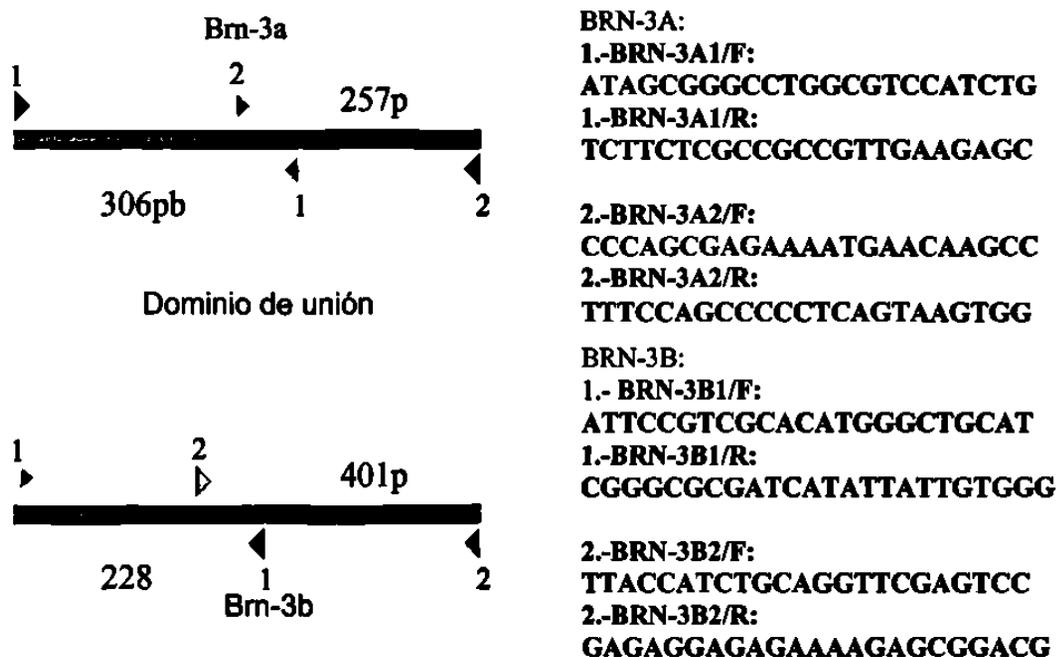


**Figura 13.-Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para YY1 y Oct1.** En la parte superior izquierda se esquematiza el diseño de los oligonucleótidos para los FT YY1 y Oct1; en la parte superior derecha se observa las secuencias de los oligonucleótidos. En la parte inferior izquierda se esquematiza el diseño de los oligonucleótidos para los Oct1 y en la parte inferior derecha se observa las secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos.



**Figura 14.- Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para Brn-3a y Brn-3b.** En la parte superior izquierda se esquematiza el diseño de los oligonucleótidos para los Brn-3a y en la parte superior derecha se observa la secuencia de los oligonucleótidos. En la parte inferior izquierda se esquematiza el diseño de los oligonucleótidos para los Brn-3b y en la parte inferior derecha se observa la secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos.

Tabla 4 - Condiciones finales para la RT de los FT.

Reactivos	Volumen	Concentración final
RNA de sangre periférica	4 a 8 $\mu$ l	200 a 400 ng/ $\mu$ l
random primers (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l	0.09 a 0.07 $\mu$ g/ $\mu$ l
Buffer 5X	2 $\mu$ l	0.9 a 0.8X
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l	0.9mM a 0.67mM
DTT (100 mM)	1 $\mu$ l	9mM a 6.7 Mm
RNAsin (20U/ $\mu$ l )	0.5 $\mu$ l	0.9 a 0.7 U/ $\mu$ l
BSA (10U/ $\mu$ l )	0.2 $\mu$ l	0.19 a 13 U/ $\mu$ l
MMLV-RT (2 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l	0.04 a 0.03 U/ $\mu$ l
H2O	---	----
Volumen total	10.9 a 14.9 $\mu$ l	----

La variaciones más importantes de las condiciones iniciales para la RT fueron la cantidad de RNA que se utilizó, al principio se agrego 50 ng y se termino agregando de 200 a 400 ng, otro cambio fue el aumento de random primers, del cual se utilizaba 0.05  $\mu$ g/  $\mu$ l y finalmente se utilizó de 0.07 a 0.09  $\mu$ g/  $\mu$ l.

En las condiciones de PCR los cambios se enfocaron el las concentraciones de  $MgCl_2$  y la temperatura de apareamiento, esto fue para mejorar tanto la astringencia de las reacciones, como la intensidad de las bandas obtenidas. Todas las condiciones de estandarización para los FT se tuvieron que hacer muy astringentes, ya que los PCR generaban muchas inespecificidades.

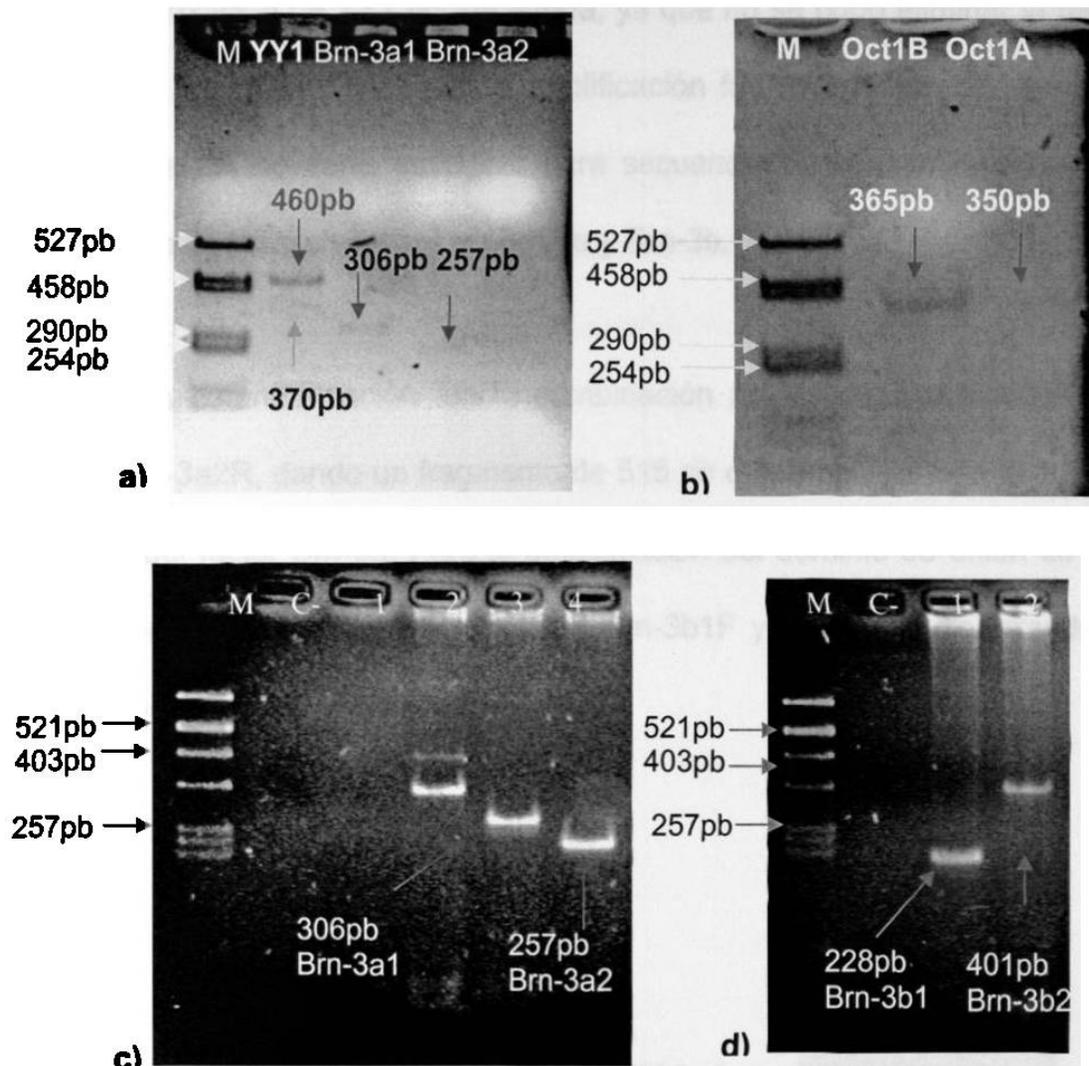
**Tabla 5.- Condiciones de amplificación de la PCR para YY1 y Oct1.**

Reactivos para YY1	Concentración	Reactivos para Oct1	Concentración
Buffer 10X	1X	Buffer 10X	1X
dNTPs (10mM)	0.24 mM	DNTPs (10mM)	0.24 mM
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.9 mM	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.75 mM
YY1F 5μM	0.4μM	Oct1F 5μM	0.4μM
YY1R 5μM	0.4μM	Oct1R 5μM	0.4μM
Taq gold 5U/μl	0.1U/μl	Taq gold 5U/μl	0.1U/μl
H <sub>2</sub> O	10.9	H <sub>2</sub> O	10.9
DNAc	5 μl	DNAc	5 μl
Volumen total	25μl	Volumen total	25μl

**Tabla 6.- Condiciones de amplificación de la PCR para Brn-3b y Brn-3a.**

Reactivos para Brn-3b	Concentración	Reactivos Para Brn-3a	Concentración
Buffer 10X	1X	Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.25 mM	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.6 mM
dNTPs (10mM)	0.24 mM	DNTPs (10mM)	0.24 mM
Brn-3b1R 5μM	0.4μM	Brn-3 <sup>a</sup> 1R 5μM	0.4μM
Brn-3b1F 5μM	0.4μM	Brn-3 <sup>a</sup> 1F 5μM	0.4μM
Taq gold 5U/μl	0.1U/μl	Taq gold 5U/μl	0.1U/μl
H <sub>2</sub> O	13.25	H <sub>2</sub> O	10.9
DNAc	3 μl	DNAc	5 μl
Volumen total	25μl	Volumen total	25μl

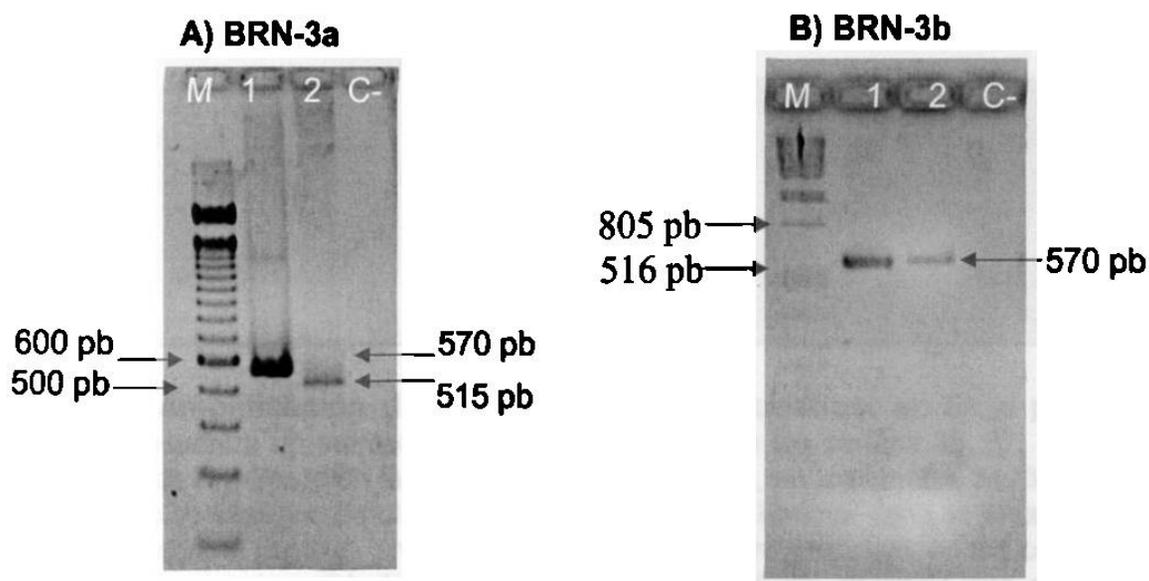
Para verificar que las condiciones de amplificación de los PA de YY1, Oct1, Brn-3a y Brn-3b, se hicieron electroforesis en geles de agarosa al 2% (Figura 15).



**Figura 15.- Gel de Agarosa al 2% de los PA de YY1, Oct1, Brn-3a y Brn-3b.**  
 a) El carril M es un marcador de peso molecular, en el carril YY1 es la estandarización del FT YY1 en donde se observa la banda de 460 pb que es la esperada y otra banda de 370 pb que posiblemente es una inespecificidad, en los carriles Brn-3a1 y Brn-3a2 son productos muy débiles del FT Brn-3a. b) El carril M es un marcador de peso molecular, en el carril Oct1B se observa una banda de 365 pb que es el segundo fragmento del FT Oct1, en el carril Oct1A se observa una banda de 350 pb que corresponde al primer fragmento del dominio de unión al DNA del FT Oct1. c) El carril M es un marcador de peso molecular, en el carril C- es el control negativo de la reacción, los carriles 1 y 2 son amplificaciones del FT Brn-3b no estandarizados, el carril 3 esta el PA de Brn-3a1 de un tamaño de 306 pb y por ultimo en el carril 4 esta el PA de Brn-3a2 de un tamaño de 257 pb. d) El carril M es un marcador de peso molecular, en el carril C- es el control negativo de la reacción, en el carril 1 es la amplificación del fragmento Brn-3b1 y en el carril 2 es el PA del fragmento de Brn-3b2.

La estandarización de YY1 no fue buena, ya que no se pudo eliminar la banda de 370 pb. En el caso de Oct1 la amplificación fue muy tenue, por lo que la cantidad de PA no sería suficiente para secuenciar, y consecuentemente el trabajo de esta tesis se enfocó en Brn-3a y Brn-3b.

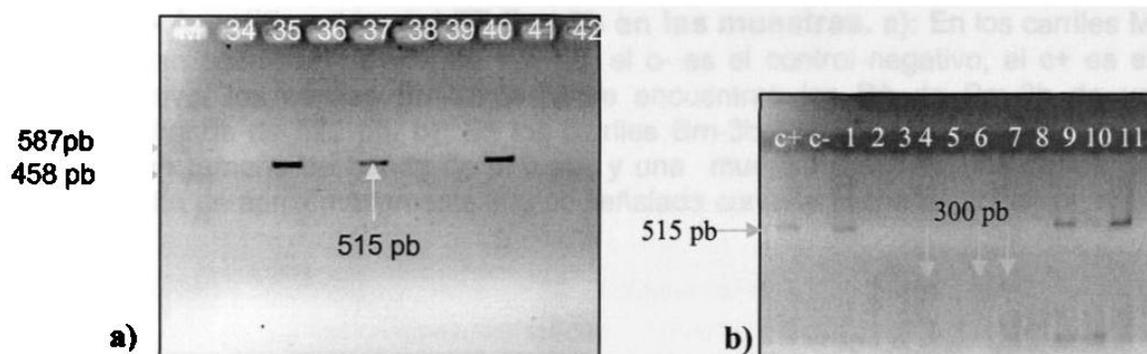
Una última estandarización fue la combinación de los oligonucleótidos Brn-3a1F y Brn-3a2R, dando un fragmento de 515 pb que amplifica todo el dominio de unión del factor Brn-3a. Para la amplificación del dominio de unión de Brn-3b, se combinaron los oligonucleótidos Brn-3b1F y Brn-3b2R, resultando un fragmento de 570 pb (Figura 16).



**Figura 16- Gel de Agarosa al 2% de los PA de Brn-3a y Brn-3b.** A) Brn-3a: En el carril M se encuentra un marcador de 100 pb, donde la primera banda de 100 pb no se observa debido al corte del gel, en el carril 1 es una estandarización de Brn-3b, en donde no se pudo obtener una sola banda y por ultimo en el carril 2 se encuentra el PA de Brn-3a de un tamaño aproximado de 515 pb, la cual es una banda única. B) Brn-3b: En el carril M se encuentra un marcador de PM  $\lambda$ +PstI, los carriles 1 y 2 se encuentran productos de Brn-3b de un tamaño de 570 pb, los cuales son bandas únicas.

#### 5.4 Amplificación de los dominios de unión de los FT Brn-3a y Brn-3b

La amplificación del dominio de unión de Brn-3a se llevó a cabo para todos los RNAs almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . De las 100 muestras de RNA analizadas, 70 muestras amplificaron de las cuales dos no dieron el tamaño de banda esperado de 515 pb, las 30 muestras restantes no se pudieron amplificar por la metodología de RT-PCR para el FT Brn-3a (Figura 17). Pero ese mismo DNAc se utilizó para amplificar Brn-3b, para el cual las 100 muestras amplificaron, solo 1 muestra tubo un tamaño de banda menor al esperado de 570 pb (Figura 18).

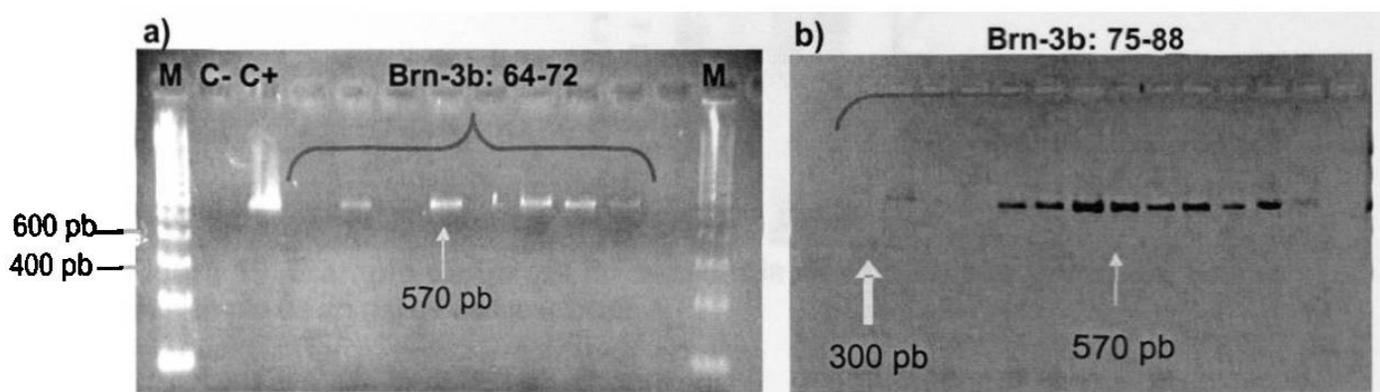


**Figura 17.- Amplificación del FT Brn-3a en las muestras. a):** En el primer carril M se encuentra un marcador de PM PBS+HaeIII, en los carriles 35, 37, 40 se observan PA de Brn-3a de un tamaño de banda de 515 pb, en los carriles 34, 36, 38, 39, 41 y 42, no se observa amplificación para este FT. **b):** El primer carril se encuentra c+ que es un control positivo, en el c- se encuentra el control negativo, en los carriles 1, 9 y 11 se encuentran PA del tamaño esperado de 515 pb, mientras que en los carriles 4, 6 y 7 se observan productos de menor tamaño de aproximadamente 300 pb.

#### 5.5.- Secuenciación de los PA de los FT Brn-3a y Brn-3b

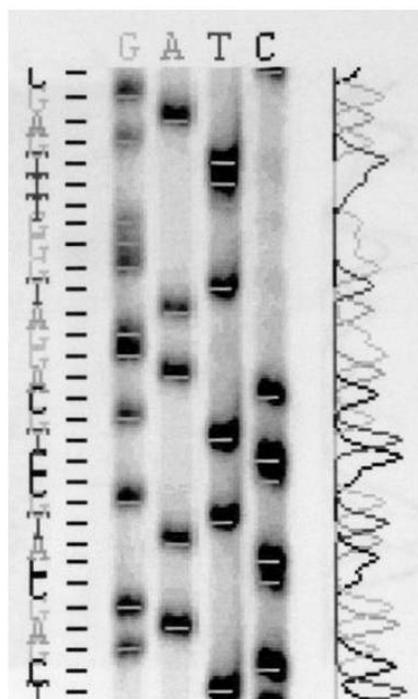
Los productos de la RT-PCR, que fueron 70 para Brn-3a y 100 para Brn-3b se purificaron, las muestras que se obtuvieron más de dos bandas se les aumento

la temperatura para eliminar las bandas inespecíficas. Todos los PA se sometieron a secuenciación para obtener las secuencias de cada una de las muestras y posteriormente se compararon con la secuencia normal reportada en el banco de genes llamado GenBank (Figura 19).



**Figura 18.- Amplificación del FT Brn-3b en las muestras. a):** En los carriles M se encuentran escaleras de PM de 100 pb, el c- es el control negativo, el c+ es el control positivo, los carriles Brn-3b:64-72 se encuentran los PA de Brn-3b de un tamaño de banda de 570 pb. **b):** En los carriles Brn-3b:75-88 se encuentran PA de Brn-3b de un tamaño de banda de 570 pb y una muestra presentó una banda de menor tamaño de aproximadamente 300 pb señalada con una flecha amarilla.

Para el dominio de unión al DNA del FT Brn-3a, cuatro muestras presentaron cambio nucleotídico, los cuales dan como resultado mutaciones con cambio de sentido. Dos de las muestras presentan el mismo cambio de a.a. (N296Y), una muestra presenta el cambio a.a. C260S y la cuarta muestra presentó cuatro cambios nucleotídicos de los cuales, uno es silencioso y los otros tres son mutaciones con sentido (Tabla 7).



**Figura 19.** Ejemplo de un gel de secuenciación de Brn-3a y Brn-3b. Este es un ejemplo de un gel de secuenciación.

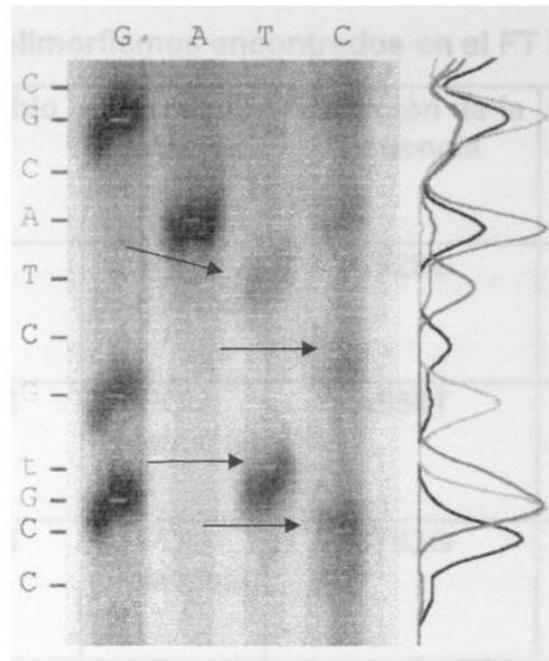
En la figura 20 se puede observar un ejemplo de los cambios encontrados en el dominio de unión de Brn-3a.

**Tabla 7.- Polimorfismos encontrados en el FT Brn-3a.**

Muestra	Cambio	Sitio de la mutación	Alteración de la secuencia	Efecto en la proteína
33	S CS	POU (N-terminal)	G855A A856G G858A A860G	V 285V T286A Q287R
39, 55	CS	POU (N-terminal)	A886T	N296Y
123	CS	Fuera de POU	G779C	C260S

S= mutación silenciosa

CS= mutación de sentido



**Figura 20.- Gel de secuenciación de Brn-3a donde se muestra polimorfismos.** Este gel es de la muestra 33 secuenciada con el oligonucleótido Brn-3a2R, los cambios están señalados por flechas. De arriba para abajo el primer cambio es Val285Val (G855A), el segundo es Thr286Ala (A856G, G858A) y el último Glu287Arg (A860G).

Todos los cambios encontrados en el dominio de unión de Brn-3a se localizaron en la región POU, con excepción del C260S, que se encuentra en un codón externo hacia el extremo 3' del dominio POU.

Para Brn-3b se encontraron 7 muestras con cambios nucleotídicos. Cinco de ellas presentaron el cambio nucleotídico silencioso C929G (S309S). Una muestra presentó el cambio nucleotídico A858T, generando una mutación con cambio de sentido (N286Y), el cual es el mismo presentado en dos muestras de Brn-3a (N296Y). La última muestra presenta el cambio nucleotídico C763G, el cual genera una mutación con cambio de sentido (A254G) (Tabla 8).

Tabla 8. –Polimorfismos encontrados en el FT Brn-3b.

Muestra	Cambio	Sitio de la mutación	Alteración de la secuencia	Efecto en la proteína
6, 15, 17, 56, 70	S	POU (N-terminal)	C929G	S309S
29	CS	POU (N-terminal)	A858T	N286Y
47	CS	POU (N-terminal)	C763G	A254G

Los cambios presentados en Brn-3b también se localizan en la región POU del dominio de unión, la misma región en donde se encontraron los cambios para Brn-3a. En la figura 21 se observan algunos ejemplos de los polimorfismos encontrados en Brn-3b.

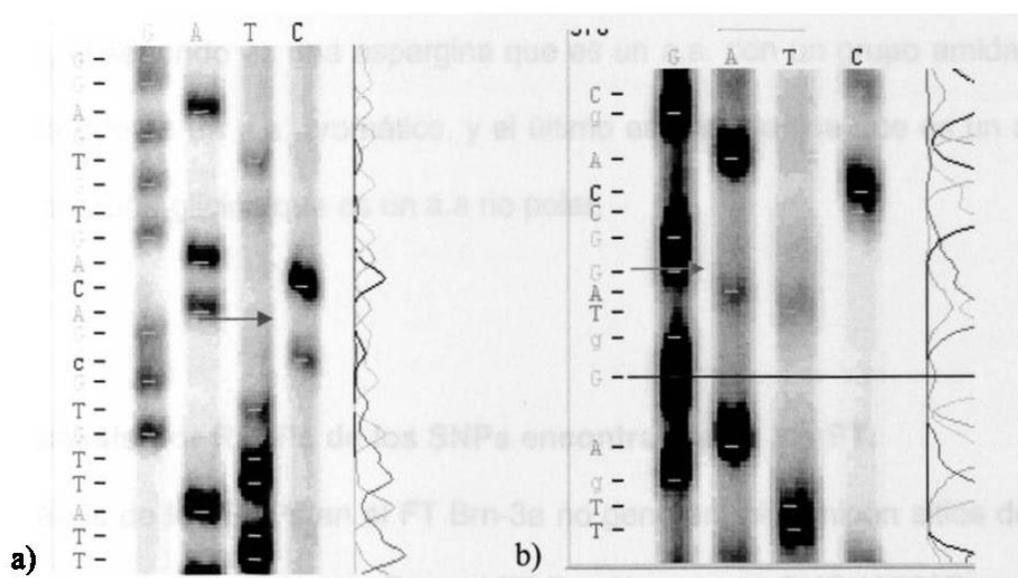


Figura 21.- Geles de secuenciación de Brn-3b donde se muestran polimorfismos. a) El cambio presentado en esta muestra fue de una G por C con el oligonucleótido Brn-3a2R (señalado por una flecha), al realizar el cambio reverso-complementario el polimorfismo es C929G. b) El cambio presentado en esta muestra fue una A por T con el oligonucleótido Brn-3a2R (señalado por una flecha), al realizar el cambio reverso-complementario el polimorfismo es A858T.

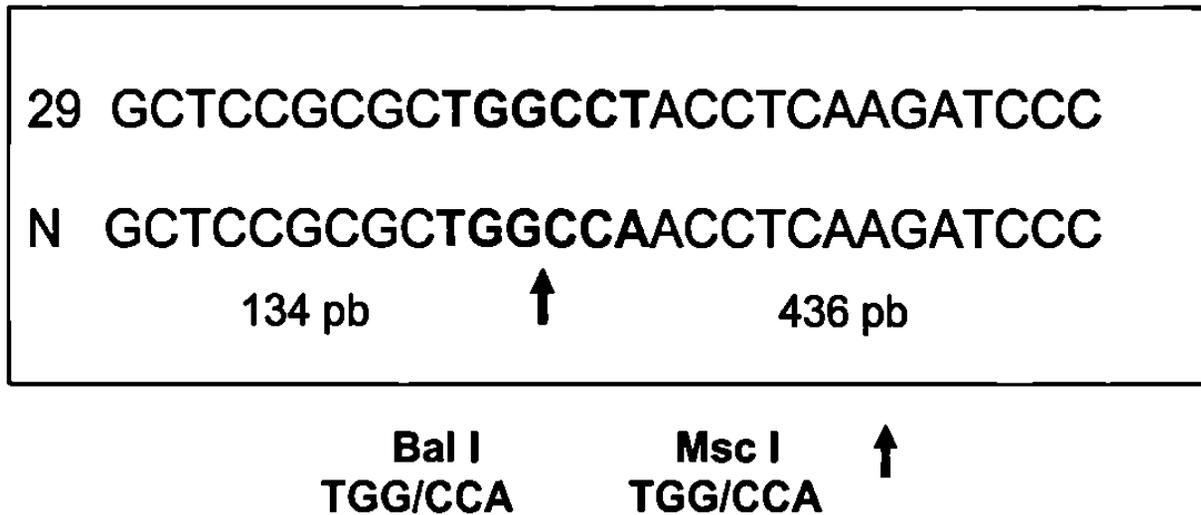
### **5.6 Cambios bioquímicos generados por los SNPs en las proteínas.**

Los SNPs encontrados en el FT Bm-3a dan como resultado cuatro cambios aminoaciditos (T286A, Q287R, N296Y, C260S) y un cambio silencioso (V285V). El primero es una treonina que es un a.a polar por una alanina que es un a.a no polar, el segundo es una glutamina de carga neutra por una arginina de carga positiva, el tercero es una aspargina que es un a.a. con un grupo amida por la tirosina que es una a.a. aromático, el cuarto es una cisteina que es un a.a. con un grupo de azufre por una serina que es un a.a. con un grupo hidroxilo, y el último que no genera cambio a.a. por lo que no genera ningún cambio bioquímico.

Los SNPs encontrados en el FT Bm-3b dan como resultado un cambio silencioso (S309S) y dos cambios aminoaciditos (N286Y, A254G). El primero no genera cambio bioquímico en la proteína, debido a que es una serina por serina, el segundo es una aspargina que es un a.a. con un grupo amida por la tirosina que es un a.a. aromático, y el último es una alanina que es un a.a. no polar por una glicina que es un a.a no polar.

### **5.7 Análisis por RFLPs de los SNPs encontrados en los FT.**

El análisis de los SNPs en el FT Bm-3a no generan, ni eliminan sitios de corte para enzimas de restricción. Para el FT Bm-3b, solo un SNP (A858T) ocasiona que se pierda el sitio de corte con las enzimas de restricción Bal I y MscI (ver figura 22).



**Figura 22.- Análisis por enzimas de restricción para el polimorfismo A858T.** Las enzimas Bal I y Msc I cortan la secuencia normal (N) del dominio amplificado del FT Bm3B en el sitio TGG/CCA, dando dos bandas de 134 pb y 436 pb. La secuencia con el polimorfismo (29) pierde el sitio del corte por lo que en un gel de agarosa se observara una sola banda de 570 pb.

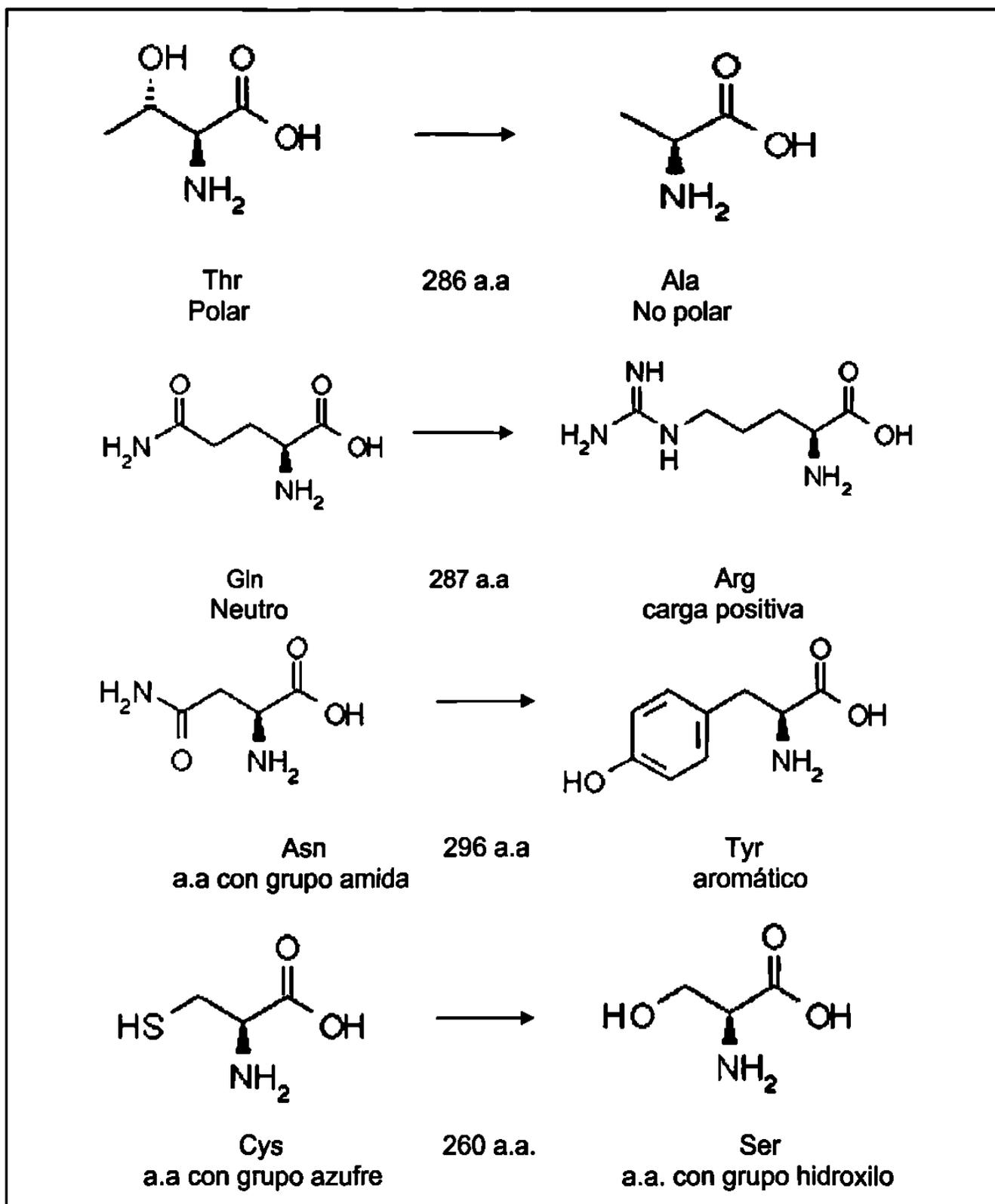
## **CAPÍTULO VI**

### **DISCUSIÓN**

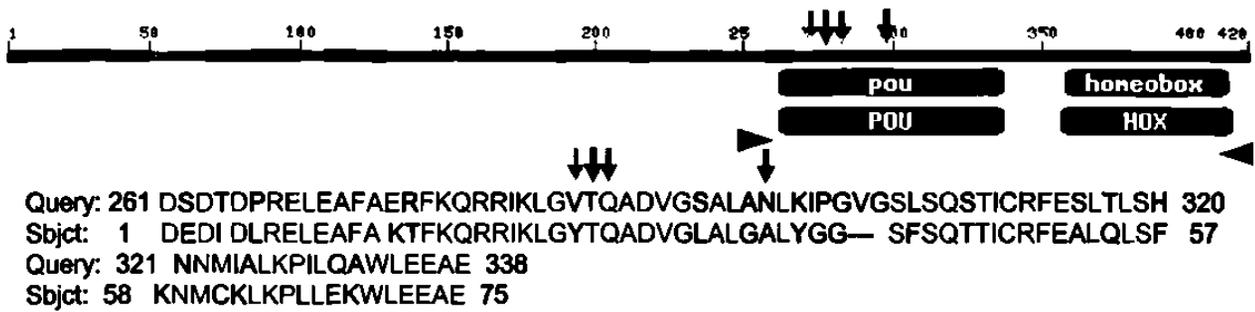
Existen numerosos estudios sobre la expresión y regulación de los FT Brn-3a y Brn-3b en diversos cánceres: como el aumento de 300 veces el FT Brn-3a en pacientes con NIC III, comparándolas con mujeres sanas (42), o que en tumores mamarios los niveles reducidos de BRCA-1 muestran una expresión aumentada de Brn-3b, lo cual sugiere un posible rol de este FT en la regulación de la expresión de BRCA-1 (65) y de la expresión aumentada de Brn-3a en tumores neuroendocrinos agresivos, pudiendo ser los responsables de la proliferación de las células malignas (66). Pero no existe ningún estudio hasta ahora sobre la presencia de SNPs en los dominios de los FT, los cuales podrían alterar la afinidad de los FT al sitio de unión al DNA, provocando una alteración en la expresión de los genes celulares y virales que regulan estos factores. Particularmente en el CaCU estos cambios podrían provocar un cambio en la afinidad entre los factores y la región LCR del VPH, potenciando la expresión de E6 y E7, produciendo una desregulación del ciclo celular y desencadenando la transformación maligna. Por otro lado, estos cambios en la afinidad podrían disminuir la unión de éstos a la región LCR, pudiendo provocar que la expresión de E6 y E7 también disminuya, explicando porqué algunos huéspedes infectados con VPH nunca desencadenarán CaCU.

Al amplificar los dominios de unión al DNA de los FT, treinta de las muestras no amplificaron para Brn-3a, esto puede deberse a que la expresión del FT esta muy baja en las personas sanas en comparación de una enferma (Daniel Ndisang et al. 1998), ya que el mismo DNAC se utilizó para amplificar el FT Brn-3b, el cual si pudo detectarse por esta metodología. Al realizar la RT-PCR para los FT Brn-3a y Brn-3b se detectaron bandas de corrimiento electroforetico de menor tamaño al esperado, pero al hacer las reacciones para la secuenciación el tamaño de las bandas y las secuencias fueron normales, por lo que las bandas obtenidas de menor tamaño eran artificios de la RT-PCR.

Los cambios encontrados en el FT Brn-3a dan como resultados cambios aminoacídicos. Aunque solo un polimorfismo se repite en dos muestras (N296Y), la mayoría ocurren en la región amino terminal del dominio POU, región muy importante para la unión FT-DNA. Además, la mayoría de estos cambios no sinónimos probablemente cambie las propiedades físico-químicas, la estructura y función de la proteína (Figura 23). Estos SNPs podrían generar un cambio en la afinidad de el FT con sus sitios de unión al DNA, provocando una mayor expresión o represión del gen que están regulando, provocando alteraciones en la vía en la cual el gen participa y en conjunto con algún otro factor alterado podrían generar una patología. Solo un cambio a.a. cae fuera del sitio POU (Q287R), por lo que posiblemente esta mutación no genere un cambio relevante en la afinidad del FT con el sitio de unión al DNA, no alterándose así la expresión de los genes que este regulando el FT (Figura 24).



**Figura 23.- Cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones con cambio de sentido en Brn-3a.** Como pueden observarse todas las mutaciones ilustradas producen un cambio de a.a por otro de propiedades físico-químicas diferentes.



**BRN-3A:** Val 285Val, Thr286Ala, Glu287Arg, Asp296Tyr, Cys260Ser

**Figura 24.- Esquema tridimensional del FT Brn-3a.** El FT Brn-3a tiene aproximadamente 420 a.a. del cual se analizó la región del homodominio (formado por la región POU y el homeobox) que corresponde del 261 al 420 a.a. Los cinco cambios encontrados en la proteína se señalan con flechas tanto en el dibujo de la proteína, como en la secuencia del dominio POU en la parte de abajo.

Por otra parte el polimorfismo más común encontrado en Brn-3b (C929G: cinco muestras) no generan cambios aminoacídicos (S309S), por lo que no tendrá ningún efecto en la afinidad del FT con su sitio de unión al DNA, no alterándose la expresión del gen que esta regulando.

Solo dos muestras presentaron cambio aminoacídico en el FT Brn-3b, los cuales ocurren en la región amino terminal del dominio POU, curiosamente en la misma región que presenta cambios el FT Brn-3a (Figura 25). Estos polimorfismos también podrían generar un cambio en la afinidad del FT con sus sitios de unión al DNA, provocando una desregulación del gen que esta controlando y alterando la vía en la cual el gen participa.

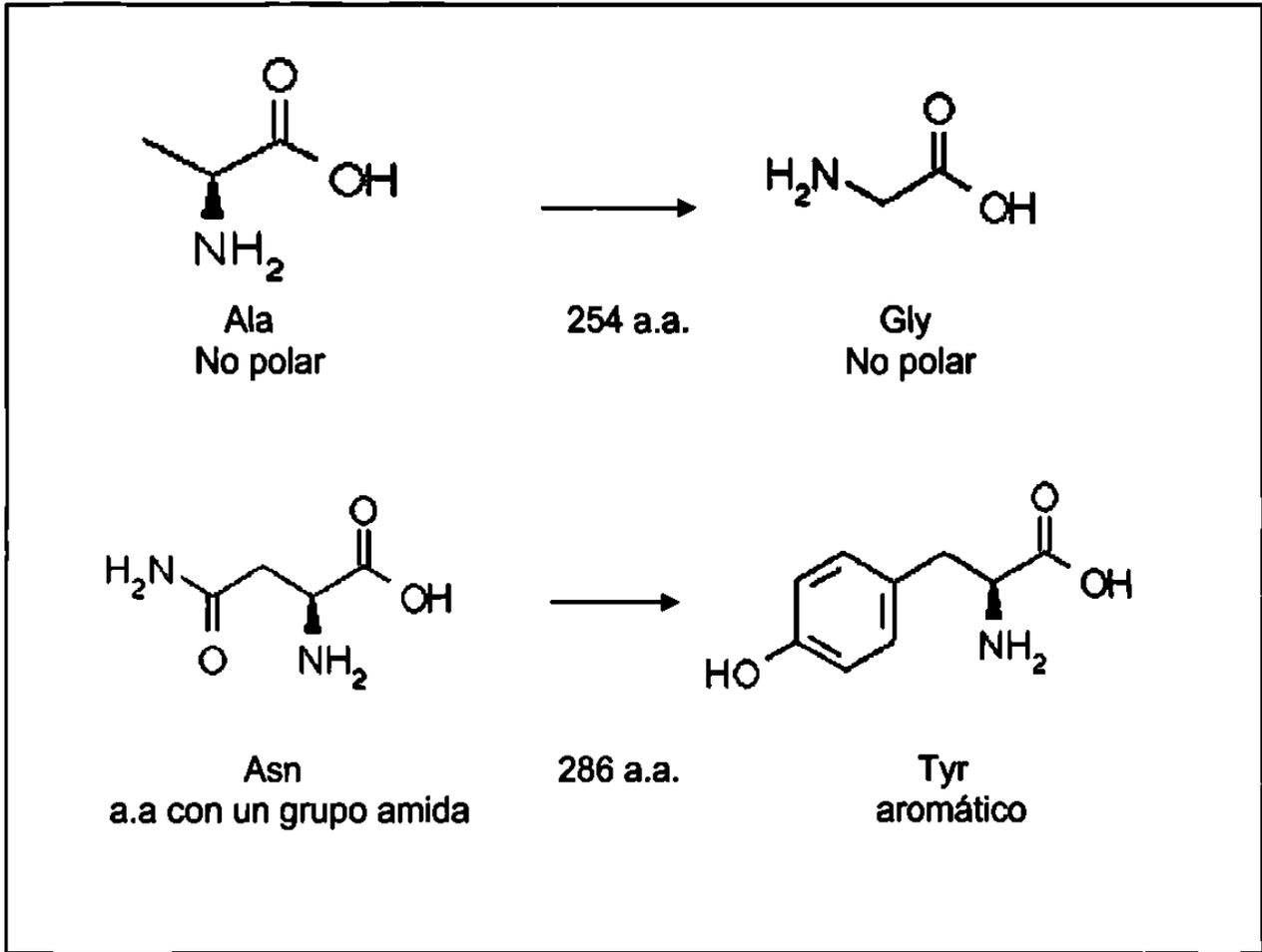
Una de estas dos muestras tubo un cambio en el aminoácido N286Y para el FT Brn-3b. Esta mutación genera un cambio de a.a. que alteraría las propiedades fisico-químicas del factor y lo convierte en un candidato muy serio para buscarlo en algunas patologías neoplásicas (Figura 26).



**Brn-3b:** Ser309Ser, Asn286Tyr, Ala254Gly

**Figura 25.- Esquema tridimensional del FT Brn-3b.** El FT Brn-3b tiene aproximadamente 415 a.a. del cual se analizo la región del homodominio (formado por la región POU y el homeobox) que corresponde del 250 al 415 a.a. Los tres cambios encontrados en la proteína se señalan con flechas tanto en el dibujo de la proteína, como en la secuencia del dominio POU en la parte de abajo.

Los SNPs encontrados en Brn-3a y Brn-3b en mujeres sanas podrían buscarse en pacientes de manera más directa y más fácil utilizando RFLPs. Aunque solo un polimorfismo podría analizarse por enzimas de restricción, para los demás se podrían diseñar oligonucleótidos que creen sitios de restricción y así poder analizarlos.



**Figura 26.- Cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones con cambio de sentido en Brn-3b.** Como pueden observarse las dos mutaciones ilustradas producen un cambio de a.a por otro. Sin embargo el cambio mas importante es el Asn286Tyr el cual provoca un cambio de a.a. de propiedades fisico-químicas diferentes.

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en el presente trabajo, permite concluir lo siguiente:

- Si existen polimorfismos en los FT Brn-3a y Brn-3b.
- En el 30% de las muestras no se detectó Brn-3a.
- En el dominio de unión del FT Brn-3a, se encontraron 5 polimorfismos, de los cuales 4 predicen cambio a.a.
- La frecuencia polimórfica encontrada en el dominio de unión de Brn-3a fue del 5.7%.
- En el dominio de unión del FT Brn-3b, se encontraron 7 polimorfismos, de los cuales solo 2 predicen cambio a.a.
- La frecuencia polimórfica encontrada en el dominio de unión de Brn-3b fue del 7%.
- El único polimorfismo analizable con enzimas de restricción (Ball y MscI) es el A858T (Asn286Tyr).
- La mayoría de los polimorfismos en Brn-3a y Brn-3b se localizan en el dominio POU.

## CAPÍTULO VIII

### PERSPECTIVAS

- ❖ Hacer un estudio de casos (CaCU, tumores neuroendocrinos y tumores mamarios) y controles (sanas) para comparar las frecuencias de polimorfismos de factores Brn.
  
- ❖ Medir la expresión de Brn-3a y Brn-3b en tejidos con CaCU, tumores neuroendocrinos, etc.
  
- ❖ Estudiar las interacciones de las proteínas Brn polimórficas con la región LCR del VPH de alto riesgo.
  
- ❖ Hacer un estudio *in vitro* e *in vivo* del posible efecto terapéutico de los FT Brn-3a y Brn-3b.

## CAPÍTULO IX

### BIBLIOGRAFÍA

1. López-Ríos O, Lazcano-Ponce EC, Tovar-Guzmán V, Hernández-Avila M. La epidemia de cáncer de mama en México ¿Consecuencia de la transición demográfica?. Salud Pública de México. 1997 Vol. 39(4): 1-7.
2. Cancer Statistics (1998). A Journal of the American Cancer Society.
3. <http://www.iladiba.com.co/upr/2001/no012001/htm/cancer.asp>
4. Departamento de Estadística e Informática del INEGI (1997) Secretaria de Salud en Nuevo León.
5. Mohar A, Frias M, Suchil L. Epidemiología descriptiva del cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. Salud Pública de México, 1997; Vol. 39(4):253-258.
6. Stern Peter L. and Stanley Margaret A. (1994). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. Biology and Immunology. Chapte 4, 72-87.
7. Schneider A. and Koutsky L. (1992). Epidemiology of Cervical Cancer and of HPV infection. In Epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer (eds. N. Muñoz, F. X. Bosch, K. V. Shah and A. Meheus), Vol 119, pp.3-53. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
8. Helland A, Olsen AO, Gjoen K, Akselsen HE, Sauer T, Mangus, Borresen-Dale AL, Ronningen KS. An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II-III among human papillomavirus positive patients with the HLA-DQA\*0102-DQB1\*0602 haplotype: a population-based case-control study of Norwegian. Int J Cancer 1998 Mar 30; 76 (1): 19-24.

9. Kari Syrjanen and Stina Syrjanen. Papillomavirus Infections in human pathology. John wiley & sons, LTD 2000; 12- 51pag.
10. Alan Storey, Miranda Thomas, Ann Kalita et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer Nature May 1998; 393.
11. Klaes R, Ridder R, Schaefer U, Benner A, Von Knebel Doeberitz M. No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus associated cervical cáncer. J Mol Med; 77:299-302. 1999.
12. Wang NM, Tsai CH, Yeh KT, Chen SJ, Chang JG. P53 codon 72 Arg polymorphism is not a risk factor for carcinogenesis in the chinese. Int J Mol Med; 4: 249-52. 1999
13. Prokopakis P, Sourvinos G, Koumantaki Y, Koumantakis E, Spandidos DA. K-ras mutations and HPV infection in cervicitis and intraepithelial neoplasias of cervix. Oncol Rep. 2002 Jan-Feb;9(1):129-33.
14. Stenzel A, Semczuk A, Rozynskal K, Jakowicki J, Wojcierowski J. Low – risk and high-risk HPV- infection and K-ras gene point mutations in human cervical cancer: a study of 31 cases. Pathol Res Pract. 2001; 197 (9):597-603.
15. Alonio LV, Dalbert D, Picconi MA, Cervantes Vazquez G, Garcia Carranca A, Distefano AL, Mural J, Bartt O, Bazan G, Teyssie AR. Ha-ras and p53 gene mutations scanned by PCR-SSCP in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix associated with human papillomavirus. Medicina (B Aires). 2000; 60 (6) : 895-901.

16. Li X, Jiao S, Mi R. Clinical significance of p21H-ras expression and H-ras codon 12 mutation in squamous intraepithelial lesion and carcinoma of uterine cervix. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 1997 Jul; 19 (4) : 306-8.
17. Q.C.B, M.C. Sandra Guadalupe Martínez Garza. 2002. Análisis Molecular de los Factores Extrínsecos e Intrínsecos asociados a Cáncer Cérvico-Uterino. Tesis Doctoral.
18. Boring CC, Squires TS, Tong T y Montgomery S. *Cancer Statistics, 1994*. *CA Cancer J Clin* 44:7-26.
19. Cho KR. (1998). Cervical Cancer. In *The Genetic Basis of Human Cancer*. (eds. Vogelstein B, Kinzler KW). Pp.631-637.
20. Krebs HB. (1994). Lesiones premalignas del cuello uterino. En *Ginecología* (eds. Copeland LJ, Jamell JF). Pp.932-60.
21. Harald Sur Hausen. 1991. Viruses in Human Cancers. *Science* 254, 1167-1173.
22. Greg Matlashewski. 1989. The Cell Biology of Human Papillomavirus Transformed Cells. *Anticancer Research* 9: 1447-1556.
23. Sailaja G, Watts RM, Bernard HU. Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancer. *J Gen Virol* 199;80:1715-1724.
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>
25. <http://life.anu.edu.au/viruses//ctv/vf-fst-g.htm>.
26. Demeret, C., Le Moal, M. Thierry, F. Control of HPV18 replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Research* 23, 4777-4784.
27. VPH Home Page. Laboratorio de Terapia Génética. Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV.

<http://cinvestav.mx/genetica/MyFiles/Papillomavirus/PAPindex.htm>. México, D.F., Septiembre,2002.

28. Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol*. 1988 Nov; 62 (11):4321-30.
29. Cripe TP, Alderborn A, Anderson RD, Parkkinen S, Bergman P, Haugen TH, Pettersson U, Turek LP. Transcriptional activation of the human papillomavirus 16 P97 promoter by an 88 nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1 responsive modules. *New Biol*. 1990 May;2(5):450-63.
30. Gius D, Grossman S, Bedell MA, Laimins LA. Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J. Virol*. 1988 Mar; 62(3):665-72.
31. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, et al. Identification of negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: Interaction with the transcription with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J* 1992;11:4607-4617.
32. Butz K, Hoppe-Seyler F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: Composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol* 1993;67:6476-6486.
33. Chong T, Apt D, Gloss B, et al. The enhancer of human papillomavirus type 16: Binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, AND AP-1 Participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* 1991; 65:5933-5943.
34. Chong T, Chan WK, Bernard HU. Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP-1, steroid receptors and a possibly

- novel transcription factor, PVF: A model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:465-470.
35. Hoppe-Seyler F, Butz K, zur Hausen H. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol* 1991;65:5613-5618.
36. O'Connor M, Bernard HU. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* 1995;207:77-88.
37. Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, et al. Two AP1 sites binding JunB are essential for HPV18 transcription in keratinocytes. *J Virol* 1992;66:3740-3748.
38. Benjamin Lewin, *Genes VII*, Oxford University Press Inc., New York, First published 2000, pag:649-678.
39. William S. Klug and Michael R. Cummings, *Conceptos de genética*, Prentice Hall Iberia, S.R.L. Télec, Madrid, Quinta edición 1999, pag:573-582.
40. [www.usask.ca/biology/biol316/316questions/regln.html](http://www.usask.ca/biology/biol316/316questions/regln.html)
41. [www.icm.edu.pl/propublico/piekno/modelowanie\\_czasteczek.htm](http://www.icm.edu.pl/propublico/piekno/modelowanie_czasteczek.htm)
42. Ndisang D, Morris PJ, Chapman C, Ho L, Singer A, Latchman DS. The HPV-activating cellular transcription factor Brn-3a is overexpressed in CIN3cervical lesions. *J Clin Invest*. 1998 Apr 15;101(8):1687-92
43. Morris PJ, Dawson SJ, Wilson MC, Latchman DS. A single residue within the homeodomain of the Brn-3 POU family transcription factors determines

whether they activate or repress the SNAP-25 promoter. *Neuroreport* May 1997 27;8(8):2041-5.

44. Vishwanie Budhram- Mahadeo, Peter J. Morris, Martin D. Smith, Carol A. Midgley, Linda M. Boxer, and David S. Latchman. P53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *Journal of biological Chemistry*, May 1999; vol 274:15237-15244.
45. David Strubin M et al. Eucariotic transcription factor. *Cell* 1995;80:497.
46. Gary J. Sibbet, Scott Cuthill, and M. Saveria Campo. The enhancer in the long region of human papillomavirus type 16 is regulated by PEF-1 and down-regulated by Oct-1. *Journal of Virology* July 1995;4006-4011.
47. Usheva, A. and Shenk, T. (1994). TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* 76(6): 1115-1121. Medline abstract
48. Tobias Bauknecht, Franziska Jundt, Ingrid Herr, Thomas Oehler, Hajo Delius, Yang Shi, Peter Angel, and Harald zur Hausen. A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *Journal of Virology*, Jan 1995; 1-12.
49. Dong XP, Stubenrauch, Beyer-Finkler E, Pfister H. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer*, Sep 1994;15;58(6):803-8.
50. JIANPING YE, Marco Cippitelli, Linda Dorman, John R. Orlando, and Howard A. Young. The nuclear factor YY1 suppresses the human gamma interferon promoter through two mechanisms: inhibition of AP1 binding and activation of a silencer element. *Molecular and Cellular Biology*, Sept. 1996;4744-4753.
51. Riggs KJ, Saleque S, Wong KK, Merrell KT, Lee JS, Shi Y, Calame K. Yin-yang 1 activates the c-myc promoter. *Mol Cell Biol*. Dec. 1993;13(12):7487-95.

52. **Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS et al (1999). Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 400:464-468.**
53. **Wang DG, Fan JB, Siao CJ et al (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077-1082.**
54. **<http://snp.cshl.org/>**
55. **Brookes AJ The essence of SNPs. *Gene*, 1999; 234: 177-186.**
56. **The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2001, 409: 928-933.**
57. **[http://www.fbsmres.leeds.ac.uk/users/bgyijid/ijid\\_topic.htm](http://www.fbsmres.leeds.ac.uk/users/bgyijid/ijid_topic.htm)**
58. **Hishinuma A, Ohyama Y, Kuribayashi T, Nagakubo N, Namatame T, Shibayama K, Arisaka O, Matsuura N, Ieiri T. Polymorphism of the polyalanine tract of thyroid transcription factor-2 gene in patients with thyroid dysgenesis. *Eur J Endocrinol*. 2001 Oct;145(4):385-9.**
59. **Macchia PE. Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism. *Mol Med Today*. 2000 Jan;6(1):36-42.**
60. **Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di Lauro R. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie*. 1999 May;81(5):433-40.**
61. **Hishinuma A, Kuribayashi T, Kanno Y, Onigata K, Nagashima K, Ieiri T. Sequence analysis of thyroid transcription factor-1 gene reveals absence of mutations in patients with thyroid dysgenesis but presence of polymorphisms in the 5' flanking region and intron. *Endocr J*. 1998 Aug;45(4):563-7.**
62. **Hishinuma A, Kuribayashi T, Kanno Y, Onigata K, Nagashima K, Ieiri T. Sequence analysis of thyroid transcription factor-1 gene reveals absence of mutations in patients with thyroid dysgenesis but presence of polymorphisms in the 5' flanking region and intron. *Endocr J* 1998 Aug;45(4):563-7.**

63. Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W; British Paediatric Rheumatology Study Group. A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2001 Aug;44(8):1782-5.
64. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
65. Budhram-Mahadeo V, Ndisang D, Ward T, Weber BL, Latchman DS. The Bm-3b POU family transcription factor represses expression of the BRCA-1 anti-oncogene in breast cancer cells. *Oncogene*. 1999 Nov 18;18(48):6684-91.
66. Leblond-Francillard M, Picon A, Bertagna X, de Keyser Y. High expression of the POU factor Bm3a in aggressive neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jan;82(1):89-94.