron un obsequio del Dr. Corey Largman (Martinez VA Medical Center, CA, USA). El sistema que se usó para la detección de los transcritos fue uno no radiactivo biotinilado mediante el kit GenPoint (DAKO), el cual se basa en la amplificación de la señal de hibridación, con lo cual se obtiene una señal más intensa que en una hibridación *in situ* común. Esta técnica se realizó como se describe. Se hicieron cortes de tejido tumoral y normal de cérvix, se desparafinaron por 30 min. a 60°C y luego en dos baños de xilol por 15 min. Los tejidos se hidrataron gradualmente en diferentes concentraciones de alcoholes por 5 min. Posteriormente se les aplicó un baño de digestión en pepsina al 0.8% / 0.2N de HCl a 37°C durante 1 minuto. Se lavaron tres veces en agua bidestilada fresca y se inhibió la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 60 minutos. Después de lavar en agua bidestilada durante 10 min., se aplicó a cada muestra la sonda biotinilada junto con 50 µl del cocktail de hibridación el cual consistió de

50% formamida, 10% dextrán sulfato, 2X SSC (20X: 3 M NaCl, 300 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), PBS 1X, 2% SDS y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmón. Posteriormente, las muestras se calentaron en un horno a 70°C durante 8 min. para linealizar los ácidos nucleicos y luego se incubaron durante 60 min. a 37°C. Después de la hibridación, las muestras se lavaron en amortiguador TBST 1X (TBST 10X: 500 mM Tris HCl pH 7.6, 3 M NaCl, 1% Tween-20) por 10 minutos y se aplicó la solución de lavado de astringencia del kit (1:50 en agua bidestilada) durante 20 minutos en un baño María a 55°C. Nuevamente se hizo un lavado en TBST durante 5 minutos y posteriormente se aplicó 2 veces el siguiente ciclo de amplificación: 1) Streptavidina-HRP primario (1:1000) durante 15 minutos, 2) Lavado en TBST fresco durante 3 minutos, 3) Solución Biotinil-Tiramida durante 15 minutos y, 4) Lavado en TBST fresco durante 3 minutos. Posteriormente se aplicó Streptavidina-HRP secundario durante 15 minutos seguido de un lavado en TBST fresco durante 3 minutos. Después se adicionó el cromógeno de revelado (diaminobencidina). La reacción de revelado se detuvo con agua bidestilada e inmediatamente se contratiñó con hematoxilina y se deshidrató en diferentes grados de alcohol (100%, 90%, 70% y 30%) hasta xilol. Por último, las muestra se montaron permanentemente con resina para su observación al microscopio.

EXTRACCION DE RNA



RT-PCR

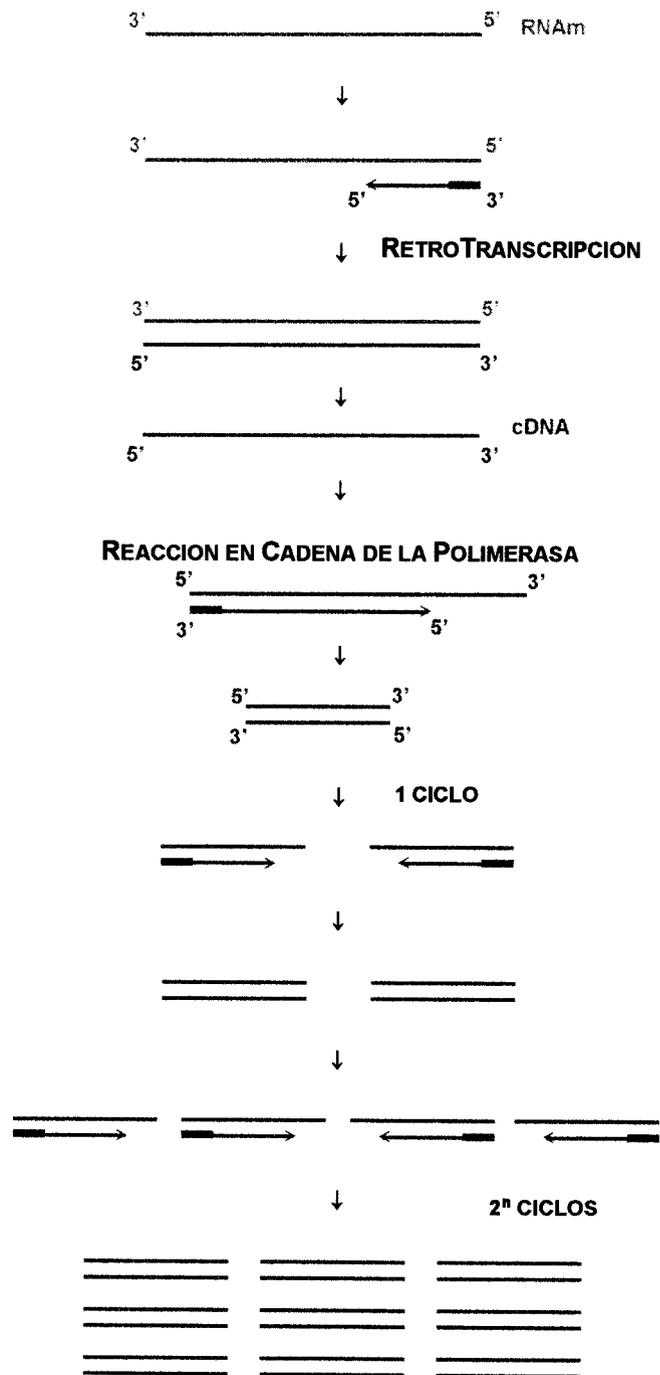


Figura 2. Técnica de extracción de RNA y su transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Se muestran los pasos generales utilizados para extraer el RNA total a partir de tejido de cérvix congelado, así como el fundamento de la RT-PCR. Para detalles ver Materiales y métodos.

HIBRIDACION IN SITU

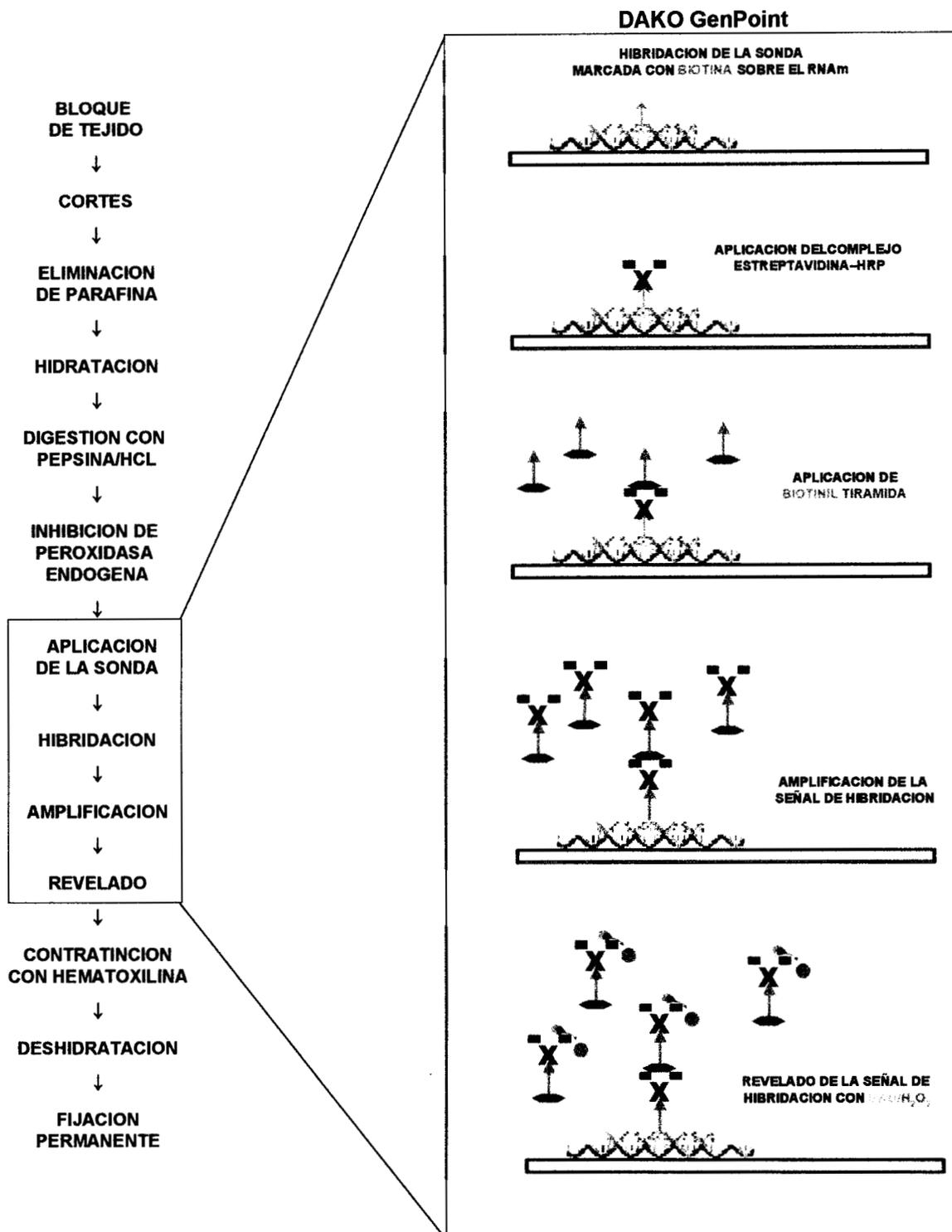


Figura 3. Técnica de hibridación *in situ* no radiactiva.

Se muestran los pasos generales de la técnica de hibridación *in situ* utilizada, así como el fundamento del kit de hibridación GenPoint (DAKO). Para detalles ver Materiales y métodos.

RESULTADOS

En el presente trabajo se analizó la expresión de 8 genes del grupo HOXB en tejido normal y neoplásico (lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado y carcinomas) del cérvix-uterino mediante las técnicas de RT-PCR e hibridación *in situ* no radioactiva.

1. Detección de los transcritos mediante la reacción de RT-PCR.

Los transcritos de cuatro genes HOXB fueron detectados en tejido de cérvix. Brevemente, se extrajo el RNA celular total de tejido de cérvix con tiocianato de guanidina. Posteriormente, el RNA mensajero se sometió a la síntesis del DNA complementario usando la reacción de RT-PCR de un solo paso mediante la técnica de Titan RT-PCR System (Boehringer) con oligonucleótidos, condiciones de temperatura y ciclaje específicos para cada uno de los genes HOXB1, B4, B8 y B9 (ver Materiales y Métodos).

Como control positivo (C+) se utilizó tejido de hígado. Como control interno se realizó la determinación de β -actina (Figura 4e y 5e). Los controles negativos (C-) consistieron de todos los componentes de reacción menos enzimas.

1.1 Perfil de expresión de los genes HOXB en cérvix humano normal.

La Figura 4 muestra el patrón de expresión del grupo de genes HOXB en cérvix normal. Los cuatro genes analizados son activos en cérvix normal; transcritos del gen B1 fueron detectados en 10/11 muestras analizadas, con expresión mínima en la mitad de ellas (Figura 4a). El gen HOXB4 tuvo una menor

expresión con solo 4/11 muestras positivas representando así el gen con menor expresión de los cuatro analizados. Su expresión fue menor tanto en número de muestras, así como en intensidad de amplificado (Figura 4b). Por otro lado, los transcritos del gen B8 fueron detectados en 8/11 muestras, encontrándose en este caso altos niveles de expresión (Figura 4c). Para el gen B9, en todas las muestras analizadas, 11/11, se pudieron encontrar sus transcritos presentando además el nivel mas alto de expresión (Figura 4d). De acuerdo a estos resultados, hay mayor expresión del gen B9 en el cérvix normal en comparación con los 3 genes restantes (B1, B4 y B8).

1.2 Perfil de expresión de genes HOXB en tejido neoplásico del cérvix humano.

En la Figura 5 se muestra el patrón de expresión de los genes HOXB en muestras de carcinomas de cérvix. En general, existe una fuerte expresión de los genes B1, B8 y B9. Los genes B1 y B8 mostraron un patrón de expresión semejante con 7/7 muestras positivas en la detección de sus transcritos con expresión fuerte de ambos genes en todas las muestras (Figura 5a y 5c). Por otra parte, transcritos del gen B9 pudieron ser detectados en 6/7 muestras (Figura 5d) con un alto nivel de expresión. Por último, los transcritos del gen B4 disminuyeron considerablemente con relación a los tres genes anteriores, siendo detectados solamente en 3/7 muestras además de que se observó una marcada disminución en su expresión (menor intensidad en el amplificado).

Comparando los patrones de expresión (normal y neoplásico) se tiene que:

- 1) Al parecer, la expresión del gen B1 es un poco mayor en carcinoma que en cérvix normal,
- 2) Existe mayor expresión del gen B4 en cérvix normal que en carcinoma, a pesar de ser el gen con menos expresión en el cérvix (normal y neoplásico),
- 3) Es mayor la expresión del gen B8 en carcinoma que en cérvix normal,
- 4) Hay una expresión del gen B9 ligeramente mayor en carcinoma cervical que en cérvix normal.
- 5) En general, la expresión de HOXB es mayor en carcinoma cervical que en cérvix normal.

1.3 *Expresión constitutiva de los genes B8 y B9 en el cérvix humano.*

Como muestran los resultados obtenidos, dos genes que se expresan en mayor proporción son el B8 y B9. Este par de genes localizados cerca del extremo 5' presentaron alta expresión en cérvix normal, y en particular, la expresión de B8 aumenta en el estado neoplásico. También se observa que todos los carcinomas analizados, expresaron fuertemente los transcritos B8 y B9 (Figuras 5c y 5d) presentando mayor expresión en éstos que en los tejidos normales.

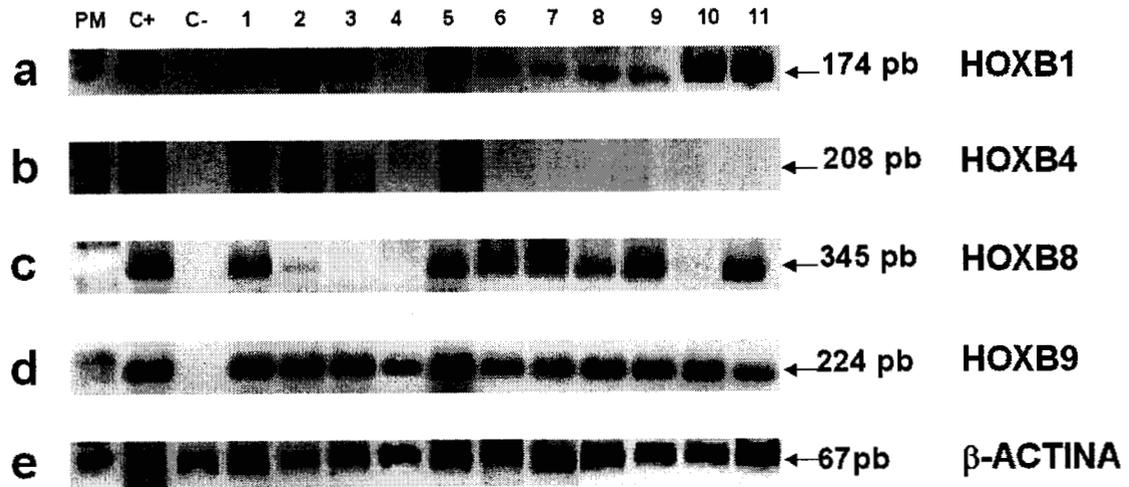


Figura 4. Patrón de expresión de genes HOXB en cervix normal mediante RT-PCR.

Las bandas observadas muestran el fragmento amplificado para cada uno de los genes HOXB analizados; los tamaños se muestran en pares de bases (pb). Los números del 1-11 indican el número de muestra. PM es el marcador de peso molecular utilizado; C+ y C- señalan controles positivo y negativo, respectivamente. La calidad del RNA, tanto de las muestras así como de los controles fue normalizada usando oligonucleótidos para amplificar el gen β -actina.

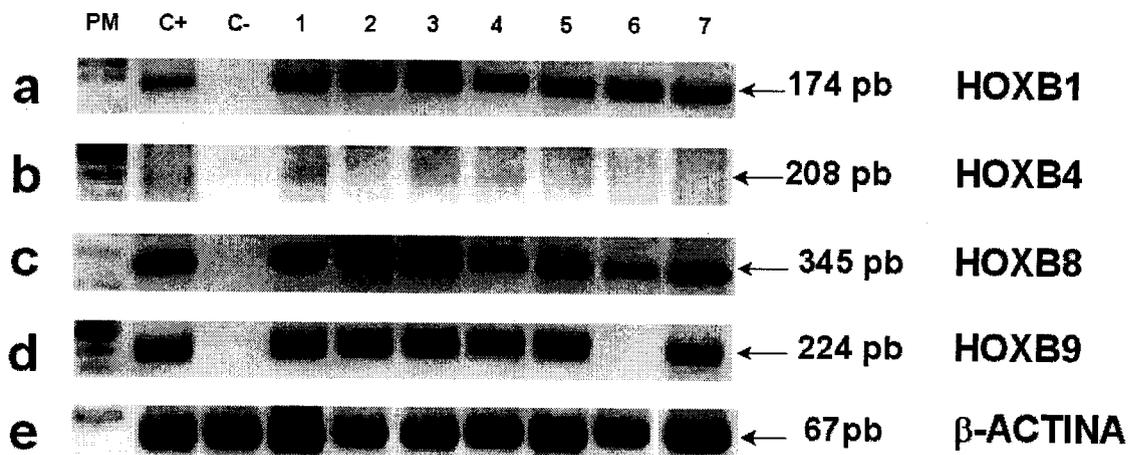


Figura 5. Patrón de expresión de genes HOXB en carcinoma cervical mediante RT-PCR.

Las bandas observadas muestran el fragmento amplificado para cada uno de los genes HOXB analizados; los tamaños se muestran en pares de bases (pb). Los números del 1-7 indican el número de muestra. PM es el marcador de peso molecular utilizado; C+ y C- señalan controles positivo y negativo, respectivamente. La calidad del RNA, tanto de las muestras así como de los controles fue normalizada usando oligonucleótidos para amplificar el gen β -actina.

2. Detección de transcritos mediante la técnica de hibridación *in situ* no radiactiva.

La hibridación *in situ* (HIS) es una herramienta de biología molecular que puede utilizarse para conocer la localización histológica de RNA mensajeros específicos. Por tal motivo, la HIS es la técnica más adecuada para discernir la expresión entre células normales y neoplásicas en tejidos con ambos tipos celulares (Rieger y col, 1994).

Los tejidos normales de cérvix, así como los carcinomas cervicales utilizados en los análisis por RT-PCR, fueron fijados e incluidos en parafina por el método estándar y utilizados para visualizar los transcritos de cada uno de los genes HOXB1, B4, B5, B6, B8 B9 y B13. Brevemente, los tejidos se desparafinaron, hidrataron y digirieron en una solución de pepsina/HCl. Estos se hibridaron con cada una de las sondas HOXB marcadas con biotina. Los transcritos fueron evidenciados mediante un sistema de amplificación con el kit GenPoint (Dako) siguiendo las indicaciones del fabricante.

El tejido de hígado fue utilizado como control positivo (C+). El control negativo (C-) se realizó sin la aplicación de la sonda.

2.1 Patrón de expresión *in situ* de los transcritos de genes HOXB1, B4, B8 y B9.

Las Figuras 6A y 6B muestran el patrón de expresión para los transcritos de los genes HOXB1, B4, B8 y B9 identificados por hibridación *in situ* en tejido de cérvix normal y neoplásico. En los cuatro casos el patrón de expresión fue semejante; en los tejidos normales hay expresión fuerte en el epitelio cervical,

principalmente en las células indiferenciadas del estrato basal. La presencia de transcritos fue disminuyendo hacia la zona apical del epitelio en los cuatro casos. En la zona apical del epitelio no se detectó la presencia de ninguno de los cuatro genes por lo que se tiene que la expresión se limita a las zonas de células en división celular. Por otra parte, como se muestra en la Figura 6B la expresión de los mismos 4 genes es encontrada también en los carcinomas; en estos tejidos, la expresión no se limita al estrato celular basal del epitelio sino que se extiende a otros estratos epiteliales, pero sobre todo se presenta en el tejido de invasión de manera homogénea, y salvo en las zonas más apicales del epitelio, el resto de éste presenta alta expresión de los 4 genes HOXB.

2.2 Expresión in situ de transcritos HOXB3 y B13 en cérvix normal y su desregulación en carcinomas cervicales.

En las Figuras 7A y 7B se muestra el patrón de expresión de los genes HOXB3 y B13 respectivamente; en el cérvix normal estos dos genes son expresados principalmente en la zona basal del epitelio. La expresión de B3 se extiende aproximadamente en un tercio del epitelio hacia la zona apical, mientras que para el caso de B13 la señal es casi exclusiva de la monocapa basal (Figura 7D). Por otra parte, en los carcinomas no se encontró señal de expresión de este par de genes en ninguna de las capas epiteliales, tanto basales como apicales, por lo que se sugiere que hay una desregulación de los genes HOXB3 y B13 en los carcinomas cervicales (Figura 7C).

2.3 Ausencia de transcritos HOXB5 y B6 en cérvix humano.

Como se muestra en las Figuras 8A y 8B, no hay expresión de los genes B5 y B6 en cérvix normal ni en carcinomas cervicales, respectivamente; no se encontró señal positiva en la hibridación sobre ambos tejidos con sondas específicas para estos dos genes por lo cual se sugiere que en el cérvix humano no está involucrada la expresión de HOXB5 y B6.

222883

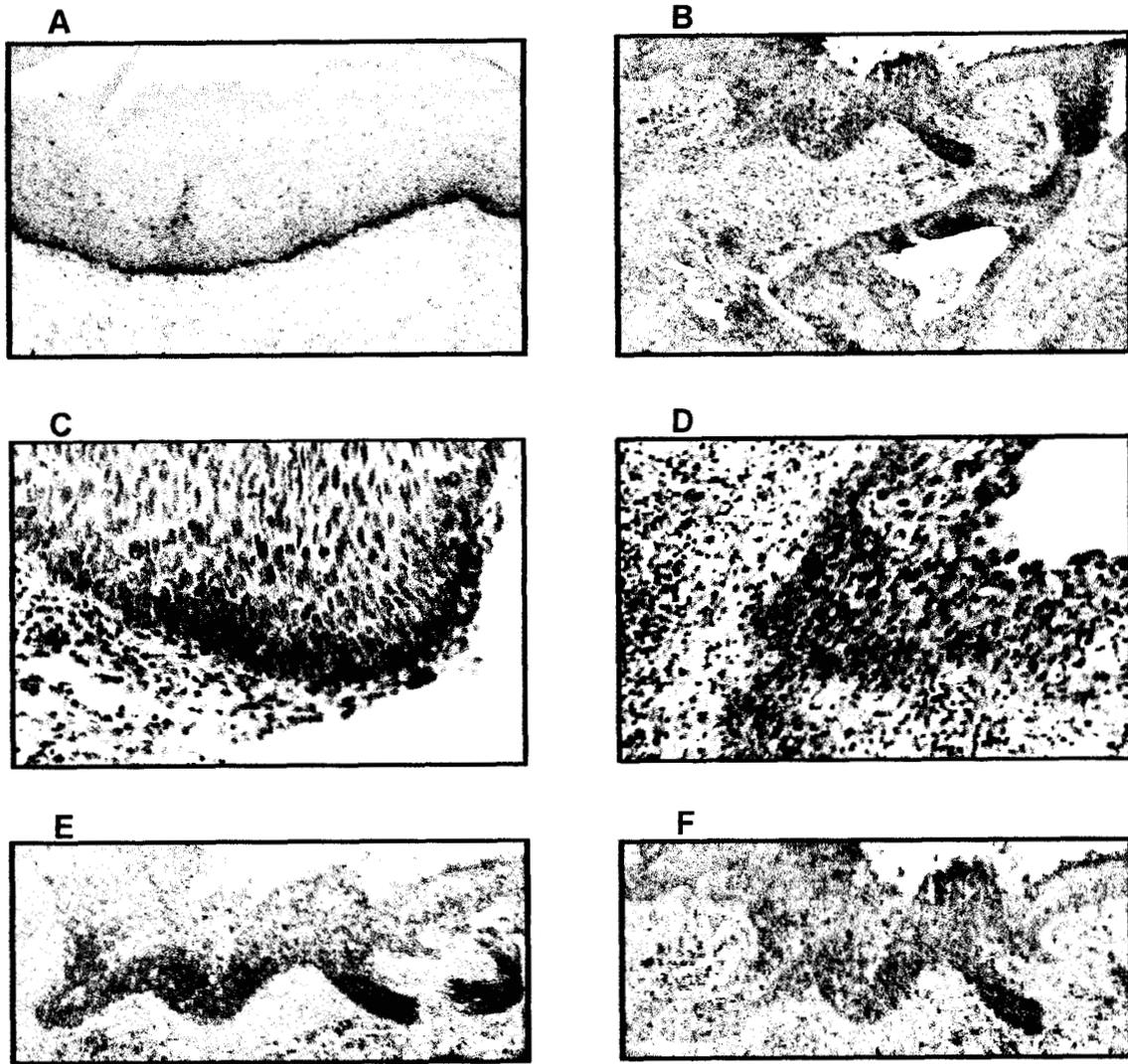


Figura 6. Localización de transcritos de los genes HOXB1, B4, B8 y B9 por hibridación *in situ* no radioactiva en cérvix normal y carcinomas cervicales.

A. Patrón de expresión *in situ* que presenta el gen B1, (reacción similar observada para los genes B4, B8 y B9), en el epitelio cervical normal; los 4 genes son expresados como se muestra en la figura, fuertemente en la capa basal epitelial, un poco mas ligera en el primer tercio del epitelio y disminuyendo hacia la zona apical. **B.** Expresión *in situ* en carcinomas invasores mostrando reacción positiva para los 4 genes dentro de las zonas de invasión. En general los 4 genes presentaron el mismo patrón de expresión salvo algunas pequeñas diferencias; HOXB4 es expresado solo en las zonas de la lesión cercana al estroma principalmente en las células de la capa basal y cercanas a ésta (**C**). Los genes B1, B8 y B9 son expresados fuertemente en las zonas de invasión (**D**). B1, B4 y B8 también se expresan en la zona basal y primer tercio epitelial pero sin llegar a la zona apical (**E**) y B9 es expresado en casi todos los estratos epiteliales incluyendo parte de la zona apical (**F**). Todos los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. (A, B, E y F amplificación 25X; C, amplificación 160X; D, amplificación 100X).

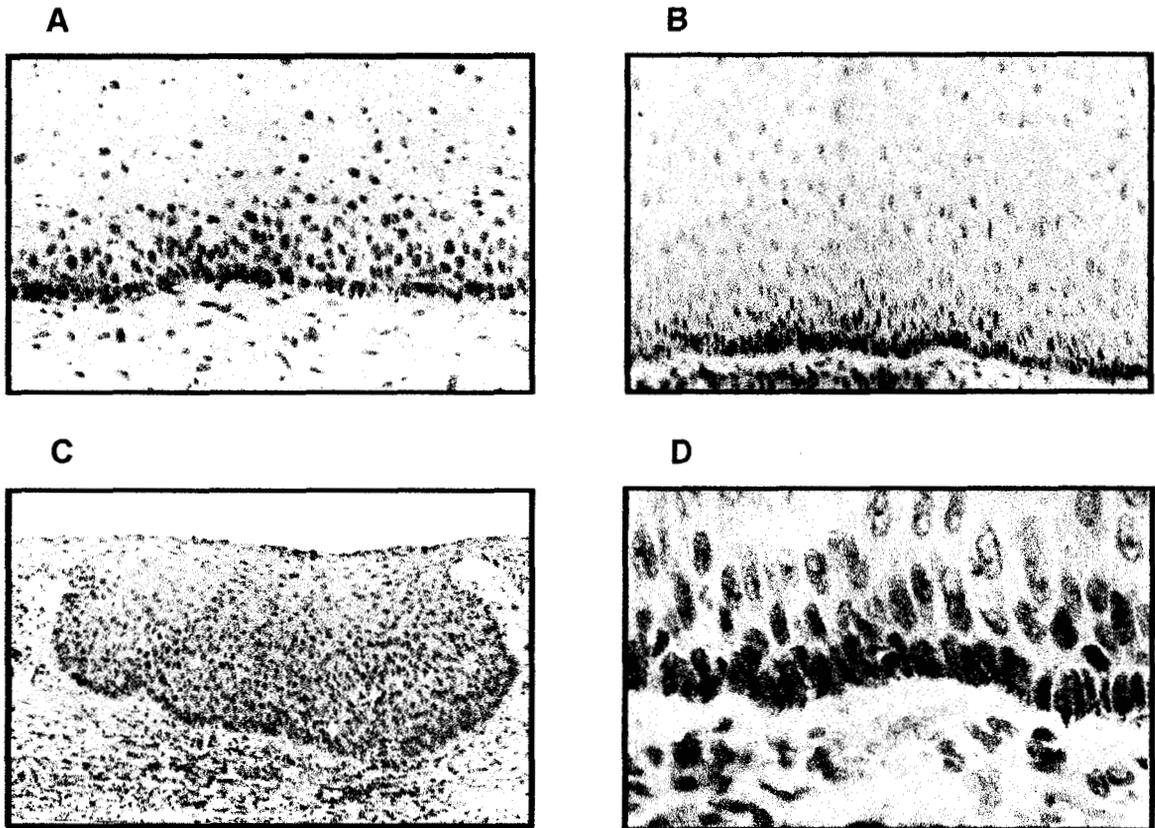


Figura 7. Detección *in situ* de transcritos HOXB3 y B13 en epitelio cervical normal.

La figura **A** muestra el patrón de expresión por hibridación *in situ* del gen B3; se localiza reacción positiva en el primer tercio del epitelio, mayormente en la capa basal con ligera reacción en las capas superiores pero ausente en la zona apical. Por otra parte, una marcada diferencia se muestra con respecto al gen B13 del cual sus transcritos son detectados casi exclusivamente en la monocapa basal (**B** y **D**). La figura **C** muestra una sección de carcinoma *in situ* negativo para los transcritos B3 y B13. Todos los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. (A,B, amplificación 60X; C, amplificación 25X; D, amplificación 400X).

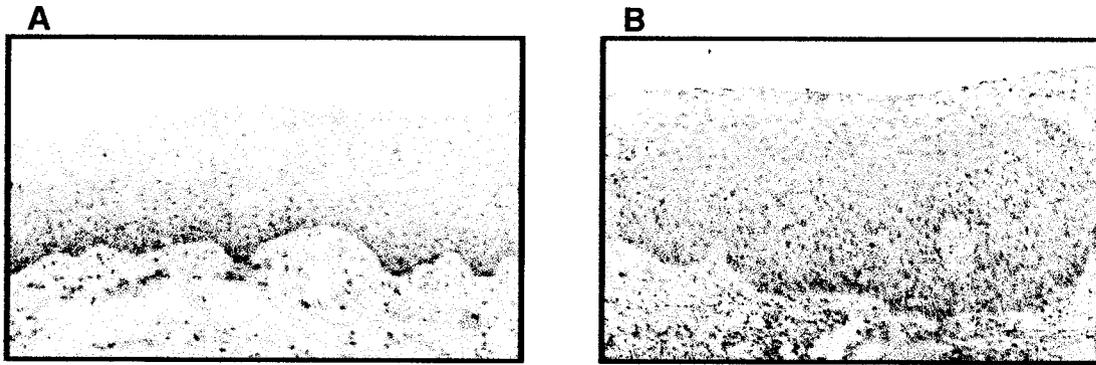


Figura 8. Ausencia de transcritos HOXB5 y B6 en el cérvix humano. Las figuras **A** y **B** muestran hibridación negativa para transcritos B5 y B6 en secciones de cérvix normal y carcinoma *in situ* respectivamente. Las mismas sondas B5 y B6 fueron hibridadas sobre cortes de hígado humano los cuales fueron usados como control positivo para descartar falsos negativos en el análisis sobre tejido cervical. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. (A,B, amplificación 25X).

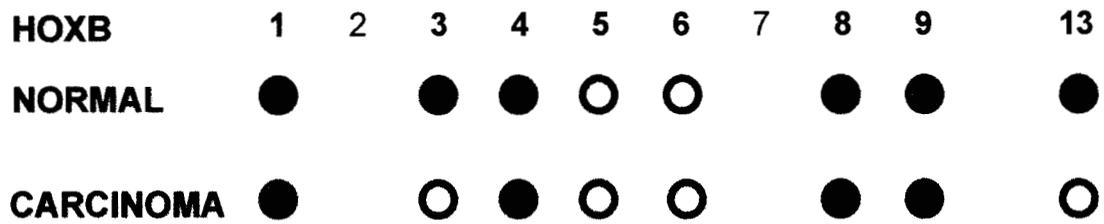


Figura 9. Representación esquemática del patrón de expresión del grupo de genes HOXB en el cérvix-uterino humano.

El grupo de genes HOXB es expresado de manera diferencial en el cérvix normal y carcinoma cervical. Los círculos cerrados y abiertos, representan a los genes activos y apagados, respectivamente.

DISCUSION

El patrón de expresión del grupo HOXB en particular, puede o no variar en un órgano sano cuando se compara con el mismo órgano con cáncer. Por ejemplo, el pulmón sano tiene activos los genes B2-B6 (Tiberio y col., 1994) mientras que con cáncer están encendidos los genes B2-B9. Sin embargo, en el colon, el patrón de expresión en el tejido sano así como con cáncer es el mismo, con los genes B2-B9 activos (De Vita y col., 1993). En el caso del cérvix humano, el patrón de expresión presente en el tejido sano es diferente al del tejido neoplásico. En general, de los 8 genes analizados, 6 son activamente expresados en cérvix normal, mientras que en los carcinomas sólo 4 genes son activos (Figura 9). El mismo análisis se ha realizado en riñón (Cillo y col., 1992), pulmón (Tiberio y col., 1994), colon e hígado (De Vita y col., 1993) exhibiendo diferentes patrones de expresión con distintos genes HOX encendidos o apagados en cada uno de esos órganos, sugiriendo que la expresión de los genes HOX puede ser órgano-específica.

Se ha visto que los genes HOX suelen expresarse o apagarse en bloques con diferente número de genes tanto en el órgano normal, así como en el tejido neoplásico (Cillo y col., 1992 y De Vita y col., 1993). En el cérvix normal se presenta un comportamiento parecido; hay expresión de un bloque de 3 genes (B8, B9 y B13) en el extremo 5'. Otro bloque de 3 genes (B1, B3 y B4) del extremo 3' también es expresado. Por el contrario, 2 genes centrales del grupo (B5 y B6) permanecen inactivos en cérvix normal. Esta característica peculiar, probablemente sea debida a la acción reguladora tanto positiva como negativa

que guardan algunos pares adyacentes de genes HOX sobre genes blanco, como lo es el caso del par B8 y B9 sobre la regulación transcripcional que tienen en el promotor de la molécula de adhesión celular neural ó N-CAM (Jones y col., 1992).

Una característica de los genes HOX, es su expresión espacial que presentan con respecto al eje antero-posterior (AP) en el cuerpo de los organismos, de esta manera, genes mas cercanos a los extremos 3' y 5', se expresan en las regiones más anteriores y posteriores, respectivamente, en el cuerpo. De esta manera, se ha visto que órganos como el pulmón que se localiza en la parte media del eje AP del cuerpo cercano al extremo 3' expresa principalmente los genes cercanos a esta posición (B2-B6), mientras que otros órganos como hígado (B2-B7), riñón y colon (B2-B9), que se localizan prácticamente en la región central del eje AP expresan los genes más centrales. De acuerdo a lo anterior, en el cérvix humano sucede algo similar; como se aprecia en la figura 1, el número de muestras positivas para los genes B1 y B4 fue de 6/11 en ambos casos mientras que para B8 y B9 fueron 8/11 y 11/11 respectivamente. Los genes B1 y B4, están localizados en el extremo 3' y los genes B8 y B9 en el extremo 5'. Estos resultados sugieren que los genes localizados en el extremo 5' presentan una mayor expresión en el tejido normal con respecto a los genes del extremo 3' (esto correlaciona en parte con la expresión espacial que guardan los genes del extremo 5' de expresarse en las regiones más posteriores como lo es el cérvix). Sin embargo, en el presente trabajo también se encontró expresión de los genes B1 y B4 (del extremo 3'), de esta manera, en algunas ocasiones la expresión HOX no mantiene su expresión espacial tan estricta como también se ha visto en la piel

humana (Rieger y col., 1994) o como en este caso particular del cérvix. Una posible explicación pudiera ser que como el cérvix, y en general el sistema reproductor femenino está en constante recambio, diferenciación y división celular, debido al ciclo menstrual, de alguna manera, deben estar manteniéndose los mecanismos moleculares para mantener la plasticidad del cérvix (Taylor y col., 1997).

Por otro lado, algunos genes HOX han sido relacionados en el desarrollo y mantenimiento de diversas estructuras del tracto urogenital; en éstas, al parecer pueden participar por un lado a nivel de fertilidad y por otro en el proceso de la carcinogénesis.

Previos reportes indican que algunos genes del extremo 5' de los grupos HOX están presentes en diversas estructuras del tracto urogenital. En el presente trabajo se pudo demostrar por RT-PCR e hibridación *in situ* la expresión de aquellos genes localizados en el extremo 5' del grupo HOXB (B8, B9 y B13) en el cérvix normal, y los genes B8 y B9 son de los genes mayormente expresados. Pudiera ser que estos genes, junto con otros, formen parte del conjunto de eventos involucrados en el mantenimiento cíclico de esta parte del tracto reproductivo ya que los genes parálogos HOXA11 y A13 también ha sido identificado en el cérvix humano (Taylor y col., 1997). En ese trabajo se encontró altos niveles de expresión de HOXA13 en cérvix normal, a diferencia de HOXB13 que es expresado a niveles bajos como se encontró en el presente trabajo, lo cual sugiere que la expresión de los diversos genes parálogos puede ser diferente en un mismo tejido.

Otros estudios con genes parálogos en el ratón se han hecho y se ha demostrado que hay expresión de Hoxa11 (Hsich-Li y col., 1995) y Hoxa13 (Taylor y col., 1997) en el cérvix murino; Hoxb13 en dominios posteriores del tracto genital así como en aquellas estructuras embrionarias del seno urogenital (Zeltser y col., 1996) y de Hoxd12 y d13 en útero de ratón (Dollé y col., 1991). Por otra parte, se ha demostrado que la expresión del gen Hoxa10 mutado produce esterilidad tanto en los ratones machos y hembras por defectos en la espermatogénesis y en la capacidad del embrión de implantarse en el útero, respectivamente (Satokata y col., 1995). Todos estos datos sugieren que los genes HOX presentes en el tracto genital tanto de murino como de humanos pueden tener un papel a nivel funcional más que a nivel estructural dado que ambos tractos son diferentes (Hsieh-li y col., 1995).

Con base en lo anterior es comprensible que fallas en la expresión de los genes HOX puedan ser parte de la promoción y establecimiento del estado neoplásico de las células. Así, se ha visto que el gen Msx (HOX7) es expresado altamente en cérvix normal pero con menores niveles de expresión en el cáncer cervical y más interesantemente, el gen HOXA1 también es expresado altamente en cáncer cervical (Shim y col., 1998). Este último resultado se asemeja al encontrado en este estudio, ya que uno de los genes que presentó alta expresión en carcinoma fue el parálogo HOXB1 (Figura 5a.).

Por otra parte, se ha sugerido que existe una correlación inversa entre el grado de malignidad y la expresión de genes HOX hacia la progresión de cáncer de pulmón de células pequeñas (Tiberio y col., 1994) y cabe la posibilidad de que

el establecimiento del estado neoplásico en el cérvix sea debido en parte a la falta de expresión de los genes HOXB3 y B13.

Un aspecto importante sin embargo, del cual se conoce poco, es la función reguladora que tienen los genes HOX sobre genes blanco que puedan estar implicados en el mantenimiento normal de un tejido y/o el establecimiento del fenotipo neoplásico. Existen algunos reportes en los que se sugiere que los genes HOX puedan estar participando entre otros aspecto, en la regulación de genes supresores de tumor como lo sugiere Tomotsume y colaboradores (1993) al encontrar que el gen de ratón *mgl-1* análogo al gen supresor de tumor "lethal l(2) giant larvae (l(2)gl)" de *D. melanogaster* es un gen blanco del gen *Hoxc8*. De esta manera, la pérdida de la supresión de tumor en el cérvix normal, debida probablemente a la desregulación de los genes HOX responsables de esta, sea una de las causas importantes en la progresión hacia el cáncer de cérvix.

Tomando juntos estos resultados, se puede acentuar la importancia que pueden tener los factores de transcripción, en este caso los genes HOX, en la evolución de las neoplasias.

CONCLUSIONES

1.-Existe un patrón de activación del grupo de genes HOXB en el cérvix uterino humano con y sin neoplasia.

2.-La activación de los genes HOXB en el tejido sano es diferente al que se presenta en el tejido neoplásico.

3.-En cérvix normal y en cáncer cervical hay expresión de los genes HOXB1, B4, B8 y B9

3.-Existe desregulación de los genes HOXB3 y B13 en el tejido neoplásico cervical.

4.-Probablemente la expresión de los genes HOXB5 y HOXB6 no está involucrada en el cérvix humano.

222883

BIBLIOGRAFIA.

Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. (1994). Molecular biology of the cell. Third edition. Garland Publishing Inc. New York & London pp.1294.

Anbazhagan R y Raman V. Homeobox genes : Molecular link between congenital anomalies and cancer. Eur. J. Cancer 1997, 33 :635-637.

Andrew D y Scott M. Downstream of the homeotic gene. The New Biologist 1992, 4(1):5-15

Andrew D y Scott M. Downstream of the homeotic genes. The New Biologist 1992, 4:5-15.

Apiou F, Flagiello D, Cillo C, Malfay B, Poupon M y Dutrillaux B. Fine mapping of human HOX gene cluster. Cytogenet Cell Genet. 1996, 73:114-15.

Bentley K, Bradshaw M y Ruddle F. Physical linkage of murine Hox-b cluster and nerve growth factor receptor on yeast artificial chromosomes. Genomics 1993, 18:43-53.

Bijl J, van Oostveen J, Kreife M, Rieger E, van der Raaij-Helmer L, Walboomers J, Corte G, Boncinelli E, van den Brule A y Meijer C. Expression of HOXC4, HOXC5 and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. Blood 1996, 87 :1737-1745.

Boncinelli E, Acampora D, Pannese M, D'Esposito M, Somna R, Gaudino G, Stornaiuolo A, Cafiero M, Faiella A y Simeone A. Organization of human class I homeobox genes. Genome 1989, 31:745-756.

Borrow J, Shearman A, Stanton V, Becher R, Collin T, William A, *et al.* The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. Nature Genetics 1996, 12:159-167.

Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton Culver H, Vasilev SA, Berman ML y Wilczynski SP. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. J. Natl. Cancer. Inst. 1996, 88:1361-68.

Carè A, Testa V, Bassani A, Tritarelli E, Montesoro E, Sameggia P, Cianetti L y Peschle C. Coordinate expression and proliferate role of HOXB genes in activated adult T lymphocytes. Mol. Cell Biol. July 1994, pp. 4872-77.

Carè A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C and

- Colombo Mp. HOXB7 constitutively basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol. Cell Biol.* 1996, 16:4842-51.
- Chang P, Kozono T, Chida K, Kuroki T y Huh N. Differential expression of Hox genes in multistage carcinogenesis of mouse skin. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1998, 248 :749-752.
- Chariot A, Moreau L, Senterre G, Sobel M y Castronovo V. Retinoic acid induces three newly cloned HOXA1 transcript in MCF7 breast cancer cells. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 1995, 215(2):713-720.
- Chariot A y Castronovo V. Detection of HOXA1 expression in human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 222:292-297.
- Chomczynski P y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* 1987, 162:156-159.
- Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli M y Bocinelli E. Hox gene expression in normal and neoplastic human kidney. *Int. J. Cancer* 1992, 51:892-97.
- Cillo C, Cantile M, Mortarini R, Barba P, Parmiani G y Anichini A. Differential patterns of HOX gene expression are associated with specific integrin and ICAM profiles in clonal populations isolated from a single human melanoma metastasis. *Int. J. Cancer* 1996, 66:692-697.
- Coletta P, Shimeld S y Sharpe P. The molecular anatomy of Hox gene expression. *J. Anat.* 1994, 189:15-22.
- Deguchi Y, Moroney J y Kehri J. Expression of the HOX-2.3 homeobox gene in human lymphocytes and lymphoid tissues. *Blood* 1991, 78:445-450.
- De Vita G, Barba P, Odartehenko N, Giver C, Freschi G, Bucciarelle G, Magli M, Boncinelli E y Cillo C. Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 1993, 29A(6):887-93.
- Dollé P, Izpisúa-Belmonte J-C, Brown JM, Tickle C y Duboule D. Hox-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes & Development* 1991, 5:1767-76.
- Duboule D y Morata G. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in genetics* 1994, 10(10):358-364.
- Edelman G y Jones F. Outside and downstream of the homeobox. *J. Biological Chemistry* 1993, 288:20683-20686.

Flagiello D, Poupon M-F, Cillo C, Dutrillaux B y Malfoy B. Relationship between DNA methylation and gene expression of the HOXB gene cluster in small cell lung cancers. *FEBS Letters* 1996, 380:103-107.

Friedmann Y, Daniel A, Strickland P y Daniel C. Hox genes in normal and neoplastic mouse mammary gland. *Cancer research* 1994, 54:5981-85.

Gehring W, Qiu Y, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier A, Resendez-Pérez D, Affolter M, Otting G y Muthrich K. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 1994, 78:211-223.

Giampolo A, Sterpetti P, Bulgarini D, Samoggia P, Pelosi E, Valtieri M y Pesche C. Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 1994, 84(11):3637-47.

Genest DR, Lincoln S, Cibas E, Sheets E, Zitz JC y Crum CP. A binary (Bethesda) system for classifying cervical cancer precursors : criteria, reproducibility and viral correlates. *Human Pathology* 1993, 24 :730-736.

Goff DJ y Tabin CJ. Hox mutations au naturel. *Nature Genetics* 1996, 13:256-258.

Gutman A, Gilthorpe J y Rigby P. Multiple positive and negative regulatory elements en the promoter of the mouse homeobox gene Hoxb-4. *Molecular an Cellular Biology* 1994, 14(12):8143-54.

Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, Branford W, Li H, Smal K and Potter S. Hoxa11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* 1995, 121:1373-85.

Johnson RA, Stage KM, Perrinne S, Largman C y Lawrence HJ. Inhibition of HOX 2 homeobox gene function suppresses human erythroid cell colony formation. *Blood* 1992, 78:258^a.

Jones F, Prediger E, Bittner D, De Robertis E y Edelman M. Cell adhesion molecules as targets for Hox genes : Neural cell adhesion molecule promoter activity is modulate by cotransfection with Hox-2.5 and -2.4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, 89 :2086-2090.

Jones F, Holst B, Minowa O, De Robertis E y Edelman G. Binding and transcriptional activation of the promoter for the neural cell adhesion molecule by HoxC6 (Hox-3.3). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993, 90 :6557-6561.

Kongsuwan K, Allen J y Adams J. Expression of Hox-2.4 homeobox gene directed by proviral insertion in a myeloid leukemia. *Nucleic Acids Research* 1989, 17(5):1881-92.

Krosi J, Baban S, Krosi G, Rozenfeld S, Largman C y Sauvagean G. Cellular

proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1. *Oncogene* 1998, 16:3403-3412.

Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994, 78:191-201.

Laughon A. DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* 1991, 30(48):11357-11367.

Lawrence HJ y Largman C. Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia. *Blood* 1992, 80:2445-53.

Lawrence PA y Morata G. Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* 1994, 78:18-189.

Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM. (1993). *Principios de bioquímica*. Segunda edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp. 1013.

Levine M y Hoey T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 1988, 55:537-540.

Lill M, Fuller J, Herzig R, Crooks G y Gassun J. The role of the homeobox gene HOXB7 in human myelomonocytic differentiation. *Blood* 1995, 85(3):692-97.

Magli M, Barba P, Celetti A, De Vita G, Cillo C y Boncinelli E. Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88:6348-52.

McGinnis W y Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992, 68:283-302.

Mortlock D e Innis J. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nature genetics* 1997, 15:179-180.

Mott PCS. Papillomaviruses in human cancer. *Cancer* 1987, (May 15):1692-96.

Nakamura T, Largaespada D, lee M, Johnson L, Ohyashiki K, Toyama K. Fusion of protein gene NUP98 to HOXA9 by chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukemia. *Nature Genetics* 1996, 12:154-158.

Park T-W, Fujiwara H y Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* 1995, 76:1902-13.

Petrini M, Quaranta M, Testa V, Samoggia P, Tritarelli E, Carè A, Cianetti L, Valtieri M, Barletta C y Peschle C. Expression of selected human HOX-2 genes in B/T acute lymphoid leukemia and interleukin-2/interleukin-1 β -stimulated natural killer lymphocytes. *Blood* 1992, 80(1):185-93.

Phippard DJ, Weber Hall SJ, Sharpe PT, Naylor MS, Jayatalake H, Maas R, Woo I, Roberts Clark D, Francis West PH, Liu YH, Maxson R, Hill RE y Dale TC. Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during fetal and postnatal mammary gland development. *Development* 1996, 122:2729-37.

Rieger E, Bijil J, van Oostneen W, Soyer H, Oudejans C, Jiwa N. Walboomers M y Meijer C. Expression of the homeobox gene HOXC4 in keratinocytes of normal skin and epithelia skin tumors is correlated with differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 1994, 103:341-46.

Sasagawa T, Dong Y, Saijoh K, Satake S, Tateno M e Inoue M. Human papillomavirus infection and risk determinants for squamous intraepithelial lesion and cervical cancer in Japan. *Jpn. L. Cancer Research* 1997, 88 :376-384.

Satokata I, Benson G y Mass R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 1995, 374 :460-463.

Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough M, Lawrence H, Largman C y Humphries K. Causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* 1997, 6 :13-22.

Scott M. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 1992, 71 :551-553.

Scott M. Hox genes, arms and the man. *Nature genetics* 1997, 15 :117-118.

Shen W, Largman C, Lowney P, Corral J, Detmer K, Hauser C, Simonitch T, Hack F y Lawrence J. Lineage restricted expression of homeobox-containing genes in human hematopoietic cell lines. *Proc. Natl. Academ. Sci.* 1989, 86:8536-40.

Shim C, Zhang W. Hun C y Lee J-H. Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clinical Cancer Research* 1998, 4 :3045-3050.

Susuki M, Tanaka M, Iwase T. Naito Y, Sugimura H y Kino I. Over-expression of HOX-8, the human homologue of the mouse Hox-8 homeobox gene, in human tumors. *Biochem. And Biophys. Res. Com.* 1993, 194 :187-193.

Tay SK. Genital oncogenic human papillomavirus infection: a short review on the mode of transmission. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 1995, 24:598-601.

Taylor HS, Vanden GB and Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biology of reproduction* 1997, 57:1338-45.

Tiberio C, Barba P, Magli C, Arvelo F, LeChevalier T, Poupon M y Cillo C. Hox gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. *Int. J. Cancer* 1994, 58:608-15.

Tomotsume D, Shoji H, Wakamatsu Y, Kondosh H y Takahashi N. A mouse homologue of the *Drosophila* tumor-suppressor gene *l(2)gl* controlled by Hox-C8 in vivo. *Nature* 1993, 365:69-72.

Vieille-Grosjean I y Huber P. Transcription factor GATA-1 regulates human HOXB2 gene expression in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 1995, 270(9):4544-50.

Whiting J, Marshall H, Cook M, Krumlauf R, Rigby P, Stott D y Allemann R. Multiple spatially specific enhancers are required to reconstruct the pattern of Hox 2.6 gene expression. *Genes & Development* 1991, 5:2048-59.

Zappavigna V, Renucci A, Izpisúa JC, Urier G, Peschle C y Duboule D. HOX4 genes encode transcription factors with potential auto- and cross-regulatory capacities. *EMBO Journal*, 1991, 10 :4177-4187.

Zeltser L, Desplan C y Heintz N. Hoxb-13 : a new Hox gene in a distant region of the HOXB cluster maintains colinearity. *Development* 1996, 122 :24-75-2484.

zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res.* 1989, 49:4677-4681.

zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, 1288:F55-78.

Apéndice I. Lista de figuras.

Figura 1. Comparación del complejo HOM de *Drosophila* y los complejos Hox de los mamíferos. Pág. 7.

Figura 2. Técnica de extracción de RNA y su transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa. Pág. 22.

Figura 3. Técnica de hibridación *in situ* no radiactiva. Pág. 23.

Figura 4. Patrón de expresión de genes HOXB en cérvix normal mediante RT-PCR. Pág. 27.

Figura 5. Patrón de expresión de genes HOXB en carcinoma cervical mediante RT-PCR. Pág. 28.

Figura 6. Localización de transcritos de los genes HOXB1, B4, B8 y B9 por hibridación *in situ* no radiactiva en cérvix normal y carcinomas cervicales. Pág. 32.

Figura 7. Detección *in situ* de transcritos HOXB3 y B13 en epitelio cervical normal. Pág. 33.

Figura 8. Ausencia de transcritos HOXB5 y B6 en el cérvix humano. Pág. 34.

Figura 9. Representación esquemática del patrón de expresión del grupo de genes HOXB en el cérvix-uterino humano. Pág. 35.

222883

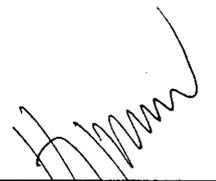
El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la presente tesis el día 16 de noviembre de 1999.



Tutor. Dr. Mauricio Salcedo Vargas
PRESIDENTE



Asesor. Dra. Rocío Ortiz Muñiz.
SECRETARIO



Asesor. Hector Mayani Viveros.
VOCAL