4.2.5.1B Verificación de los productos amplificados

Cinco µl del producto amplificado más 1 µl de jugo azúl 6X se sometieron a electroforesis junto con un marcador de peso molecular adecuado (pUC18 digerido con *Alu* I) para verificar el tamaño de las bandas obtenidas. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X. La electroforesis se realizó a 80 V al principio hasta que entró la muestra y luego a 110V por alrededor de 1 hora (dejando correr el azul de bromofenol tres cuartas partes del gel). Después de la corrida se procedió a teñir el gel en bromuro de etidio (2 µg/ml) por un tiempo de 5 min y se enjuago con agua corriente, después se observó en el Gel Doc a través del software Molecular Analyst.

4.2.5.1C Hibridación y detección de los HPVs

A 50 µl de producto amplificado se le adicionaron 25 µl de una solución desnaturalizante que contiene NaOH. Se dejó actuar por lo menos 5 min, mientras, se marcó la tira con la clave del paciente y se depositó en la charola donde se llevó a cabo la hibridación. Se prepararon las soluciones de hibridación (4X SSPE, 0.1% SDS) y lavado (1X SSPE, 0.1% SDS) y se calentaron a 53°C. A cada tira se le agregó 3ml de la solución de hibridación caliente, así como 70 µl de la mezcla del producto amplificado en la solución desnaturalizante. Se incubaron en un baño a 53°C a 70 rpm por 30 min. Transcurrido el tiempo se eliminó la solución de hibridación por aspiración con un sistema de vacío y se agregaron 3 ml de solución de lavado (temperatura ambiente) e inmediatamente se eliminó. Se agregaron 3 ml de solución de lavado caliente y se incubaron en el baño por 15 min. Mientras este tiempo transcurría se preparó la solución del conjugado (SA-HRP).

Una vez que pasó este tiempo, se eliminó la solución de lavado y se agregó el conjugado dejándolo a 70 rpm a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se realizaron 2 lavados en agitación con solución de lavado a temperatura ambiente por 10 min. Al término de éstos, se agregaron 3 ml de buffer de citratos y se dejó en reposo mientras se preparó la solución de color (Sustrato A + Sustrato B). Se eliminó el buffer de citratos y se agregaron 3 ml de solución de color y se incubaron en agitación a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente las tiras se enjuagaron con agua, se almacenaron en buffer de citratos por espacio de 10 min, se eliminó el exceso y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se identificó el tipo de HPV utilizando la plantilla que viene en el estuche.

4.2.5.2 Determinación de la integración del HPV tipo 16

La integración del HPV al genoma del huésped se realizó de una manera indirecta, basándonos en que los HPVs requieren de una ruptura en los genes E1 y/o E2 para linearizarse y poderse integrar. Para esta determinación se amplificaron por separado ambos genes y la ausencia de amplificación nos determinó la ruptura del gen, por lo que se asume que el virus está integrado. Esta técnica es precisa cuando no hay amplificación, pues nos indica que el virus está integrado por completo, pero cuando existe la presencia de una banda de amplificación, no podemos asegurar que todo el virus está en forma episomal, puesto que la banda obtenida por virus circulante nos enmascara la no amplificación (figura 11).

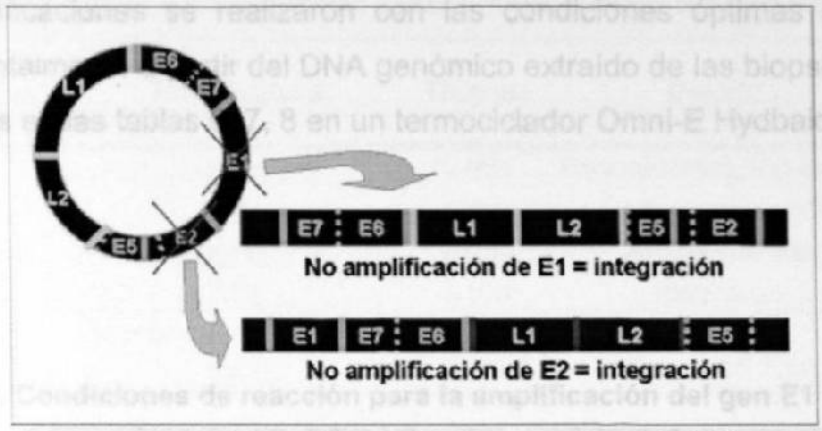

Figura 11. Diagrama de detección de la integración del HPV. Se amplifican los genes E1 y E2 en reacciones por separado y la no amplificación determina la integración del virus.

4.2.5.2A Amplificación del gen E1 y E2

Para este apartado se seleccionaron las muestras que fueron positivas para HPV-16, mediante la técnica descrita en el apartado 4.2.5.1. Las amplificaciones de los genes E1 y E2 se realizaron por separado y para las reacciones se utilizaron los oligos descritos por Berumen[45], en el caso de la reacción del gen E2 se coamplificó el gen E6 del HPV y los oligos utilizados fueron descritos anteriormente por Tyan y cols.[85], estos fueron los siguientes:

E1-1	5´ taa tct acc atg gct gat cc 3´
E1-2	5´ acg ttg gca aag agt ctc ca 3´
E2-1	5´ tgg aca ctc ttt gcc aac gt 3´
E2-2	5´ ggt cac gtt gcc att cac ta 3´
E6-1	5´ caa tgt ttc agg acc cac agg 3´
E6-2	5´ gca aca aga cat aca tcg acc g 3´

Las amplificaciones se realizaron con las condiciones óptimas encontradas experimentalmente a partir del DNA genómico extraído de las biopsias de cérvix y descritas en las tablas 6, 7, 8 en un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 6. Condiciones de reacción para la amplificación del gen E1 de HPV-16

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
E1-1 (5 µM)	4	1 µM
E1-2 (5 µM)	4	1 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	1.6	2 mM
dNTPs (10 mM)	0.75	0.375 mM
Agua	5.85	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.3	0.075 U/µl
DNA	1.5	(100ng/µl)
Vol. Total	20	-

Tabla 7. Condiciones de reacción para la amplificación del gen E2 de HPV-16

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
E2-1 (5 µM)	4	1 µM
E2-2 (5 µM)	4	1 µM
E6-1 (5 µM)	2	0.5 µM
E6-2 (5 µM)	2	0.5 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	1.6	2 mM
dNTPs (10 mM)	0.75	0.375 mM
Agua	1.85	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.3	0.075 U/µl
DNA	1.5	(100ng/µl)
Vol. Total	20	-

Tabla 8. Condiciones del programa para la amplificación del gen E2 de HPV-16

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min	Desnaturalización
3	55°C	2 min	Apareamiento
4	72°C	3 min	Extensión
5	Repetir desde el paso 2,	40 veces	
6	72°C	10 min	Extensión final

4.2.5.2B Verificación de los productos amplificados

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue lambda digerido con *Pst* I.

4.2.5.3 Determinación del número de copias virales del HPV tipo 16

Para este apartado se seleccionaron las muestras que fueron positivas para HPV-16, mediante la técnica descrita en el apartado 4.2.5.1. La determinación del número de copias virales se realizó de una manera semicuantitativa. Se utilizó el plásmido psv2-E6, el cual contiene el gen E6 de HPV-16. A partir de este plásmido se realizaron diluciones hasta obtener un rango de 1copia del plásmido hasta 10,000 copias. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el número de copias y se amplificó por medio de la PCR.

$$\#\text{cél(copias)} = \frac{(\text{DNA ng})\,(\text{No. de Avogadro})}{(1\text{ pb})\,(\text{tamaño DNA pb})}$$

No. de Avogadro = 6.023×10^{23}

1pb = 660×10^{9} ng

Tamaño psv2-E6 = 4,810 pb

4.2.5.3A Amplificación del gen E6 para determinar número de copias

La amplificación se realizó con las condiciones óptimas encontradas experimentalmente (sin llegar a la fase de meseta de la PCR) a partir del DNA genómico extraído de las biopsias de cérvix y descritas en las tablas 9, 10 en *un termociclador Omni-E Hydbaid y usando los oligos descritos anteriormente* en el apartado 4.2.5.2A Se realizaron 2 PCR utilizando 10 y 100 ng de DNA genómico (1,666 y 16,666 células, respectivamente) para cada una de las muestras.

Tabla 9. Condiciones de la reacción para la amplificación del gen E6 de HPV-16

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
E6-1 (5 µM)	4	1 µM
E6-2 (5 µM)	4	1 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	1.75	2.187 mM
dNTPs (10 mM)	1.25	0.625 mM
Agua	5	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.5	0.125 U/µl
DNA	1.5	(10 y 100 ng/µl)
Vol. Total	20	-

Tabla 10. Condiciones del programa para la amplificación del gen E6 de HPV-16

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	30 seg	Desnaturalización
3	50°C	30 seg	Apareamiento
4	72°C	30 seg	Extensión
5	Repetir desde el paso 2,	27 veces	
6	72°C	30 seg	Extensión final

4.2.5.3B Verificación de los productos amplificados

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1 y el marcador de peso molecular utilizado fue pBS digerido con *Hae* III.

4.2.5.3C Semicuantificación del no. de copias de HPV-16

El *análisis* de los geles se realizó generando imágenes digitalizadas con el equipo Gel Doc utilizando una integración entre 2 y 4 segundos, dependiendo de los resultados electroforéticos obtenidos para evitar una saturación. Con el software Molecular Analyst, se calculó las cc/mm de cada una de las bandas de las diluciones y de las muestras. Posteriormente haciendo uso del procesador de gráficos Microsoft Excel, se realizó una curva de calibración y se calculó el número de copias de cada una de las muestras, utilizando la ecuación dada por la curva de calibración.

4.2.6 ANÁLISIS DE FACTORES INTRÍNSECOS (HLA, p53 Y ONCOGENES RAS)

4.2.6.1 Determinación de los alelos HLA-DQA

La tipificación del gen HLA-DQA se realizó con el estuche comercial "The AmpliType HLA DQα1 PCR Amplification and Typing Kit" de Perkin Elmer que contiene los iniciadores GH26 y GH27[86] que incluyen biotina y que amplifican un fragmento de 242 ó 238 pb.

GH26	5´ gtg tgc cag gtg taa act tgt acc ag 3´
GH27	5´ cac gga tcc ggt agc agc ggt aga gtt g 3´

4.2.6.1A Amplificación de HLA-DQA

Se siguieron las instrucciones de la casa comercial para las condiciones de amplificación y se describen en las tablas 11, 12. Las amplificaciones se realizaron a partir del DNA genómico extraído de sangre y en un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 11. Condiciones de Reacción para la amplificación de HLA-DQA

Reactivo	Volumen (µl)
Mezcla de reacción	20
Mezcla de oligos	20
DNA (2-10ng)	10
Vol. Total	50

Tabla 12. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DQA

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	1 min	Desnaturalización
2	60°C	30 seg	Apareamiento
3	72°C	30 seg	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	32 veces	
5	72°C	7 min	Extensión final

4.2.6.1B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pBS digerido con *Hae* III.

4.2.6.1C Tipificación de los alelos HLA-DQA por hibridación reversa en mancha

Los productos amplificados obtenidos fueron tipificados realizando una hibridación reversa en mancha con sondas oligo-alelo específicas inmovilizadas

en membranas de nitrocelulosa para 6 alelos de DQA, para lo que se siguió el siguiente procedimiento:

Primeramente, se les adicionó 2.5 ml de EDTA 200mM a cada uno de los productos amplificados y se desnaturalizaron los productos amplificados biotinilados a 95°C por espacio de 5 min en un termociclador. Se colocaron 35 µl de cada producto amplificado en una charola de tipificación junto con 3 ml de solución de hibridación (5X SSPE, 0.5% SDS) y conjugado enzimático estreptovidina-peroxidasa. La hibridación se llevó a cabo a 55°C y con agitación constante de 50 rpm por 30 min. Transcurrido el tiempo de hibridación, se realizaron 2 lavados (2.5X SSPE, 0.1%), uno a temperatura ambiente y otro a 55°C a 50 rpm por 12 min. Se retiró la solución y nuevamente se lavaron las membranas a temperatura ambiente por algunos segundos. Se eliminó la solución y se agregó a cada tira, buffer de citratos (Citrato de sodio 0.1M) pH=5, se agitó a temperatura ambiente por 5 min a 50 rpm. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución y se agregaron 3 ml de la solución de desarrollo de color conteniendo el cromógeno TMB y peróxido de hidrógeno. La charola se cubrió con papel aluminio y se agitó a 50 rpm en un agitador orbital a temperatura ambiente hasta observar un precipitado azul (5 a 10 min). Se retiró la solución, se agregó agua destilada para detener la reacción y se agitó por 5 min a 50 rpm, se repitió este último paso una vez más. Se retiró el agua y se dejaron secar las membranas. La tipificación se realizó siguiendo las instrucciones del estuche comercial.

4.2.6.2 Determinación de los alelos HLA-DQB

Para determinar los alelos de HLA-DQB se usaron los 27 oligos específicos descritos por Olerup y cols. [87] (tabla 13) y un par de oligos para amplificar una

porción del gen DRB1 como control interno. La amplificación es indicativa de la presencia del alelo correspondiente a la PCR amplificada.

Tabla 13. Secuencia de primers usados para determinar los alelos HLA-DQB

Primer	Secuencia
B5-01	5´ cgg agc gcg tgc ggg g 3´
B5-02	5´ tgc ggg gtg tga cca gac 3´
B5-03	5´ gcc atg tgc tac ttc acc aat 3´
B5-04	5´ cgt gcg tct tgt gac cag at 3´
B5-05	5´ gga gcg cgt gcg tct tgt a 3´
B5-06	5´ cgt gta cca gtt taa ggg ca 3´
B5-07	5´ gtg cgt ctt gtg agc aga ag 3´
B5-08	5´ gac gga gcg cgt gcg tct 3´
B5-09	5´ gac gga gcg cgt gcg tta 3´
B5-10	5´ cac caa cgg gac cga gct 3´
B5-11	5´ cac caa cgg gac cga gcg 3´
B5-12	5´ gtg cgg ggt gtg acc aga t 3´
B5-13	5´ cgt gta cca gtt taa ggg cc 3´
B3-01	5´ gct gtt cca gta ctc ggc aa 3´
B3-02	5´ tgt tcc agt act cgg cgc t 3´
B3-03	5´ gcg gcg tca ccg ccc ga 3´
B3-04	5´ cag cgt gtc caa ctc cgc t 3´
B3-05	5´ gct gtt cca gta ctc ggc at 3´
B3-06	5´ gca gga tcc cgc ggt acc 3´
B3-07	5´ gca agg tcg tgc gga gct 3´
B3-08	5´ ctg ttc cag tac tcg gcg g 3´
B3-09	5´ agt act cgg cgt cag gcg 3´
B3-10	5´ ctg ttc cag tac tcg gcg t 3´
B3-11	5´ ggt agt tgt gtc tgc ata cg 3´
B3-12	5´ tgc aca ccc tgt cca ccg 3´
B3-13	5´ aac tcc gcc cgg gtc cc 3´
B3-14	5´ caa ctc cgc ccg ggt cct 3´
C5	5´ tgc caa gtg gag cac cca a 3´
C3	5´ gca tct tgc tct gtg cag at 3´

B5 y C5: oligos 5´ , **B3 y C3:** oligos 3´

4.2.6.2A Amplificación de HLA-DQB

Se realizaron 22 reacciones de PCR (tabla 16) por separado a partir del DNA extraído de sangre y con las condiciones óptimas encontradas experimentalmente (tabla 14 y 15). La temperatura de apareamiento fue modificada dependiendo del juego de oligos utilizados en la reacción y el termociclador usado fue un Omni-E Hydbaid.

Tabla 14. Condicones de reacción para la amplificación de HLA-DQB

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	1	1X
C5 (5 µM)	1	0.5 µM
C3 (5 µM)	1	0.5 µM
Oligo 5´ (5 µM)*	1	0.5 µM
Oligo 3´ (5 µM)*	1	0.5 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	0.4	1 mM
dNTPs (10 mM)	0.2	0.2 mM
Agua	2.6	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.3	0.15 U/µl
DNA	1.5	(100 ng/µl)
Vol. Total	10	-

*Los oligos varían de acuerdo a la PCR amplificada

Tabla 15. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DQB

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	20 seg	Desnaturalización
2	49°C* ó 50°C**	50 seg	Apareamiento
3	72°C	20 seg	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	30 veces	
5	72°C	5 min	Extensión final

*Temperatura para PCR 1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,14,16,17 y 19,20,21 y 22
**Temperatura para PCR 5,12,13,15 y 18

4.2.6.2B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pBS digerido con *Hae* III.

4.2.6.2C Identificación de los alelos HLA-DQB

Se utilizó la tabla 16 para discriminar los alelos en las muestras de acuerdo a la amplificación en cada uno de las PCRs:

Tabla 16. *PCRs utilizadas para la identificación de los alelos HLA-DQB*

PCR	Oligo 5´	Oligo 3´	pb	Alelos DQβ*
1	B5-01	B3-01	128	0501
2	B5-02	B3-02	117	0502
3	B5-02	B3-03	87	0503
4	B5-03	B3-04	198	0601
5	B5-04	B3-05	121	0602
6	B5-05	B3-05	127	0603, 0608
7	B5-06	B3-06	254	0604
8	B5-07	B3-07	205	0201
9	B5-08	B3-08	129	0201, 0302
10	B5-09	B3-09	122	0301, 0304
11	B5-08	B3-09	122	0302, 0303
12	B5-08	B3-10	129	0303
13	B5-10	B3-11	200	0401
14	B5-11	B3-11	200	0402
15	B5-12	B3-02	118	0504
16	B5-13	B3-06	254	0605
17	B5-05	B3-12	176	0606
18	B5-08	B3-13	165	0602, 0603, 0607
19	B5-05	B3-01	127	0604, 0605, 0606, 0607
20	B5-05	B3-14	163	0604, 0605, 0606, 0608
21	B5-09	B3-10	129	0601, 0301
22	B5-09	B3-08	129	0304

4.2.6.3 Determinación de los alelos HLA-DR3 y HLA DR4

La identificación de los alelos DR3 y DR4 se realizó con iniciadores específicos para cada uno en reacciones diferentes descritos por Olerup y cols.[88]. Cada reacción cuenta con un par de iniciadores adicionales para co-amplificar el gen de la β-globina con DR3 y el gen de fibrosis quística con DR4 como controles internos, la amplificación en cada una de las PCRs nos indican la presencia del alelo analizado, los iniciadores son los siguientes:

DR3

950927-49	5´ tac ttc cat aac cag gag gag a 3´
950927-50	5´ tgc agt tgt cca ccc g 3´
BG1	5´ caa ctt cat cca cgt tca cc 3´
BG2	5´ gaa gag cca agg aca ggt ac 3´

DR4

961106-99	5´ ctg cac tgt gaa gct ctc ca3´
961106-100	5´ ctg cac tgt gaa gct ctc ac 3´
961106-101	5´ gtt tct tgg agc agg tta aac a3´
CF1	5´ gtt ttc ctg gat tat gcc tgg cac3´
CF2	5´ gtt ggc atg ctt tga tga cgc ttc 3´

4.2.6.3A Amplificación de HLA-DR3 y HLA-DR4

La amplificación de HLA-DR3 y DR4 se realizó bajo condiciones óptimas de reacción descritas en las tablas 17, 18, 19 y 20. Estas reacciones se realizaron a partir del DNA extraído de sangre y usando un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 17. Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DR3

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	1.25	1X
950927-49 (5 µM)	1.25	0.5 µM
950927-50 (5 µM)	1.25	0.5 µM
BG1 (5 µM)	1.25	0.5 µM
BG2 (5 µM)	1.25	0.5 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	0.75	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	0.25	0.2 mM
Agua	3.45	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.3	0.12 U/µl
DNA	1.5	(100 ng/µl)
Vol. Total	12.5	-

Tabla 18. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DR3

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min	Desnaturalización
2	58°C	1 min	Apareamiento
3	72°C	1 min	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	30 veces	
5	72°C	5 min	Extensión final

Tabla 19.Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DR4

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	1.25	1X
961106-99 (5 µM)	1.25	0.5 µM
961106-100 (5 µM)	1.25	0.5 µM
961106-101 (5 µM)	1.25	0.5 µM
CF1 (5 µM)	1.25	0.5 µM
CF2 (5 µM)	1.25	0.5 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	0.75	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	0.25	0.2 mM
Agua	2.2	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.3	0.12 U/µl
DNA	1.5	(100 ng/µl)
Vol. Total	12.5	-

Tabla 20. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DR4

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min	Desnaturalización
2	62°C	1 min	Apareamiento
3	72°C	1 min	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	30 veces	
5	72°C	5 min	Extensión final

4.2.6.3B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pUC18 digerido con *Alu* I.

4.2.6.4 Identificación del polimorfismo de p53

La identificación del polimorfismo se realizó mediante la PCR utilizando 2 pares de iniciadores, cada uno específico para detectar un polimorfismo en el codón 72 del gen p53 (codificante para arginina -Arg- o para prolina -Pro-) descritos por Storey y cols.[55]:

p53Arg+	5´ tcc ccc ttg ccg tcc caa3´
p53Arg-	5´ ctg gtg cag ggg cca cgc 3´
p53Pro+	5´ gcc aga ggc tgc tcc ccc 3´
p53Pro-	5´ cgt gca agt cac aga ctt 3´

4.2.6.4A Amplificación del polimorfismo p53

La amplificación del polimorfismo del codón 72 del gen p53 se realizó bajo condiciones óptimas de reacción descritas en las tablas 21 y 22. Esta reacción se realizó a partir del DNA extraído de sangre y usando un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 21.
Condiciones de reacción para la amplificación del codón 72 de p53

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
p53Arg+ (5 µM)	0.6	0.15 µM
p53Arg- (5 µM)	0.6	0.15 µM
p53Pro+ (5 µM)	4	1 µM
p53Pro- (5 µM)	4	1 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	0.8	1 mM
dNTPs (10 mM)	0.75	0.375 mM
Agua	5.45	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.3	0.075 U/µl
DNA	1.5	(100 ng/µl)
Vol. Total	20	-

Tabla 22. Condiciones del programa para la amplificación del codón 72 de p53

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	30 seg	Desnaturalización
2	55°C	40 seg	Apareamiento
3	72°C	50 seg	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	28 veces	
5	72°C	5 min	Extensión final

4.2.6.4B Verificación de los productos amplificados

Los productos amplificados se resolvieron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12%. Se utilizó una cámara de electroforesis vertical de 20X20 cms con peine de teflón de 20 carriles y 0.4mm de espesor. Los vidrios utilizados se lavaron perfectamente con jabón, agua destilada y etanol. Una vez secos, se acomodaron los vidrios y los separadores y se sellaron los lados con cinta plástica. Se preparó la mezcla descrita en la tabla 23, se vació y

se dejó polimerizar. Se colocaron 10 µl de producto amplificado y 2 µl de jugo azul al 6X en cada carril, se colocó como referencia el marcador de peso molecular pUC18 digerido con *Hae* III. La electroforesis se realizó con TBE 1X y se corrió por espacio de 3 h a 170V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 2 µg/ml y se observaron en el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000.

Tabla 23. Mezcla para preparar los geles de poliacrilamida al 12%.

Reactivo	Volumen (ml)
Agua destilada	15
TBE 10X	3
Acrilamida/bisacrilamida al 30%	12
*Persulfato de amonio al 10%	0.5
*TEMED	0.05

* Catalizadores (se agregan justo antes de vaciar el gel en el molde pues desencadenan la polimerización súbita del gel).

4.2.6.5 Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras

La detección de mutación en los codones 12 y 13 se realizó utilizando la técnica de RFLPs. Este técnica está basada principalmente en 2 procesos: amplificación de los codones mediante una variante de la PCR que hace uso de oligonucleótidos que incorporan sustituciones estratégicas para crear sitios de restricción al nivel de los codones 12 y 13 y digestión de los productos amplificados con las enzimas de restricción para las cuales se creó el sitio. En ambos casos, la mutación está presente cuando se detecta la pérdida de dicho sitio artificial de restricción diagnóstico en el codón en cuestión, a causa de la presencia de una mutación activadora del proto-oncogen. Los oligos utilizados fueron descritos por Shibata y Kumar y cols. [89], [90] y la secuencia se describe a continuación:

Codón 12

961107-103	5´ tat aaa ctt gtg gta gtt gga cct 3´
961107-106	5´ t cta ttg ttg gat cat at 3´

Codón 13

961106-102	5´ gcc tgc tga aaa tga ctg aa 3´
961108-108	5´ cgt caa ggc act ctt gcc tag g 3´

4.2.6.5A Amplificación de los codones 12 y 13 de K-ras

Para la amplificación de los codones 12 y 13, las condiciones de reacción utilizadas fueron las descritas a continuación en la tabla 24 y 25. Estas amplificaciones se realizaron a partir del DNA extraído de las biopsias de cérvix y en un termociclador Omni-E Haydbaid.

Tabla 24.
Condiciones de reacción para la amplificación de los codones 12 y 13 de k-ras

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
103 ó 102 (5 µM)	4	1 µM
106 ó 108 (5 µM)	4	1 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	1.5	1.875 mM
dNTPs (10 mM)	0.4	0.2 mM
Agua	6.1	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.5	0.125 U/µl
DNA	1.5	(100 ng/µl)
Vol. Total	20	-

Tabla 25. Condiciones del programa para la amplificación de los codones 12 y 13 de k-ras

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	30 seg	Desnaturalización
2	*52 ó **55°C	30 seg	Apareamiento
3	72°C	30 seg	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	28 veces	
5	72°C	5 min	Extensión final

*Temperatura para PCR del codón 12
** Temperatura para PCR codón 13

4.2.6.5B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pUC18 digerido con *Alu* I.

4.2.6.5C Digestión con enzimas de restricción

Después de verificar la amplificación, se digirió una alícuota de 10 µl del producto amplificado con las enzima *Bst* NI para buscar la presencia o ausencia de mutación en el codón 12 y con *Hae* III en el caso del codón 13. Las digestiones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.6.5D Resolución de los productos de digestión

Los productos amplificados se resolvieron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12% como se describe en apartado 4.2.6.4B.

4.2.6.6 Detección de mutaciones en el codón 12 de H-ras

En este caso, también se utilizó la técnica de RFLP's, usando los iniciadores descritos por Wong y cols.[91]. La presencia o ausencia de la mutación está dada por los diferentes tamaños de fragmentos de restricción (secuencia normal = 25, 55 y 236 pb y secuencia mutada = 21 y 291 pb). A continuación se describen los oligos utilizados:

12Hras-1	5' tta tgg ttt ctg aga aca gat ggg 3'
12Hras-2	5' ggg tgc tga gac gag gga ct 3'

4.2.6.6A Amplificación del codón 12 de H-ras

Para la amplificación del codón 12, las condiciones de reacción utilizadas fueron las descritas a continuación en las tablas 26 y 27. Estas amplificaciones se realizaron a partir del DNA extraído de las biopsias de cérvix y en un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 26. Condiciones de reacción para la amplificación del codón 12 de H-ras

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
12Hras-1(5 µM)	3	0.75 µM
12Hras-2 (5 µM)	3	0.75 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	1.75	2.875 mM
dNTPs (10 mM)	1.25	0.625 mM
Agua	7.2	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.3	0.075 U/µl
DNA	1.5	(100 ng/µl)
Vol. Total	20	-

Tabla 27. Condiciones del programa para la amplificación del codón 12 de H-ras

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min	Desnaturalización
2	54°C	1 min	Apareamiento
3	72°C	1 min	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	30 veces	
5	72°C	10 min	Extensión final

4.2.6.6B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pBS digerido con *Hae* III.

4.2.6.6C Digestión con enzimas de restricción

Después de verificar la amplificación, se digirió una alícuota de 10 µl del producto amplificado con la enzima *Msp* I para buscar la presencia o ausencia de mutación. Las digestiones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.6.6D Resolución de los productos de digestión

Los productos amplificados se resolvieron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12% como se describe en apartado 4.2.8.4B.

4.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis se realizó haciendo comparaciones estadísticas utilizando tablas de contingencia de 2X2 ó 2X3 según fue el caso y se utilizó el exact tests (1,000 simulations), tomándose como significancia una $p<0.05$[92].

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Se recolectaron 185 biopsias de pacientes a las cuales se les realizó histerectomía. Ochenta y cinco de las muestras tuvieron diagnóstico histopatológico confirmatorio de CaCU, las cuales constituyeron el grupo de casos, cien biopsias de pacientes sin CaCU, las cuales formaron parte del grupo control; ambos grupos se analizaron por igual. También se recolectó sangre periférica de 68 pacientes de los casos y de 87 pacientes del grupo control. De las muestras de CaCU, 46 presentaban cáncer invasor y 39 estaban en etapa de *in situ* (NIC III). El diagnóstico histopatológico reveló que 43 (93%) eran tipo escamoso y sólo 3 (7%) eran adenocarcinomas, el grado de diferenciación y de invasión para cada uno de los cánceres invasores se muestran en las tablas 28 y 29.

Tabla 28. Grado de diferenciación de los CaCU

Diferenciación	N
Bien diferenciado	2
Moderadamente diferenciado	41
Poco diferenciado	3
Total	46

Tabla 29. Grado de Invasión de los CaCU

Grado	N
Ia	3
Ib	14
IIa	1
IIb	5
IIIb	23
Total	46

La edad de las pacientes y los antecedentes gineco-obstétricos de cada una de las pacientes se analizaron y se muestran en la tabla 30, no se observó diferencia significativa al comparar los casos vs controles ($p>0.05$). En el cuestionario realizado a cada una de las pacientes se les preguntó si habían tenido el hábito de fumar, así como el uso de anticonceptivos hormonales (tabla 31).

Tabla 30. Características de la población

	Rango		Media		DS	
	Casos	**Controles**	**Casos**	**Controles**	**Casos**	**Controles**
Edad (años)	16-78	27-69	45.14	43.95	13.97	8.30
Gestas	0-13	0-13	5.61	4.16	3.38	2.72
Paridad	0-12	0-11	4.74	3.12	3.26	2.75
IVSA (años)	VSAN-33	VSAN-43	16.88	19.69	4.24	6.14
CS	0-15	0-4	1.76	1.22	1.93	0.56

DS= Desviación Estandard, **IVSA=** Inicio de la Vida Sexual Activa, **CS=** Compañeros Sexuales, **VSAN=** Vida Sexual Activa Negada

Tabla 31. Antecedentes de la Población

Antecedentes	Casos (%) N = 170	Controles (%) N = 200
Tabaquismo	20 (23.5)	18 (18)
Uso de AO	10 (11.8)	16 (16)

p>0.05, **AO=** Anticonceptivos orales

5.2 DATOS DE GENÉTICA MOLECULAR

5.2.1 BANCO DE DNA GENÓMICO

Se extrajo DNA genómico a partir de las 185 muestras de tejido cervical. Dichos DNAs se integraron en un banco (85 casos y 100 controles). Estas muestras tuvieron una concentración que oscilo entre 25 y 500 ng/µl, mientras que el volumen fue entre 20 y 500 µl. La integridad del DNA en las muestras fue aceptable, ya que sólo en algunas cuantas se observó una ligera degradación del DNA. Además del DNA extraído de tejido fresco, se realizó la extracción de DNA a partir de 155 muestras de sangre periférica (68 casos y 87 controles) y se integró un banco en el cual la calidad del DNA es mucho mejor que en el extraído a partir de tejido, pues no se observo ninguna degradación. Las concentraciones de los DNAs están entre 100 y 1000 ng/µl y el volumen aproximado fue de 600 µl por muestra. En la figura 12 se muestran algunos de los DNAs extraídos de las muestras de tejido en fresco y sangre.

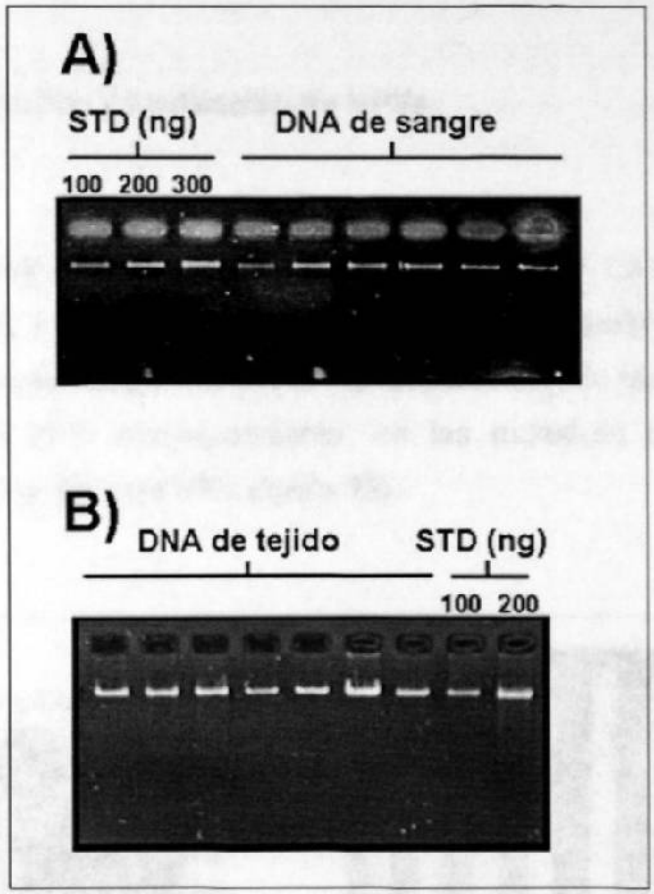

Figura 12. Análisis de DNAs en geles de agarosa al 1%. A) DNAs extraídos a partir de diferentes muestras de sangre periférica. **B)** DNAs correspondientes a muestras de tejido fresco (biopsia cervical). **STD**= DNA estándar de concentración conocida.

5.2.2 FACTORES EXTRÍNSECOS

5.2.2.1 Detección y tipificación de HPVs

5.2.2.1A Amplificación y tipificación de HPVs

Se logró la estandarización de la técnica para tipificar HPV. La amplificación del DNA genómico de las muestras de casos y controles a partir de tejido fresco (biopsia) resultó satisfactoria, lográndose la amplificación de las 185 muestras y la tipificación del HPV correspondiente, en las muestras que presentaron amplificación para el DNA de HPV (figura 13).

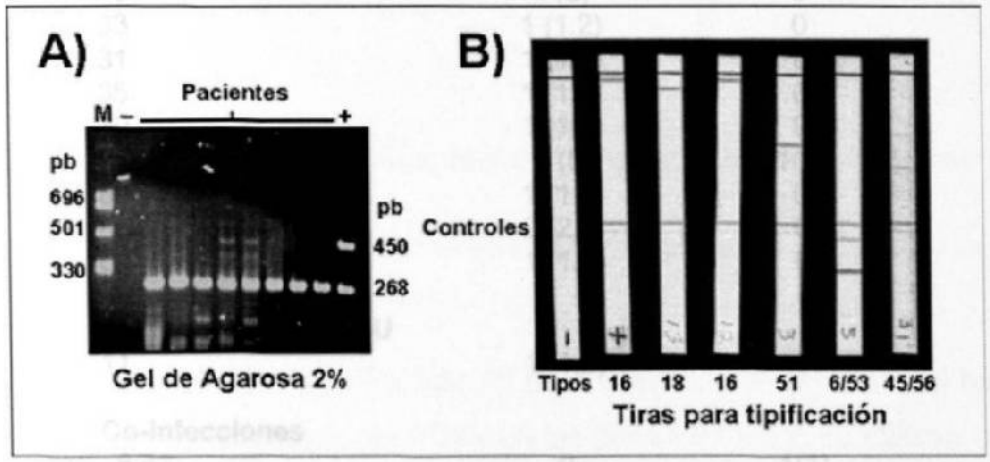

Figura 13. Amplificación y Tipificación de HPVs. A) Gel de agarosa al 2% en el cual se observan algunos de los productos amplificados a partir del DNA de tejido, la banda de 268 pb corresponde a una porción del gen de la β-globina (control interno) y la banda de 450pb corresponde a la amplificación del HPV. **M**: Marcador de peso molecular; **-**: Control negativo; **+**: Control positivo (muestra con HPV 16). **B)** Tiras para tipificar los 27 tipos de HPV, se pueden observan que las sondas del control interno están positivas en todas las muestras a excepción del control negativo; **-**: Control negativo; **+**: Control positivo (muestra con HPV 16), últimas 5 tiras corresponden a pacientes.

5.2.2.1B Frecuencia de HPVs

Se detectó la presencia de HPV en 74/85 (87.1%) de los casos y en 4/100 (4%) de los controles (tabla 32). El tipo de HPV más frecuente en CaCU fue el tipo 16 (64%) seguido del tipo 18 (12.16%). También se observó la presencia de 5 muestras (6.8%) con coinfecciones de dos tipos de HPV (16/52=2, 16/51=1, 16/58=1 y 18/68=1). *Se presentaron dos coinfecciones en los controles.*

Tabla 32. Frecuencia de tipos de HPVs

Tipo de HPV	Casos (%) N = 85	Controles(%) N = 100
Asociados a CaCU		
16	44 (52)	1 (1)
18	8(9)	0
45	4 (5)	0
33	1 (1.2)	0
31	1 (1.2)	0
35	1 (1.2)	0
39	1 (1.2)	0
51	4 (5)	1(1)
56	1 (1.2)	0
58	2 (2.3)	0
68	1 (1.2)	0
No asociados a CaCU		
11	1 (1.2)	0
Co-infecciones		
6/53	0	1(1)
16/52	2 (2.3)	1 (1)
16/51	1 (1.2)	0
16/58	1 (1.2)	0
18/68	1 (1.2)	0
Negativos	11 (12.9)	96 (96)

La frecuencia de HPV, de acuerdo al estadio del cáncer se muestra en la tabla 33, observándose una mayor prevalencia de HPV en los cánceres invasores. La coinfección fue similar en ambos grupos

Tabla 33. Frecuencia de HPV de acuerdo al estadio del CaCU

Tipo de HPV	CaCU *in situ* (%) N = 39	CaCU Invasor (%) N = 46
HPV	30 (76.9)	44 (95.7)
HPV 16	19/30 (63.3)	29/44 (65.9)
HPV 18	3/30 (10)	6/44 (13.6)
Coinfecciones	2/30 (6.6)	3/44 (6.8)

5.2.2.2 Integración del HPV 16

5.2.2.2A Amplificación y verificación de los productos amplificados de los genes E1 y E2

Para conocer si el DNA de HPV tipo 16 está integrado al genoma del huésped se estandarizó por separado las PCRs de los genes E1 y E2, se utilizaron olígos para amplificar el gen E6 como control interno en la amplificación de E2. Se analizaron un total de 48 casos y 1 control que contenía HPV 16, siguiendo las condiciones mencionadas en la sección de materiales y métodos y en la figura 14 se muestran los productos amplificados de algunas de las muestras.

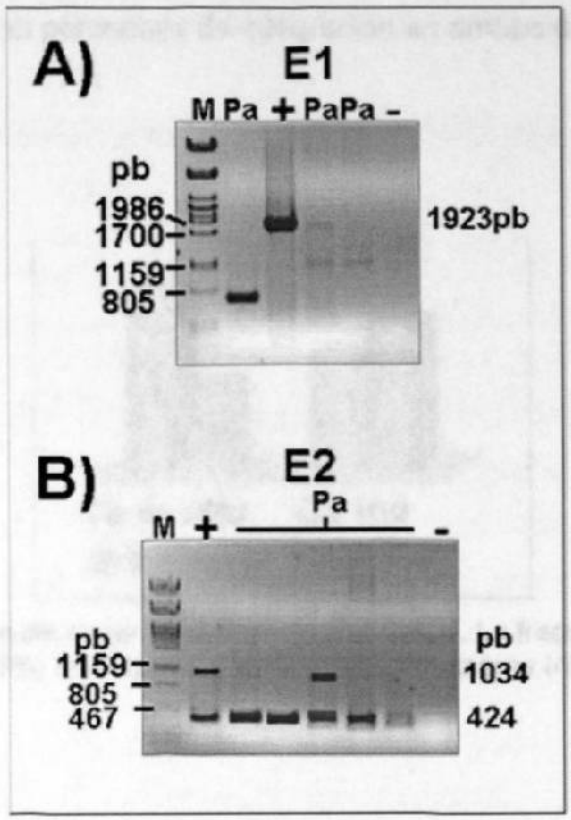

Figura 14. Amplificación de los genes E1 y E2 del HPV 16. En ambas fotos, el gel corresponde a uno de agarosa al 1%. **A)** Amplificación del gen E1 del HPV16 (1923 pb). **B)** Coamplificación de los genes E2 y E6 del HPV 16 (1034 pb y 424 pb, respectivamente). En ambos geles la presencia de banda de amplificación nos indica la presencia del gen E1 ó E2 completos. **M**: Marcador de peso molecular; -: Control negativo; +: Control positivo; **Pa**: Pacientes.

5.2.2.2B Frecuencia de integración

No se observó integración en la muestra control positiva para HPV 16. En los casos no hubo amplificación de E1 o E2 en un total de 26/48 muestras que contenían HPV 16. En 11 muestras no se logró la amplificación del gen E1, en 6 del gen E2 y en 9 ni de uno, ni de otro gen. En todos las muestras se amplificó el gen E6, usado como control interno. Basándonos en estos resultados, los casos presentaron un 54.2% de integración del HPV 16 al genoma del huésped. De 19 casos con un diagnóstico de CaCU *in situ*, 13 de las muestras estaban

integradas y 13/29 de los CaCU invasor también demostraron integración. En la figura 15 se muestra el porcentaje de integración en ambos casos.

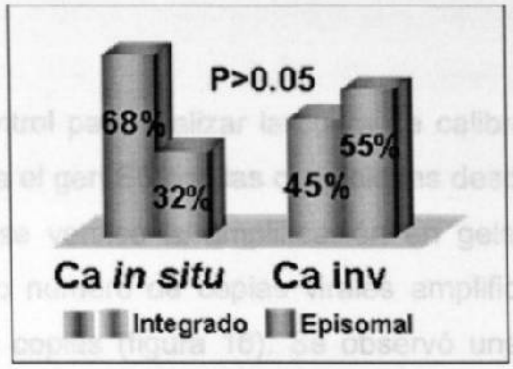

Figura 15. Integración de acuerdo al Estadio del CaCU. La frecuencia de integración en los CaCU *in situ* (68%) es mayor que en los CaCU invasores (45%).

Analizando por separado las muestras con diagnóstico de CaCU invasor, no se encontró asociación entre la frecuencia de integración y el grado de invasión de las muestras. En la tabla 34 se muestran las frecuencias en cada uno de los grupos.

Tabla 34. Frecuencia de integración y grado de invasión

Grado de Invasión	Integración (%)	N
I	70	10
II	0	3
III	29	14
IV	100	2
Total (muestras HPV 16)	-------	29

5.2.2.3 Número de copias del HPV 16

5.2.2.3A Amplificación y verificación del producto amplificado del gen E6 del HPV 16

Las muestras y el control para realizar la curva de calibración se amplificaron utilizando primers para el gen E6 con las condiciones descritas en la sección de material y métodos; se verificó la amplificación en geles de agarosa al 2% (figura 16). El mínimo número de copias virales amplificadas en la curva de calibración fue de 10 copias (figura 16). Se observó una buena amplificación utilizando 100 ng de DNA genómico para cada una de las 49 muestras analizadas. Los resultados de la amplificación a partir de 10 ng de DNA genómico de muestra concordaron con las muestras que presentaban arriba de 100 copias en la amplificación a partir de 100ng de DNA.

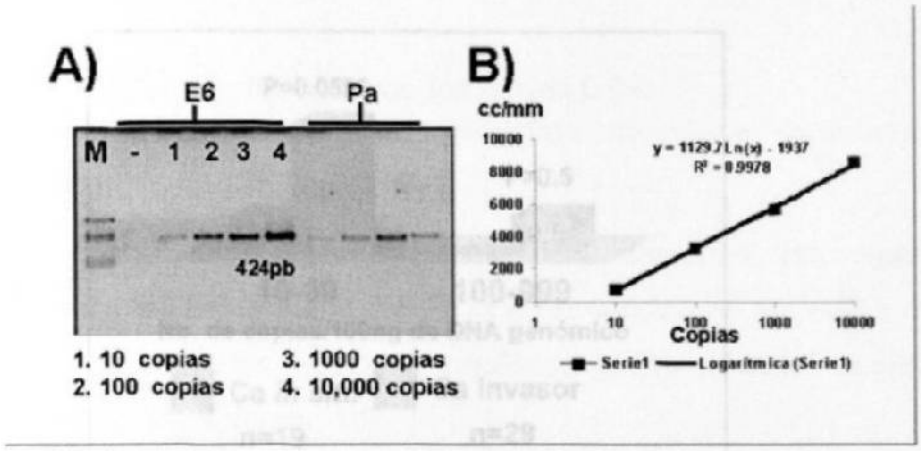

Figura 16. Amplificación del gen E6 y curva de calibración para cuantificar el número de copias de HPV-16. A) Gel de agarosa al 2%. Amplificación del gen E6 del HPV16 (424 pb). **M**: Marcador de peso molecular; **-**: Control negativo; **E6**: Diluciones del plásmido utilizado como control (10-10,000copias); **P**: Productos amplificados provenientes de 100ng de DNA de muestras de pacientes. **B)** Curva de calibración de los productos amplificados del gen E6 (gel A, 1-4). Se utilizó la ecuación de esta gráfica para cuantificar los productos amplificados a partir de las muestras.

5.2.2.3B Asociación del número de copias virales y características de los CaCU

No se logró amplificación de la muestra control que contenía HPV 16, debido a que la sensibilidad que nos dio la PCR fue de 10 copias mínimo, por lo que asumimos que esta muestra presenta menos de 10 copias de HPV por 100 ng de DNA genómico. De los 48 casos que tenían HPV 16, 35 (72.9%) presentaban menos de 10 copias virales, 10 (20.8%) entre 10 y 99 copias virales y 3 (6.3%) entre 100 y 999 copias virales por 100 ng de DNA genómico de muestra. En la figura 17 se muestra una gráfica comparando el número de copias virales vs estadio del cáncer. En 10 de las 29 muestras con un diagnóstico de cáncer invasor se detectaron de 10-99 copias virales/100 ng de DNA genómico, comparadas con 2/19 de los cánceres *in situ* (p=0.0596). Sólo en 3 muestras se detectaron de 100 a 999 copias/100 ng de DNA y éstas correspondieron al grupo de las muestras con Ca invasor.

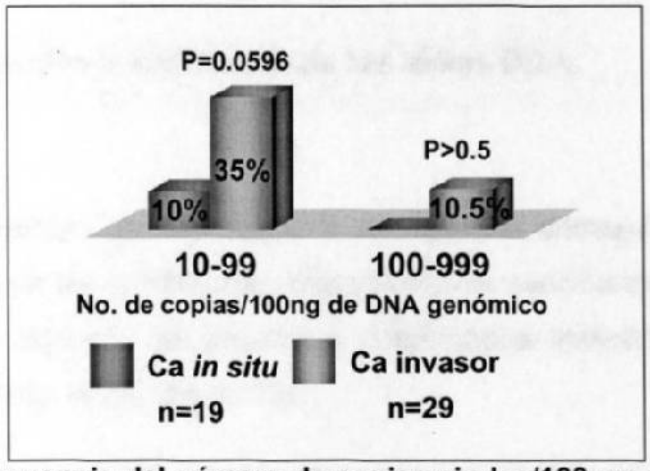

Figura 17. Frecuencia del número de copias virales/100 ng de DNA genómico vs tipo de cáncer. El 35% de las muestras con CaCU invasor presentaron de 10-99 copias/100ng de DNA y un 10.5% de 100-999 copias/100 ng de DNA genómico. Sólo un 10% de los CaCU *in situ* presentaron de 10-99 copias/100ng de DNA.

Se analizó la cantidad de copias virales encontradas por paciente en cada uno de los grados de invasión en el grupo de los CaCU invasores y los resultados se muestran en la tabla 35.

Tabla 35 No. de copias de HPV-16 de acuerdo al grado de invasión

	Grado de Invasión			
No. de copias/100ng	**I**	**II**	**III**	**IV**
< 10	12	5	16	2
10-99	3	1	6	0
100-999	2	0	1	0

p>0.05

5.2.3 FACTORES INTRÍNSECOS

5.2.3.1 Determinación de los alelos DQA

5.2.3.1A Detección y tipificación de los alelos DQA

Habiendo recurrido en este caso a un estuche comercial, las muestras se amplificaron con las condiciones indicadas en la sección de material y métodos sin problema alguno y los productos amplificados obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 2% (figura 18).

El producto amplificado se tipificó mediante hibridación reversa en mancha. Se realizó la lectura de la tira y se determinaron los genotipos correspondientes;

todo esto también sin necesidad de cambiar el protocolo y las condiciones recomendadas por el fabricante. Es importante señalar que con el estuche empleado se pueden identificar 6 de ocho alelos de DQA, ya que los alelos 0401, 0501 y 0601 (4.2, 4.1 y 4.3) se detectan juntos como alelo 4. La combinación de los 6 alelos origina un máximo de 21 genotipos diferentes (figura 18).

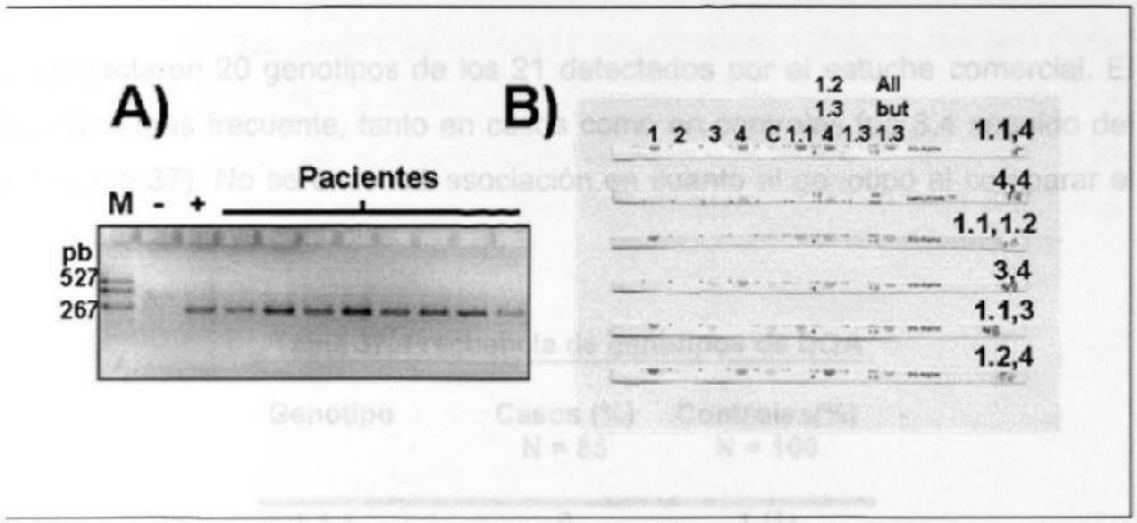

Figura 18. Tipificación con el estuche del marcador HLADQA. A) Gel de Agarosa al 2%. Productos amplificados con el estuche de algunos de los pacientes. **M**: Marcador de peso molecular; -: Control negativo; +: Control positivo. **B)** Se ilustran los resultados de la hibridación reversa en mancha de algunos de los productos amplificados, indicándose los genotipos obtenidos para cada caso.

5.2.3.1B Frecuencia de los alelos de DQA

Se encontraron los 6 alelos detectados por el estuche comercial y la distribución se muestra en la tabla 36. El alelo más frecuente fue el 4, seguido del 3 en ambos grupos. No se encontró asociación con los alelos cuando se compararon los casos contra los controles

Tabla 36. Frecuencia de alelos de DQA

Alelos (OMS)	Casos (%) N = 170	Controles (%) N = 200
1.1 (0101)	14 (8.2)	19 (9.5)
1.2 (0102)	9 (5.3)	15 (7.5)
1.3 (0103)	5 (2.9)	10 (5)
2 (0201)	13 (7.6)	14 (7)
3 (0301)	52 (30.6)	54 (27)
4(0501,0401, 0601)*	77 (45.3)	88 (44)

p>0.05; *4.1,4.2,4.3

Se detectaron 20 genotipos de los 21 detectados por el estuche comercial. El genotipo más frecuente, tanto en casos como en controles fue 3,4 seguido del 4,4 (tabla 37). No se encontró asociación en cuanto al genotipo al comparar el grupo de casos vs controles.

Tabla 37. Frecuencia de genotipos de DQA

Genotipo	Casos (%) N = 85	Controles(%) N = 100
1.1,1.1	0	1 (1)
1.1,1.2	1 (1.1)	2 (2)
1.1,1.3	1 (1.1)	3 (3)
1.1,2	0	1 (1)
1.1,3	4 (4.8)	4 (4)
1.1,4	8 (9.3)	7 (7)
1.2,1.2	0	1(1)
1.2,1.3	0	1 (1)
1.2,2	0	1 (1)
1.2,3	1 (1.1)	3 (3)
1.2,4	7 (8.1)	6 (6)
1.3,2	1 (1.1)	2 (2)
1.3,3	1 (1.1)	2 (2)
1.3,4	2 (2.2)	2 (2)
2,2	1 (1.1)	0
2,3	3 (3.5)	1 (1)
2,4	7 (8.1)	9 (9)
3,3	7 (8.1)	9 (9)
3,4	29 (34)	27 (27)
4,4	12 (14)	18 (18)

p>0.05

5.2.3.2 Determinación de los alelos DQB

5.2.3.2A Detección e identificación de los alelos DQB

Las muestras se amplificaron con las condiciones indicadas en la sección de material y métodos. Todas las muestras amplificaron la porción del gen DRB1 utilizado como control interno y los productos amplificados obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 3% (ver figura 19). La identificación de los alelos se realizó mediante los productos amplificados obtenidos en cada una de las 22 PCRs.

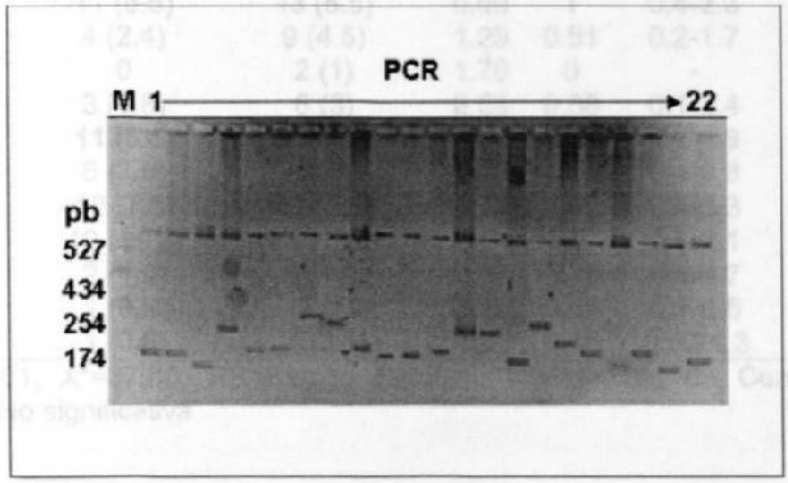

Figura 19. Amplificación de los alelos DQB. Gel de agarosa al 3%. Productos amplificados de las 22 PCRs utilizadas para la identificación de los alelos DQB. La banda de 796pb corresponde al control interno. **M**: Marcador de peso molecular.

5.2.3.2B Frecuencia de los alelos de DQB

Se detectaron 19 alelos diferentes en la población estudiada (casos y controles). Se encontró asociación entre los alelos DQB al compararse casos vs controles. Los alelos más frecuentemente encontrados fueron el 201 y 602 para casos y controles, respectivamente. El alelo 201 puede considerarse como un factor de riesgo, mientras que el alelo 602 como un factor protector (tabla 38).

Tabla 38. Frecuencia de los alelos DQB

Alelo	Casos (%) N = 170	Controles (%) N = 200	X^2	RR	IC	P
201	**25 (14.7)**	14 (7)	5.77	**2.29**	**1.2-4.6**	**0.01**
301	18 (10.6)	12 (6)	2.59	1.86	0.9-3.9	NS
302	13 (7.6)	12 (6)	0.39	1.30	0.6-2.9	NS
303	0	1 (0.5)	0.85	0	-	NS
304	8 (4.7)	7 (3.5)	0.34	1.36	0.5-3.8	NS
401	0	9 (4.5)	7.82	0	-	NS
402	15 (8.8)	24 (12)	0.98	0.71	0.4-4.1	NS
501	20 (11.8)	14 (7)	2.49	1.77	0.9-3.6	NS
502	11 (6.5)	13 (6.5)	0.00	1	0.4-2.3	NS
503	4 (2.4)	9 (4.5)	1.25	0.51	0.2-1.7	NS
504	0	2 (1)	1.70	0	-	NS
601	3 (1.8)	6 (3)	0.59	0.58	0.1-2.4	NS
602	**11 (6.5)**	**27 (13.5)**	**4.91**	**0.44**	**0.2-0.9**	**0.027**
603	6 (3.5)	6 (3)	0.08	1.18	0.4-3.8	NS
604	13 (7.6)	11 (5.5)	0.70	1.42	0.6-3.3	NS
605	19 (11.2)	21 (10.5)	0.04	1.07	0.6-2.1	NS
606	2 (1.2)	3 (1.5)	0.07	0.78	0.1-4.7	NS
607	1 (0.6)	2 (1)	0.19	0.59	0.1-6.5	NS
608	1 (0.6)	7 (3.5)	3.67	0.16	0.02-1.3	NS

P=0.01, X^2=37.80. RR=Riesgo Relativo, IC=Intervalo de Confianza, **NS**=No significativa

Se detectaron 78 genotipos diferentes en ambos grupos, 34 en los controles y 62 en los casos (tabla 39), no se observó asociación al comparar los genotipos en los casos vs controles.

Tabla 39. Frecuencia de genotipos DQB

Genotipo	Casos N = 85	Controles N = 100	Genotipo	Casos N = 85	Controles N = 100
201-201	2	0	401-501	0	1
201-301	2	0	401-602	0	2
201-302	4	2	401-604	0	1
201-402	4	4	401-605	0	2
201-501	2	1	401-608	0	1
201-502	2	1	402-402	0	1
201-503	0	1	402-501	3	2
201-601	1	0	402-502	0	5
201-602	1	1	402-503	1	1
201-603	2	0	402-601	0	1
201-604	1	1	402-602	0	1
201-605	3	0	402-603	0	1
201-608	0	3	402-604	0	1
301-301	1	2	402-605	2	2
301-302	2	0	402-606	0	1
301-304	0	1	501-502	2	0
301-402	1	0	501-503	1	4
301-501	2	1	501-601	0	1
301-502	0	1	501-602	2	2
301-503	2	0	501-603	2	0
301-602	0	5	501-604	1	1
301-604	2	0	501-605	1	0
301-605	2	0	501-606	0	1
301-606	1	0	501-607	1	0
301-608	1	0	502-502	1	2
302-302	0	1	502-601	1	0
302-304	0	2	502-604	2	0
302-401	0	1	502-605	1	1
302-402	4	2	503-604	0	1
302-502	0	1	503-605	0	1
302-605	3	2	503-606	0	1
303-402	0	1	504-504	0	1
304-304	1	0	601-605	1	0
304-401	0	1	602-602	3	0
304-501	3	0	602-604	1	0
304-502	1	0	603-603	1	0
304-602	1	2	604-604	1	0
304-603	0	1	604-605	4	0
304-606	1	0	605-605	1	0

P>0.05

Se analizaron los haplotipos DQA-DQB y se encontraron 76 diferentes (tabla 40). En los casos se detectaron 58 y 70 en los controles. Se encontró

asociación en los *haplotipos DQA* y *DQB* al comparar casos vs controles. El haplotipo 4-602 tiene un efecto protector en las mujeres contra el CaCU.

Tabla 40. Frecuencia de los haplotipos DQA-DQB

Haplotipo	Casos N = 170	Controles N = 200	Haplotipo	Casos N = 170	Controles N = 200
1.1-201	2	2	2-601	1	0
1.1-301	1	1	2-602	0	2
1.1-302	0	1	2-603	1	0
1.1-304	2	0	2-608	0	1
1.1-402	1	1	3-201	6	2
1.1-501	6	5	3-301	7	3
1.1-502	1	1	3-302	5	6
1.1-503	0	4	3-304	4	3
1.1-602	1	1	3-401	0	5
1.1-604	0	1	3-402	2	6
1.1-605	0	2	3-501	5	2
1.2-201	3	1	3-502	3	1
1.2-301	2	1	3-503	2	2
1.2-302	0	2	3-504	0	2
1.2-304	0	1	3-601	0	2
1.2-401	0	1	3-602	3	3
1.2-402	1	1	3-603	2	2
1.2-501	0	1	3-604	5	3
1.2-602	2	3	3-605	8	8
1.2-603	0	1	3-606	0	1
1.2-604	1	1	3-608	0	3
1.2-605	0	1	4-201	5	1
1.2-608	0	1	4-301	7	7
1.3-201	1	2	4-302	7	2
1.3-304	1	0	4-304	1	3
1.3-402	0	1	4-401	0	2
1.3-601	2	1	4-402	10	13
1.3-602	0	2	4-501	9	6
1.3-603	0	2	4-502	7	11
1.3-604	1	0	4-503	2	3
1.3-605	0	1	4-601	0	3
1.3-607	0	1	4-602*	5	16
2-201	8	6	4-603	3	1
2-301	1	0	4-604	6	6
2-302	1	1	4-605	11	9
2-303	0	1	4-606	2	2
2-401	0	1	4-607	1	1
2-402	1	2	4-608	1	2

p=0.03, X^2=78.43. *RR=0.35, IC=0.12-0.97, X^2=4.39, p=0.0042

5.2.3.3 Determinación de los alelos DR3 y DR4

5.2.3.3A Detección de los alelos DR3 y DR4

Las muestras se amplificaron por separado para cada uno de los alelos con las condiciones indicadas en la sección de material y métodos. Todas las muestras amplificaron la porción del gen de FQ y β-globina utilizados como controles internos, para DR4 como para DR3, procediendo tal y como se describió en el apartado 4.2.6.3. Los productos amplificados obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 2% (figura 20).

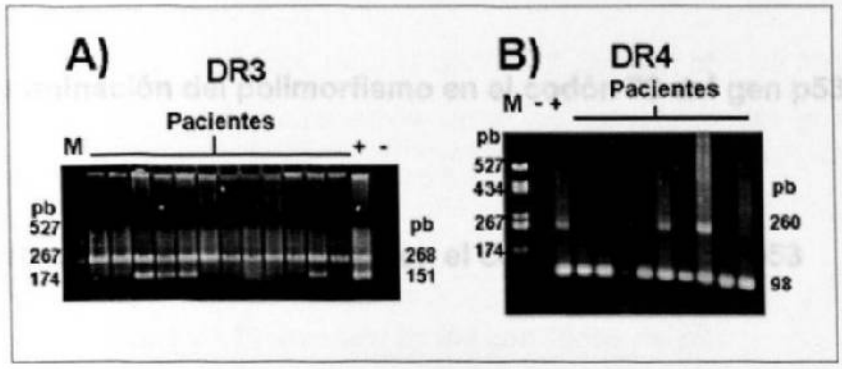

Figura 20. Amplificación de los alelos DR3 y DR4. En ambas fotos, el gel corresponde a uno de agarosa al 2%. **A)** Amplificación del alelo DR3 (151 pb) y del gen de β-globina como control interno (268 pb). **B)** Amplificación del alelo DR4 (260 pb) y del gen de la FQ como control interno (98 pb). **M**: Marcador de peso molecular; **-**: Control negativo; **+**: Control positivo.

5.2.3.3B Frecuencia de los alelos de DR3 y DR4

En la tabla 41 se muestra las frecuencias encontradas para los alelos DR3 y DR4 en nuestra población. No se encontró asociación con ninguno de los dos alelos al compararse el grupo de controles vs casos.

Tabla 41. Frecuencia de los alelos DR3 y DR4

DR3			DR4		
Alelo	**Casos (%) n=85**	**Controles (%) n=100**	**Alelo**	**Casos (%) n=85**	**Controles (%) n=100**
Presencia	11(12.9)	12 (12)	Presencia	42 (49.4)	40 (49
Ausencia	74 (87.1)	88 (88)	Ausencia	43 (50.6)	60(60)
p>0.05			p>0.05		

5.2.3.4 Determinación del polimorfismo en el codón 72 del gen p53

5.2.3.4A Detección del polimorfismo en el codón 72 del gen p53

Se utilizaron los iniciadores descritos por Storey y cols.[55], modificando las condiciones de reacción para estandarizar una PCR dúplex y analizar ambos alelos en una misma reacción. Las condiciones utilizadas fueron las descritas en la sección de material y métodos. Los productos amplificados se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% teñidos con bromuro de etidio (figura 21).

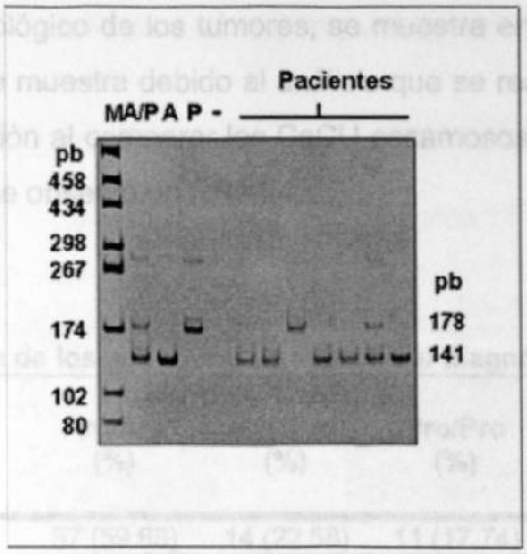

Figura 21. Amplificación de los alelos Arginina/Prolina en el codón 72 del gen p53. El gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. Productos amplificados correspondientes a los alelos arginina (141 pb) y prolina (178 pb). **M**: Marcador de peso molecular; **A/P**: Heterocitogo para Arginina/Prolina; **A**: Homocigoto para Arginina, **P:** Homocigoto para Prolina; -: Control negativo.

5.2.3.4B Frecuencia del polimorfismo en el codón 72 del gen p53

Las frecuencias de los genotipos para el codón 72 del gen p53 se muestran en la tabla 42. No se encontró asociación entre los genotipos del polimorfismo presente en el gen p53 al analizar casos vs controles.

Tabla 42. Frecuencia de los genotipos de p53

Genotipos	Casos (%) N = 85	Controles (%) N = 100
Arg/Arg	53 (62.4)	62 (62)
Arg/Pro	21 (24.7)	31 (31)
Pro/Pro	11 (12.9)	7 (7)

$p>0.05$

El análisis de los genotipos del codón 72 del gen p53, asociándolos al diagnóstico histopatológico de los tumores, se muestra en la tabla 43 (se tomó un número menor de muestra debido al análisis que se realizó para el artículo). Se encontró asociación al comparar los CaCU escamosos HPV 16 vs controles sin HPV (p=0.02) y se observó un RR=4.4.

Tabla 43.Distribución de los genotipos de acuerdo al diagnóstico histopatológico

Diagnóstico Histopatológico	Arg/Arg (%)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)	Total	X^2	p
CaCU (HPV)	37 (59.68)	14 (22.58)	11 (17.74)	62	3.77	0.16
Escamoso (HPV)	24 (63.16)	6 (15.79)	8 (21.05)	38	5.88	0.06
Escamoso (HPV 16)	**15 (57.69)**	**4 (15.38)**	**7 (26.92)**	**26**	**7.44**	**0.02**
Escamoso (HPV18)	2 (50.00)	1 (25.00)	1 (25.00)	4	1.49	0.53
Escamoso (sin HPV)	2 (100.00)	0	0	2	1.12	0.64
Adenocarcinoma	1 (50.00)	1 (50.00)	0	2	0.52	1.00
CaCU *in situ* (HPV)	18 (58.06)	11 (35.48)	2 (6.45)	31	0.53	0.75
(HPV 16)	8 (50.00)	6 (37.50)	2 (12.50)	16	1.15	0.65
(HPV 18)	2 (100.00)	0	0	2	1.12	0.64
Controles (HPV)	4 (80.00)	1 (20.00)	0	5	0.70	0.79
Controles (sin HPV)	**58 (63.74)**	**26 (28.57)**	**7 (7.69)**	**91**	-	-

5.2.3.5 Determinación de las mutaciones presentes en Ras

5.2.3.5A Detección de las mutaciones en los oncogenes K- y H-ras

Se analizaron por separado los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras utilizando las condiciones descritas en la sección de material y métodos. Los productos de las diferentes digestiones se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% y se identificaron sin ningún problema. En las

figuras 22 y 23 se muestran los productos de digestión para la identificación de mutaciones en el oncogen K-ras y H-ras, respectivamente.

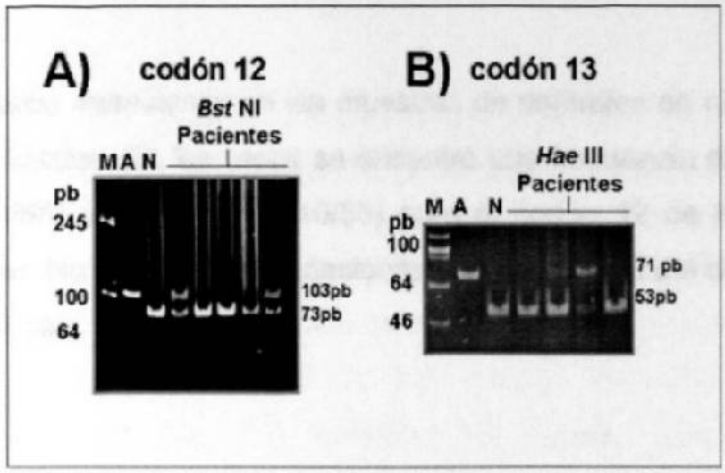

Figura 22. Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras. En ambas fotos, el gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. **A.** El producto de la PCR (103pb) obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Bst* NI que permite evidenciar mutaciones en el codón 12. La secuencia normal generó dos fragmentos al digerirse con la enzima (73 y 20pb). **B.** El producto de la PCR (73pb) obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Hae* III que permite evidenciar mutaciones en el codón 13. La secuencia normal generó dos fragmentos al digerirse con la enzima (53 y 20 pb).

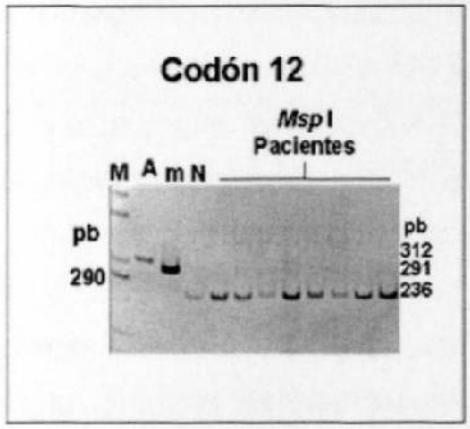

Figura 23. Detección de mutaciones en el codón 12 del oncogen H-ras. El gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. El producto de la PCR, obtenido a partir de DNA de pacientes y de controles, fue digerido con la enzima *Msp* I que permite evidenciar mutaciones en el codón 12. **M**: Marcador de peso molecular; **A**: Producto sin digerir (312pb); **m**: DNA con mutación (291 y 21 pb); **N**: DNA sin mutación (236 y 55pb).

5.2.3.5B Frecuencia de mutaciones en los oncogenes Ras.

No se encontraron mutaciones en las muestras de controles en ninguno de los 3 codones analizados. En los casos se encontró una frecuencia de mutaciones de un 3.5% (3/85) y de un 12% (10/85) para el codón 12 de K-ras y H-ras respectivamente. No se encontró mutaciones en el codón 13 del oncogen K-ras en ninguna muestra.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

A pesar de los esfuerzos de los programas de detección temprana del Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU), por diversas razones estas campañas en nuestro país no han sido muy eficaces y la enfermedad sigue siendo un importante problema de salud pública al ser la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Por ello se propuso realizar este estudio, para buscar encontrar factores causales del CaCU y examinar la posible asociación de la predisposición genética en la población mexicana.

Las pacientes analizadas en este estudio fueron captadas en los departamentos de Ginecología y Oncología del Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. durante un período de dos años y medio y a cada una de ellas se les pidió su autorización para la toma de las muestras. Del total de las muestras recolectadas (185) se dividieron en dos grupos: 85 correspondieron al grupo de casos y 100 al grupo de controles. La edad de las pacientes en el grupo de los casos va desde los 16 hasta los 78 años mientras que en el grupo control va desde los 27 hasta los 69 años.

El diagnóstico histopatológico efectuado en el grupo de casos nos reveló que el estadio de las lesiones encontradas es muy similar, siendo de 54% para cánceres en etapa de invasor y de un 46% en etapa de *in situ,* corroborando con esto que los programas de detección temprana en nuestro país presentan fallas que no permiten detectar todos los cánceres en etapas de *in situ* cuando el pronóstico del tratamiento es mucho más alentador.

El tipo de cáncer más frecuentemente encontrado en el grupo de casos fue el carcinoma escamoso con una frecuencia (93%) muy elevada en comparación con el 75-80% reportado en la literatura para otras poblaciones[12], mientras que la frecuencia para el adenocarcinoma (7%) está ligeramente inferior (10-34%)[12].

Estudios epidemiológicos realizados en otras poblaciones han demostrado que el inicio de la actividad sexual a edades muy tempranas, así como la presencia de múltiples compañeros sexuales y un número grande de gestas y partos está asociado a un mayor riesgo de padecer CaCU[13], [14], [15], [93]. Al comparar estos factores entre el grupo de casos y controles no se encontró diferencia significativa, concluyendo que al menos en la población analizada en este estudio, estos factores no contribuyen al riesgo de padecer CaCU.

El uso de anticonceptivos orales y el hábito de fumar en el grupo de casos y controles fue muy similar y no encontramos asociación entre estos factores y el CaCU en nuestra población, aún cuando en otros estudios se ha observado esta asociación[13], [94], [95].

El HPV es el único factor que se ha demostrado como una causa del CaCU en múltiples estudios alrededor del mundo, llegándose a encontrar una prevalencia de hasta un 99%[29], [96]. En nuestro estudio la detección de HPV se realizó utilizando un estuche que discrimina 27 tipos de HPVs (HPV Consensus PCR and Genotyping System). En nuestra población logramos detectar 15 tipos de HPVs diferentes, siendo los más frecuentes, el tipo 16 (63.5%) seguido del tipo 18 (11%), como lo son para todas las poblaciones en general. Dos de los 15 tipos de HPVs encontrados son de los no asociados al CaCU. Uno de ellos se encontró en una muestra del grupo control, sin embargo el HPV tipo11 que es

considerado como un tipo no oncogénico se encontró presente en una paciente con un diagnóstico histopatológico de CaCU *in situ*.

La prevalencia de HPV para el grupo de casos fue de 87.1%. Esta prevalencia es baja al compararla con las estadísticas obtenidas por estudios de grupos multicéntricos en los cuales se han estudiado diversas poblaciones (93-99%)[28], [29]. Sin embargo, es ligeramente superior a la reportada con anterioridad para población mexicana, la cual varía desde un 50 hasta un 80%[32], [33], [34]. En cuanto a la prevalencia de HPV en los controles, ésta fue de 4% y esta dentro del rango (1.5-20%), reportado en otras poblaciones[97]. Sin embargo, esta prevalencia es ligeramente inferior a la reportada para la población mexicana, la cual varía desde un 5 hasta un 31%[31], [32], [33], [34]. Es importante hacer hincapié de que las poblaciones analizadas son del centro de México. Creemos que esta variabilidad es debida a la metodología utilizada en los diversos estudios y no a las diferencias étnicas y geográficas.

En nuestro estudio encontramos en los casos un 5.9% de coinfecciones por 2 tipos de HPVs, este hallazgo ha sido reportado en diversos estudios con anterioridad[98], [99], [100], [101], [102] y en un estudio en población mexicana, la prevalencia de coinfecciones fue de un 8.7% en cánceres invasores[34].

La frecuencia de HPV fue mucho más alta en los cánceres invasores (95.7%) que en los cánceres *in situ* (76.9%), como debía de esperarse. La frecuencia de HPV 16 en los CaCU invasores fue de 65.9% mientras que para los CaCU *in situ* fue de 60%, esta frecuencia es mucho más alta al compararse con el estudio realizado por Hernández-Avila y cols.[33], quienes encontraron una frecuencia de 48.8 y 48.3% de HPV 16, respectivamente.

El HPV es un agente causal del CaCU por la alta frecuencia encontrada en los casos y no en los controles, sin embargo nos queda la duda de que si los CaCU HPV negativos realmente son negativos o si pudiera existir un diagnóstico molecular más sensible para detectar el genoma viral. La presencia de DNA de HPV en las muestras de CaCU ha sido claramente asociada a esta enfermedad, sin embargo se siguen buscando mecanismos por los cuales el HPV es capaz de transformar las células. Uno de estos mecanismos es la integración del DNA viral al genoma del huésped. La integración del virus permite la sobreexpresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 que interactúan desregulando el ciclo celular de la célula normal. Para poder llevarse a cabo la integración del virus requiere de la ruptura de los genes E1 y E2, por lo que en este estudio analizamos la integración basándonos en este mecanismo y observamos un 54.1% de integración total en la población de casos analizados (n=48, solo se analizaron los HPV tipo 16). La frecuencia de integración del HPV en el CaCU es muy variable de acuerdo a la población analizada, así como a la metodología usada (36-91%)[45, 59, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112]. En la población mexicana la frecuencia reportada con anterioridad de integración es de un 36% y 73%[45, 106].

Se ha observado que la frecuencia de integración se incrementa con el estadio de la enfermedad, ya que la frecuencia de integración en NIC es de 5-25%, mientras que en los CaCU invasores va desde 70-88% cuando se han analizado ambos tipos de muestras en un mismo estudio[108, 109, 110, 111]. Sin embargo, nuestros resultados demuestran lo contrario, ya que en nuestra población analizada la frecuencia de integración para el CaCU *in situ* es mucho mayor (68%) que la del CaCU invasor (45%). A pesar de observarse a simple vista una diferencia grande en las frecuencias, la estadística nos demuestra que esta diferencia no es significativa, sin embargo suponemos que si aumentamos el tamaño de la muestra pudiera volverse significativa y de esta manera estaríamos de acuerdo con estudios que asumen que la integración no se

encuentra asociada al estadio de la enfermedad[59], [112]. Al analizar estos resultados podemos concluir que la integración del HPV es una alteración genética que no se puede utilizar como marcador molecular con un valor pronóstico en la clínica de esta enfermedad.

Otro factor que se ha asociado al CaCU que es también dependiente del HPV, es la carga viral de éste, presente en el epitelio cervical. Son pocos los reportes y en la mayoría se concluye que la cantidad de virus encontrada en las muestras clínicas se incrementa al ir en aumento el estadio de los NIC[41], [42], [43], [44], sin embargo esta asociación no se observó en un estudio en el cual se analizaron muestras de carcinomas en diferentes estadios clínicos. En este estudio se observó una disminución en el número de copias al aumentar el estadio clínico (grado de invasión)[45]. Los estudios anteriores solo han encontrado esta asociación en las muestras infectadas por el HPV tipo 16 y no con los demás tipos de HPVs oncogénicos. Es por eso que en nuestro estudio sólo se analizaron las muestras positivas para HPV16 y la cantidad de copias virales detectadas es mucho menor ($1X10^2$-$9X10^3$ copias/μg) en comparación a lo detectado por Swan y cols.[41]. Nuestros resultados indican que en un 90% de los CaCU *in situ* se encontraron menos de 10 copias/100ng de DNA y solo en un 10% se detectó de 10-99 copias/100ng, y en los CaCU invasores un 54.5% presentaron menos de 10 copias/100ng, un 35% de 10-99 copias/100ng y un 10.5% de 100-999 copias/100ng de DNA. Estos resultados indican que existe un mayor número de muestras con diagnóstico de CaCU invasor con mayor cantidad de número de copias virales, sin embargo no nos permiten concluir contundentemente si la carga viral es un factor de riesgo de padecer el CaCU y si afecta a la progresión de la enfermedad. En cuanto al grado de invasión en las muestras con diagnóstico de CaCU invasor, no encontramos asociación entre el número de copias y el estadio clínico como lo observó Berumen y cols.[45].

A pesar de que el HPV es un agente causal del CaCU y de todos los factores inherentes asociados a los HPVs que han sido estudiados, se siguen buscando factores que permitan la regresión de la infección por HPV ó la progresión de la infección hasta producir un cáncer. Los factores intrínsecos de cada una de las pacientes son los que más se han estudiados y entre ellos está el MHC.

En cuanto a los alelos del MHC analizados en este estudio, se lograron detectar los 6 alelos detectados para los genes HLA-DQA y 21 genotipos diferentes distribuidos entre casos y controles homogéneamente y sin observarse asociación entre los alelos y genotipos de HLA-DQA y el CaCU.

Se encontraron 19 alelos de HLA-DQB distribuidos en la población analizada y encontramos que las pacientes que presentan el alelo HLA-DQB*0201 presentan un riesgo 2.29 veces mayor de presentar CaCU. Estos resultados no están de acuerdo con lo encontrado por Helland y cols.[51] en población noruega, donde se observó que el DQB*0201 está disminuido en pacientes con carcinoma de células escamosas del cérvix (SCCC). También observamos que las pacientes que presentan el alelo HLA-DQB*0602 tienen un factor protector contra el CaCU. Este alelo no ha sido anteriormente asociado al CaCU. Al analizarse los genotipos de HLA-DQB encontramos 78 genotipos diferentes distribuidos en nuestra población y no observamos asociación entre alguno de ellos y el CaCU.

Se analizaron los haplotipos DQA-DQB encontrándose 76 haplotipos diferentes y estadísticamente se demostró que las pacientes que presentan el haplotipo DQA-DQB*4-0602 presentan un factor protector. Teniendo 2.85 veces menos riesgo de presentar CaCU que las mujeres que no cuentan con este haplotipo. Este haplotipo no ha sido asociado al CaCU en otras poblaciones.

Otros alelos analizados en este estudio correspondieron a los alelos DR3 y DR4 sin encontrarse asociación con el CaCU. En un estudio previo en población mexicana se encontraron incrementadas las frecuencias de HLA-A2 y DR5, mientras que DR6, DR2 y DR1 estaban disminuidas en pacientes con CaCU, sin embargo no se analizó DR3 y DR4.

En cuanto a la susceptibilidad conferida por el MHC podemos concluir que el alelo HLA-DQB*0201 y el haplotipo DQA-DQB*4-0602 son un factor de riesgo en nuestra población, así como el alelo DQB*0602 es un factor protector.

Otro factor intrínseco ha estado en controversia desde 1998, cuando Storey y cols. asociaron el polimorfismo Arg/Arg del codón 72 del gen p53 a un riesgo mayor de padecer CaCU en pacientes infectados por HPV. El análisis de este polimorfismo en nuestro estudio no representa un factor de riesgo de padecer CaCU y estos resultados concuerdan con todos los estudios que estuvieron en contra de los resultados de Storey[51, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72]. Sin embargo, al analizar los resultados histopatológicos de cada uno de los tumores, así como la presencia o ausencia de infección por HPV, encontramos una diferencia significativa en cuanto al polimorfismo Pro/Pro y las pacientes con CaCU de células escamosas positivos para HPV tipo 16. Esta asociación confiere un RR de 3.8 a las mujeres que presentan el polimorfismo Pro/Pro infectadas con HPV 16 de desarrollar el CaCU de células escamosas en comparación de las pacientes que presentan el polimorfismo Arg/Arg. También se encontró un RR de 4.42 al compararse con las pacientes que tienen el polimorfismo Arg/Arg+Arg/Pro. Esta asociación es muy interesante debido a que se opone a lo propuesto originalmente por Storey y cols.[55] y ya anteriormente se ha observado en otros estudios, en donde se han clasificado los tumores histopatológicamente, sin encontrarse asociación[61, 113, 114].

En cuanto a estos resultados es necesario tomar en cuenta lo estudios realizados por Makni y Malcom y cols.[56], [65] que sugieren que la asociación del genotipo Arg y la carcinogénesis cervical está influida por variaciones en la metodología utilizada en los diferentes laboratorios

Por ultimo, es importante analizar los resultados obtenidos de la frecuencia de mutaciones en los oncogenes K- y H-ras que han sido asociados a diferentes tipos de cánceres y por consiguiente al CaCU. En nuestra población la frecuencia de mutaciones encontradas (3.5% y 12% en el codón 12 de K-ras y H-ras, respectivamente) es similar a las encontradas en la mayoría de los reportes (24% las más altas en ambos oncogenes)[79], [80], [81], [82]) y encontramos mutaciones en el codón 13 del oncogen K-ras. Podemos concluir que en nuestra población las mutaciones en los oncogenes ras son un evento adicional al CaCU y no precisamente la causa de éste.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Los hallazgos del presente trabajo, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se detectaron 15 tipos de HPV y el tipo más común fue el 16 (63.5%). Se detectaron coinfecciones por 2 tipos de HPVs.

2. La frecuencia de HPV para casos fue de 87% y para controles de 4%.

3. La integración de HPV 16 se presentó en igual proporción en el CaCU invasor que en el CaCU *in situ* y no se encontró asociación entre la integración del HPV-16 y el grado de invasión del CaCU.

4. El HPV-16 presenta una mayor carga viral en el CaCU invasor que en el CaCU *in situ* y no se encontró asociación entre la carga viral y el grado de invasión del CaCU.

5. No se encontró asociación entre los alelos y genotipos de DQA, genotipos de DQB y los alelos de DR3 y DR4 en nuestra población.

6. El alelo DQB*0201 es un factor de riesgo y el DQB*0602 es un factor protector en el CaCU en la población mexicana.

7. El haplotipo DQA-DQB*4-0602 es un factor protector en el CaCU en la población mexicana.

8. El polimorfismo Pro/Pro del codón 72 del gen p53 es un factor de riesgo en la pacientes HPV-16 de padecer CaCU de células escamosas.

9. La frecuencia de mutaciones en el codón 12 del oncogen H-ras en CaCU es de 12% y del oncogen K-ras es de 3.5%.

10. Los factores extrínsecos analizados en este estudio no pueden ser utilizados como marcadores moleculares para el CaCU.

11. Los factores intrínsecos: 1) alelo DQB*0201, 2) DQB*0602, 3) haplotipo DQA-DQB*4-0602 y 4) el polimorfismo Pro/Pro del codón 72 del gen p53 pudieran ser utilizados como marcadores moleculares predictivos para el CaCU.

12. La información encontrada en este estudio aporta datos importantes a la epidemiología molecular del CaCU en nuestro país

CAPÍTULO VIII

PERSPECTIVAS

Analizando el trabajo en su conjunto, sus hallazgos, alcances y sus contribuciones tanto metodológicas como de carácter epidemiológico a nivel molecular, podemos plantear la siguiente perspectiva:

El contar con el banco de DNA genómico de las pacientes con y sin CaCU nos permitirá realizar estudios para analizar nuevos marcadores moleculares que permitan en un futuro identificar mujeres con riesgo de desarrollar CaCU con el fin de lograr mejoras preventivas, diagnósticas y posibles cambios en decisiones terapéuticas.

REFERENCIAS

[1] Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de México (1999). Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 15-28.

[2] Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de México (1999). Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 15-28.

[3] Connie HY (1997). Fundamentals in Oncology, Part 1. section 1:11, 25-45.

[4] http://www.egap.nci.nih.gov/. OMIM 603956.

[5] De la Chapelle A, Peltomaki P (1995). Genetics of hereditary colon cancer. Annu Rev Genet 29:329-348.

[6] Weinberg RA (1994). Molecular Mechanisms of Carcinogenesis. En: Leder P, Clayton DA, Rubinstein E (editores). Scientific American. Introduction to Molecular Medicine. Scientific American Inc., New York, 253-276..

[7] Estadísticas Vitales (1997). Principales Causas de Mortalidad General. SSA.

[8] Landis SH, Murria T, Bolden S, Wingo PA (1998). Cancer Statistics 1998. CA Cancer J Clin 48:6-29.

[9] Muñoz N, Bosh X. (1996). Bulletin PAHO 30:362-377.

[10] Restrepo H, González J, Roberts E y cols. (1987). Epidemiology and control of cancer of the cerviz uterine in Latin America and Caribbean. Bol Oficina Sanit Panam 102:578-592.

[11] Cho KR (2001). Cervical Cancer. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D (editores). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill Companies. 1105-1112.

[12] Tenorio-González F (2000). Cáncer invasor del cérvix. En Ahued-Ahued JR y Fernáncez del Castillo- C (editores). Ginecología y Obstetricia Aplicadas. JGH Editores, S.A. de C.V. 347-350.

[13] Muñoz N, Bosch FX (1989). Epidemiology of cervical cancer. En Muñoz N, Bosch FX, Jensen OM (editores). Human papillomavirus and cervical cancer. Vol 94. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 9-40.

[14] Schneider A, Koutsky L (1992). Epidemiolgy of Cervical Cancer and of HPV infection. En Muñoz N, Bosch FX, Shah KV and Meheus A (editors). Epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. Vol 119. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 3-53.

[15] Stern Peter L, Stanley Margaret A (1994). Human Papillomaviruses and *Cervical Cancer. Biology and Inmunology* 4:72-87.

[16] Schneider A 1994 Natural history of genital papillomavirus infections. Intervirology 37:201-214.

[17] Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S (1994). CA Cancer J Clin 44:7-26.

[18] Cho KR (1998). Cervical Cancer. En Vogelstein B, Kinzler KW (editors). The Genetic Basis of Human Cancer, 631-637.

[19] Krebs HB (1994). Lesiones premalignas del cuello uterino. En Copeland LJ, Jarnell JF (editores). Ginecología, 932-960.

[20] Disaia PS, Creasman WT (1994). Enfermedad del cuello uterino. Ginecología Clínica, 1-36.

[21] González de León C, Kudelka AP, Edwards CL, Kavanagh JJ (1993). Carcinoma of the Uterine Cervix. Medical Oncology 255-270.

[22] Harald Sur Hausen (1991). Viruses in Human Cancers. Science 167:1173-1179.

[23] Thomas M, *Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G.* (1999). Two polimorfic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. Mol Cell Biol 19:1092-1100.

[24] Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM (1992). Interactions of HPV E6 y E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. Cancer Surv, 197-217.

[25] Cordon-Cardo C (1995). Mutation of Cell Cycle Regulators, Biological and Clinical Implications for Human Neoplasia. Am J Pathol, 545-560.

[26] Matlashewski G (1989). The Cell Biology of Human Papillomavirus Transformed Cells. Anticancer Research 1447-1556.

[27] Guido M, Zamorano R, Garrido E, Gariglio P, Garcia A (1992). Early promoters of genital and cutaneous HPVs are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene producto. J General Virol 1395-1400.

[28] Bosch FX, Manos MM, Muñoz N et al (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. J Natl Cancer Inst 87:796-802.

[29] Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ et al (1997). A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. J Clin Microbiol 35:791-795.

[30] González-Garay ML, Barrera-Saldaña HA, Avilés LB, Alvarez-Salas LM, Gariglio P (1992). Prevalence in two mexican cities of human papilomavirus DNA sequences in cervical cancer. Rev Inv Clín 44:491-499.

[31] Tamayo-Legorreta EM, Echaniz-Aviles G, Cruz-Valdez A, Camacho-Alcantara G, Calderon-Jaimes E (1993). Human papillomavirus infection in women with and without abnormal cervical cytology. Ginecol Obstet Mex 61:27-34.

[32] Berumen J, Miranda EI, Zafra G, Casas L, Segura E, Ordoñes RM, Aguirre J, Martínez M, Rosas A, Ibarra V, Pedraza L, Saad A, Marroquin A, Gutiérrez M, Martínez A, Gariglio P (1997). Epidemiología molecular de cánceres de alta incidencia en México. Gac Méd Méx. Vol. 133; Suplemento 1:35-41.

[33] Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce EC, Berumen-Campos J, Cruz-Valdez A, Alonso de Ruiz PP, González-Lira G (1997). Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-control study. Arch Med Res 28:265-271.

[34] Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV (1998). HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. Gynecol Oncol 70:115-20.

[35] Antonio V, Zamudio N, Terán MA, Jiménez MA, Flores E, Alarcón LC, Leyva MA, Illades-Aguilar B (1998). Virus del papiloma humano y lesión intraepitelial cervical: un estudio de casos y controles en el estado de Guerrero. Memorias

del Congreso de la Asociación Mexicana de Biología Molecular en Medicina. 0I-04

[36] Antonio V, Zamudio N, Terán MA, Jiménez MA, Flores E, Alarcón LC, Leyva MA, Illades-Aguilar B (1998). Prevalencia de los genotipos del virus del papiloma humano en pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales en el estado de Guerrero. Memorias del Congreso de la Asociación Mexicana de Biología Molecular en Medicina. 0IN-03.

[37] Bello M, Cruz MR, Carrerón MA, Alarcón LC, Flores E, Leyva MA, Illades-Aguilar B (1998). Prevalencia del virus del papiloma humano en meretrices y en mujeres que asisten a la detección oportuna de cáncer cérvico uterino en el estado de Guerrero. Memorias del Congreso de la Asociación Mexicana de Biología Molecular en Medicina. PD-05.

[38] Jeon S, Lambert PF (1995). Integration of HPV-16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6/E7 mRNAs: implication for cervical carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 92:1654-1658.

[39] Ocadiz R, Sauceda R, Salcedo M, Ortega V, Rodríguez H, Gordillo E, Chavez P, Gariglio P (1989). Ocurrence of human papillomavirus type 16 DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uteri-cervix carcinoma. Arch Invest Med (Mex) 20:355-362.

[40] Koopman LA, Szuhai K, van Eendenburg JD, Bezrookove V, Kenter GG, Schuuring E et al (1999). Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45 and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines. Cancer Res 59:5615-5624.

[41] Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP (1999). Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. J Clin Microbiol 37:1030-1034.

[42] van Duin M, Snijders PJ, Schrinjnemakers F, Vooehorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuia mA, van den Brule AJ, Verheijen RH, Helmerhorst JJ, Meijer CJ (2002). Human papillomavirus 16 load in normal y abnormal cervical scrapes : an indicator of CIN II/III and viral clearance. Int J Cancer 98 :590-595.

[43] Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubb A, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllensten UB (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinan for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. Lancet 355:2189-2193.

[44] Sun Ca, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY (2002). Viral Load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. Int J Gynecol Obstet 76:41-47.

[45] Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, García-Carranca A (1994). Genome amplification of Human Papillomavirus type 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. Int J Cancer 56:640-645.

[46] Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Köel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kuhnle H, Schedel I (1994). Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. Int J Cancer 57: 836-840.

[47] Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR (2001). Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. J of Medical Virology 64:550-559.

[48] Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2001). Inmunología Celular y Molecular. Capítulo 5. El complejo principal de Histocompatibilidad. 104-123.

[49] Helland A, Borresen AL, Kristensen G, Ronningen KS (1994). DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: relationship to human papillomavirus infection and prognosis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 3:479-486.

[50] Montoya L, Saiz I, Rey G, Vela F, Clerici-Larradet N (1998). Cervical carcinoma: human papillomavirus infection and HLA-associated risk factors in the Spanish population. Eur J Immunogenet 25:329-337.

[51] Helland A, Olsen AO, Gjoen K, Akselsen HE, Sauer T, Magnus P, Borresen-Dale AL, Ronningen KS (1998). An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II-III among human papillomavirus positive patients with the HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotype: Apopulation-based case-control study of Norwegian women. Int J Cancer 79:19-24.

[52] Apple RJ, Erlich HA, Klintz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM (1994). HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. Nature Genetics 6:157-162.

[53] Ferrera A, Olivo A, Alaez C, Melchers WJG, Gorodezky C (1999). HLA DQA1 and DQB1 loci in Honduran women with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma and their relationship to human papillomavirus infection. Human Bioloby 71:367-379.

[54] Silva B, Vargas-Alarcon G, Zuñiga-Ramos J, Rodriguez-Reyna TS, Hernandez-Martinez B, Osnaya N, Kofman S, Torres-Lobaton A, Gran J (1999). Genetic features of Mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. Hum Pathol 30:626-628.

[55] Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol d, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. Nature 393:229-234.

[56] Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski G (2000). P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. Int H Cancer 87:528-533.

[57] Zhbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M (2001). p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. Cancer Res 61:608-615.

[58] Szarka K, Veress G, Kónya J, Gergely L (1999). Frequency of p53 codon 72 genotypes in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. Anticancer Res 19:2377-2382.

[59] Szarka K, Veress G, Juhasz A, Konya J, Sapy T, Soos G, Hernadi Z, Gergely L (2000). Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers. Anticancer Res 20:2161-2167.

[60] Bertorelle R, Chieco-Bianch L, Del Mistro A (1999). Papillomavirus and p53 codon 72 polymorphism. Int J Cancer 82:616- 620.

[61] Giannoudis A, Graham DA, Southern SA, Herrington CS (1999). P53 codon 72 Arg/Pro polymorphism is not related to HPV type or lesion grade in low- and high-grade squamous carcinoma of the cervix. Int J Cancer 83:66-71.

[62] Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature 396:530-536.

[63] Josefsson AM, Manusson PKE, Ylitalo N, Quarforth-Tubbin P, Pontén Jan, Adami HO, Gyllensen UB (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature 396:531-535.

[64] Hayes VM, Hofstra RMW, Buys CHCM, Holleman H, van der Zee AGJ (1998). Homozygous arginine-72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. Lancet 353:1756-1762.

[65] Malcom EK, Baber GB, Boyd JC, Stoler MH (2000). Polymorphism at codón 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. Mol Pathol 13:373-378.

[66] Ngan HY, Liu VW, Liu SS (1999). Risk of cervical cancer is not increased in Chinese carrying homozygous arginine at codon 72 of p53. Br J Cancer 80:1828-1832.

[67] Minaguchi T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y (1998). No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection. Cancer Research 58:4585-4590.

[68] Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, Ishikawa M (1999). Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. Carcinogenesis 20:1733-1736.

[69] Wang NM, Tsai CH, Yeh KT, Chen SJ, Chang JG (1999). P53 codon 72Arg polymorphism is not a risk factor for carcinogenesis in the Chinese. Int J Mol Med 4:249-253.

[70] Klaes R, Ridder R, Schaefer U, Benner A, von Knebel Doeberitz M (1999). No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus-associated cervical cancer. J Mol Med 77:299-303.

[71] Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ (1998). p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. Lancet 352:871-874.

[72] Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC, Schwartz P, Mortel R, Barnes W, Greenberg M, McGowan L, Scott DR, Martin M, Herrera JE, Carrington M (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature 396:531-534.

[73] Matlashewski G (1989). The Cell Biology of Human Papillomavirus Transformed Cells. Anticancer Research 9:1447-1556.

[74] Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM (1992). Interactions of HPV E6 y E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. Cancer Surv 12:97-217.

[75] McCornick F (1989). Ras oncogenes, in Oncogenes and Molecular Origins of Cancer. Winberg R (editor), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY Pag. 125-145.

[76] Bos JL (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res 49:4682-46897.

[77] Martínez-Garza SG, Núñez-Salazar AJ, Calderón-Garcidueñas AL, Bosques-Padilla FJ, Niderhauser-García A, Barrera-Saldaña HA (1999). Frequency and clinicopathology associations of K-ras mutations in colorectal cancer in a northeast Mexican population. Dig Dis 17:225-229.

[78] Wong YF, Chung TKH, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AMZ (1995). Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. Cancer Letters 95:29-32.

[79] O'Leary JJ, Landers RJ, Silva I, Uhlmann V, Crowley M, Healy I, Luttich K (1998). Molecular analysis of ras oncogenes in CIN III and in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. J Clin Pathol 51:576-82.

[80] Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY (1996). Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. Gynecol Oncol 62:49-54.

[81] Grendys EC Jr, Barnes WA, Weitzel J, Sparkowski J, Schlegel R (1997). Identification of H, K, and N-ras point mutations ins stage IB cervical cancer. *Gynecol Oncol 65:343-347.*

[82] Riou G, Barrois M, Sheng ZM, Duvillard P, Lhomme C (1988). Somatic deletions and mutations of c-Ha-ras gene in human cervical cancers. Oncogene 3:329-333.

[83] FIGO Shepherd JH. (1996). Cervical and vulva cancer : changes in FIGO *definitions of staging. Br J Obstet Gynaecol 103:405.*

[84] Sambrook J, Fristsch EF y Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.

[85] Tyan YS (1993). Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in head and neck tumors. J Clin Microbiol 31:53-56.

[86] *Helmuth R, Fildes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R, Gorodezky C,* Stoneking M, Schmill N, Klitz W, Higuchi R, Erlich H (1990). HLA-DQa allele and genotype frequencies in various human populations, determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes. American Journal of Human Genetics 47:515-523.

[87] Olerup O, Aldener A, Fogdell A (1993). *HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR* amplification with séquense-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. Tissue Antigens 41:119-134.

[88] Olerup (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours : an alternative to serological DR typing in clinical practice including conor-recipient *matching in cadaveric transplatation. Tissue* Antigens 39: 225-235.

[89] Shibata D, Almoguera C, Furrecteric A, Dunitz J, Martin SE, Cosgrove M, Perucho M, Arnheim N (1990). Detection mutational activation of the c-K-ras gene in human pancreatic adenocarcinoma. Balliere Clin Gastroenterol 4:151-169.

[90] Kumar R, Dunn LL (1989). Designed diagnostic restriction fragment length polymorphisms for the detection of point mutation in ras oncogenes. Oncogene Res 4:235-241.

[91] Wong YF, Chung TKH, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AMZ (1995). Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. Cancer Letters. 95:29-32.

[92] Roff DA, Bentzen P (1989). The statistical analisis of mitochondrial DNA polymorphism: X^2 and the problem of small sample. Mol Biol Evol 6:539-545.

[93] Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multricentric case-control study. Lancet 359:1093-1101.

[94] Muñoz N, Bosch FX. HPV and cervical neoplasia. Review of case-control and cohort studies (1992). IARC Sci Publ 19:251-261.

[95] Santos C, Muñoz N, Klug S, almonte M, Guerrero I, Alvarez M, Velarde C, Galdos O, Castillo M, Walboomers J, Meijer C, Caceres E (2001). HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. Br J Cancer 85:966-971.

[96] Walboomers JM, Jabos MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 189:12-19.

[97] Prevalence (1999). En: Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, van Ballegooijen M, van den Akker E (editors). A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical scrrening programme. Health Technology Assessment 51-62.

[98] Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR (2001). Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. J of Medical Virology 64:550-559.

[99] Griffin NR, Bevan IS, Lewis FA, Wells M, Young LS (1989). Demosntration of multiple HPV types in normal cervix and in cervical squamous cell carcinoma using the polymerase chain reaction on paraffin wax embedded material.

[100] Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan Te, Franco EL (2001). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. J Infect Dis 184:1508-1517.

[101] Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM (1998). Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by single-hybridization, reverse line blot detection method. J Clin Microbiol 36:3020-3027.

[102] Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. J Clin Microbiol 38:357-361.

[103] Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001). Physical state of HPV 16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. Diagn Mol Pathol
10:46-54.

[104] Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar G, Johansson B (1998). Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. Int J Gynecol Pathol 17:146-153.

[105] Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, Kodama J, Itoh S, Sakai H, Kudo T (1999). Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. Journal of Clinical Microbiology 37:3514-3517.

[106] Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, López N, Guido M, Berumen J (1999). Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. Int J Cancer 83:449-455.

[107] Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR (2002). Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia and New Caledonia. Int J Cancer 97:868-874.

[108] Cullen AP, Reids R, Campion M, Lorincz AT (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraephitelial and invasive cervical neoplasm. J Virol 65:606-612.

[109] Pirami L, Giache V, Becciolini A (1997). Analysis of HPV 16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. J Clin Pathol 50:600-604.

[110] Luft F, Klaes R, Nees M, Dürst M, Heilmann V, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M (2001). Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. Int J Cancer 92:9-17.

[111] Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK (1992). Analysis by polimerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. J Gen Virol 73: 2327-2336.

[112] Vernon SD, Unger ER, Miller DL, Lee DR, Reeves WC (1997). Association of human paillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. Int J Cancer 74:50-56.

[113] Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Daling JR, Galloway DA, Wip Carter JJ, McKnights B. McDougall JK (2000). The p53 Arg72Pro polymorphism, human papillomavirus, and invasive squamous cell cervical cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:225-227.

[114] Pegoraro R, Moodley J, Naiker S, Lanning P, Rom L (2000). The p53 codon 72 polymorphism in black South African women and the risk of cervical cancer. BJOG 107:1164-1165.