



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y POLIMORFISMOS DEL GEN *TP53* EN
CÁNCER CERVICAL UTERINO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA**

M. en C. Patricia Piña Sánchez

Tutor de tesis: Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Co-Tutoria

Dra. Patricia Ostrosky Wegman

Dr. Alfonso Dueñas González

México D.F. JUNIO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA
GENÓMICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
ONCOLÓGICAS DEL CMN S XXI Y EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION
BIOMÉDICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA.**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ CON FINANCIAMIENTO POR PARTE DEL
CONACYT CON NÚMERO 7114**

**AGRADEZCO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO DGEP Y
AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA LAS BECAS
OTORGADAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.**

**AGRADEZCO AL IMSS LAS FACILIDADES OTORGADAS DURANTE EL
DESARROLLO DE ESTE TRABAJO**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mauricio Salcedo, director de la tesis, por el tiempo invertido en mi formación académica y por reconocer mi trabajo en el tiempo que estuve en su laboratorio.

A la Dra. Patricia Ostrosky, por todo el apoyo mostrado a lo largo del desarrollo de este trabajo, y sobre todo porque a pesar de sus múltiples ocupaciones siempre mostró interés en la culminación de este trabajo.

Al Dr. Alfonso Dueñas, por las facilidades otorgadas en su laboratorio para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Marisol López, Dr. Ignacio Camacho, Dr. Vicente Madrid y Dr. Emilio Rojas, por los valiosos comentarios, críticas y sugerencias en la revisión de la tesis.

A la Dra. Lucía Taja por compartir su experiencia y su apoyo para el desarrollo de este trabajo y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Dulce Hernández por su ayuda en la colecta de las muestras y asesoría en el análisis estadístico.

Al Dr. Ricardo Cerda por su ayuda en el análisis estadístico.

A mis amigos por orden de antigüedad Sandra, Adriana, More, Jessica, Dulce, Jake, Karla, Brenda, por compartir mis frustraciones y por alentarme a seguir adelante.

Agradezco infinitamente a mis padres por su apoyo al cuidar a mis hijas cuando fue necesario.

A mis hijas Citlalli y Emilia, quiero decirles que las amo y que seguiré trabajando para ser una mejor persona y para estar más tiempo a su lado.

A Federico gracias por estar con mis niñas, por sus críticas y por compartir el trabajo académico y doméstico.

INDICE

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Histología y anatomía del cérvix uterino	1
1.2 Epidemiología e historia natural del cáncer cérvico-uterino	3
1.3 Etiología del cáncer cérvico-uterino: VPH	8
1.4 Virus de Papiloma Humano	15
1.5 Gen supresor de tumor <i>TP53</i>	18
1.5.1 Descripción	20
1.5.2 Regulación de <i>TP53</i>	21
1.5.3 Modificaciones post-traduccionales y activación	22
1.5.4 Vías y genes regulados por <i>TP53</i>	25
1.5.5 Familia de <i>TP53</i>	26
1.5.6 <i>TP53</i> y cáncer	27
1.5.7 Síndrome Li-Fraumeni	30
1.5.8 Polimorfismos de <i>TP53</i>	30
2.0 ANTECEDENTES DIRECTOS	
2.1 Oncoproteína E6 y <i>TP53</i>	33
3.0 JUSTIFICACIÓN	37
4.0 HIPÓTESIS	38
5.0 OBJETIVOS	38
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1 Muestras biológicas	39
6.2 Diseño experimental	39
6.2.1 Extracción de DNA	43
6.2.2 PCR de <i>TP53</i>	43
6.3 Detección de polimorfismos	44
6.3.1 Detección de polimorfismos de <i>TP53</i> mediante DHPLC	44

6.3.2 Detección de polimorfismos de <i>TP53</i> mediante restricción enzimática <i>Surveyor</i>	45
6.3.3 Secuenciación	46
6.4 Detección de VPH	46
6.5 Análisis estadístico	47
7.0 RESULTADOS	48
7.1 Detección y tipificación de VPH	48
7.1.2 Características clínicas	50
7.2 Detección de polimorfismos del exón 4 de <i>TP53</i> y características clínicas	51
7.2.1. Características clínicas	51
7.2.2. Polimorfismos del exón 4 de <i>TP53</i>	53
7.2.3 Asociación de polimorfismo del exón 4 y VPH	57
7.2.4. Análisis de sobrevida	58
7.3 Análisis cromatográfico y de secuenciación de los exones 5 y 6 de <i>TP53</i>	59
7.4 Análisis cromatográfico y de secuenciación de los exones 7 a 9 de <i>TP53</i>	62
7.5 Polimorfismos identificados en <i>TP53</i>	65
8.0 DISCUSIÓN	72
8.1 Factores clínicos	72
8.2. Detección y tipificación de VPH	75
8.3 Polimorfismos del exón 4 de <i>TP53</i>	79
8.4. Cambios en la región de los exones 5 a 9 de <i>TP53</i>	82
9.0 CONCLUSIONES	88
10. BIBLIOGRAFÍA	89
13. ANEXO 1	A1
14. ANEXO 2	A2

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El cáncer cérvico-uterino (CC) es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la población femenina en México. El Virus de Papiloma Humano (VPH) es un factor necesario, más no suficiente para el desarrollo de CC. Uno de los principales mecanismos de carcinogénesis en CC es la inactivación de TP53 causada por la oncoproteína viral E6 de VPH. El objetivo del presente estudio fue identificar los tipos virales de VPH, así como los polimorfismos de TP53, como factores de susceptibilidad genética asociados con el desarrollo de CC.

MATERIALES Y METODOS. Se obtuvieron muestras de DNA de sangre periférica de casos de CC y controles con el fin de identificar polimorfismos de TP53 en los exones 4 al 9, mediante la técnica de cromatografía líquida parcialmente desnaturalizante (DHPLC) y secuenciación. Se obtuvieron cepillados cérvico-vaginales para determinar la presencia de VPH por PCR y secuenciación.

RESULTADOS. En muestras control, la frecuencia de VPH fue semejante a lo reportado a nivel mundial (12%-24%) aunque 70% de los VPH fueron de alto riesgo. La frecuencia de VPH58 y VPH31 fue mayor a lo reportado a nivel mundial. VPH16 fue el de mayor frecuencia en CC. Con relación a TP53, se analizó una región de 1,747pb (exon 4 al 9) y se identificaron 27 variaciones en la secuencia del DNA: 3 fueron SNPs en la región codificante, 3 mutaciones en la región codificante, 9 SNPs en región no-codificante, así como 12 cambios en regiones no codificantes, no reportados previamente. De todos estos cambios, sólo el codón 72 mostró diferencias significativas entre casos y controles ($p < 0.05$, $RM = 0.542$ IC 95% 0.31-0.93). Sugiriendo que el genotipo 72Arg/Arg es un factor de protección para el desarrollo de CC, en contraste con lo reportado a nivel mundial. Sin embargo, el análisis de casos mostró una asociación con VPH16 y/o VPH18 con el genotipo Arg/Arg ($p = 0.023$, $RM = 2.59$ IC 95% 1.10-6.09); así como una tendencia de menor supervivencia ($x = 24.13$ meses v.s. $x = 26.05$ meses) en comparación con las pacientes con genotipos Arg/Pro, las cuales se asocian a infección con tipos virales diferentes de VPH16 y VPH18. Estos datos sugieren la asociación entre la infección de VPH16 y VPH18 de alto riesgo en pacientes con el genotipo Arg/Arg, con el riesgo a desarrollar CC. Adicionalmente, se identificaron 2 SNPs en el intrón 7 con alta frecuencia, aunque el significado biológico de éstos actualmente se desconoce.

CONCLUSIONES: Estos datos sugieren la detección de VPH de alto riesgo como prueba de tamizaje adicional, ya que un alto porcentaje de mujeres con reporte de Papanicolaou negativo presentan infección por VPH de alto riesgo (infección subclínica). Adicionalmente la relativa alta frecuencia de VPH58 y VPH31 detectada en la población mexicana, sugiere la incorporación de la protección contra dichos virus en las vacunas. Finalmente, se sugiere que la infección por VPH16 y VPH18 y el genotipo 72Arg/Arg son factores ambientales y genéticos asociados con la progresión del CC. Se identificaron SNPs en regiones no codificantes, aunque actualmente se desconoce el papel funcional de éstos. El presente trabajo aportó información sobre los tipos de VPH presente en las diferentes lesiones de la progresión del CC, así como el primer reporte bien documentado sobre la descripción de variaciones en la secuencia del gen TP53 en la población mexicana mostrando que TP53 presenta más cambios que los previamente reportados, apoyando el papel de SNPs en cáncer CC.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Cervical cancer (CC) is the second cause of death by malignancies in the female population of Mexico. The Human Papilloma Virus (HPV) is necessary factor, but not sufficient for the development of CC. The major mechanism of carcinogenesis in CC is the inactivation of TP53 by E6 viral oncoprotein. The aim of this study was to identify the HPV types and TP53 polymorphisms as genetic susceptibility factors for the development of CC. **MATERIALS AND METHODS.** It is a cases-controls study, the DNA from peripheral blood were used to identify polymorphisms of TP53 exons 4 to 9, through denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), as well as cervical smears for the presence of HPV using PCR and sequencing methods.

RESULTS. In control samples, the frequency of HPV was similar to worldwide reports (12%-24%) being 70% of high risk HPV types. The frequency of HPV58 and HPV31 was relatively higher than that previously reported at worldwide. HPV16 was the most frequent in CC. We analyzed a 1,747 bp region (exon 4-9) of TP53. We identified a total of 27 variations in the DNA sequence: three SNPs in the coding region, three mutations in coding region, nine SNPs in noncoding region, and 12 changes in noncoding regions previously unreported. Only the 72Arg/Arg genotype showed significant differences in CC respect to control subjects ($p < 0.05$, OR=0.542 CI 95% 0.31-0.93), suggesting as possible protective factor for development of CC. However, analysis of CC showed association with HPV16 and/or HPV18 and Arg/Arg genotype ($p = 0.023$, OR=2.59 CI 95% 1.10-6.09) as well as a tendency of lower survival (24.13 months vs. 26.5 months) compared to patients with Arg/Pro genotype, which in turn are associated with another HPVs different to HPV16 and HPV18 types. These data suggest the association between HPV16/HPV18 infection and Arg/Arg genotype with risk to develop CC. We identified two SNPs in intron 7 with high frequency, although their biological significance is currently unknown.

CONCLUSIONS: We suggest the detection of high risk HPV as an additional screening test, due to a high percentage of women with negative Pap smear and HPV high risk infection (subclinical infection). The incorporation of HPV31 and 58 vaccine is needed to strength a protection in the Mexican population. Finally, we suggest that infection with HPV16 or HPV18 and 72Arg/Arg genotype as environmental and genetic factors associated with the progression of CC. We identified SNPs in non-coding regions, although functional role is unknown. This work provided information about the types of HPV in cervical lesions, and is the first well-documented report on the description of the sequence variations in the TP53 gene in Mexican population with CC, showing that TP53 have more changes than the previously reported and support the role of polymorphisms in CC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Histología y anatomía del cérvix uterino.

El cuello uterino es la parte fibromuscular inferior del útero, es de forma cilíndrica o cónica, mide de 3 a 4 cm. de largo y 2,5 cm. de ancho, aunque el tamaño varía dependiendo de la edad, embarazos y la fase del ciclo menstrual. La mitad inferior del cuello uterino, llamada porción vaginal, penetra en la vagina por su pared anterior, mientras la mitad superior queda por encima de la vagina (**figura 1**).

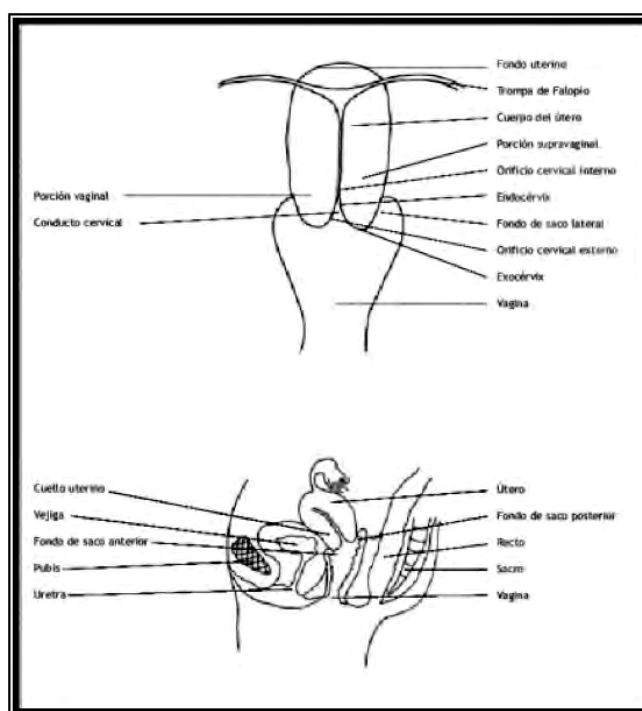


FIGURA 1. Anatomía macroscópica del cuello uterino. Tomado de <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=1>.

El conducto cervical desemboca en la vagina por el orificio cervical externo. La porción exterior del cuello se denomina exocérvis y es la porción más visible del cérvix y la porción del cuello uterino interior al orificio externo se denomina endocérvis. El estroma del cuello uterino consiste en un tejido denso, fibromuscular, atravesado por un plexo vascular, linfático y nervioso.

El exocérnix está constituido por 15 a 20 capas de células epiteliales no queratinizantes que contienen glucógeno. Histológicamente en el fondo se presenta una capa de células basales redondas, con núcleos grandes, cromatina densa y escaso citoplasma, las cuáles están adheridas a la membrana basal separando al epitelio del estroma. Puede presentar proyecciones llamadas papilas e invaginaciones (**figura 2**).

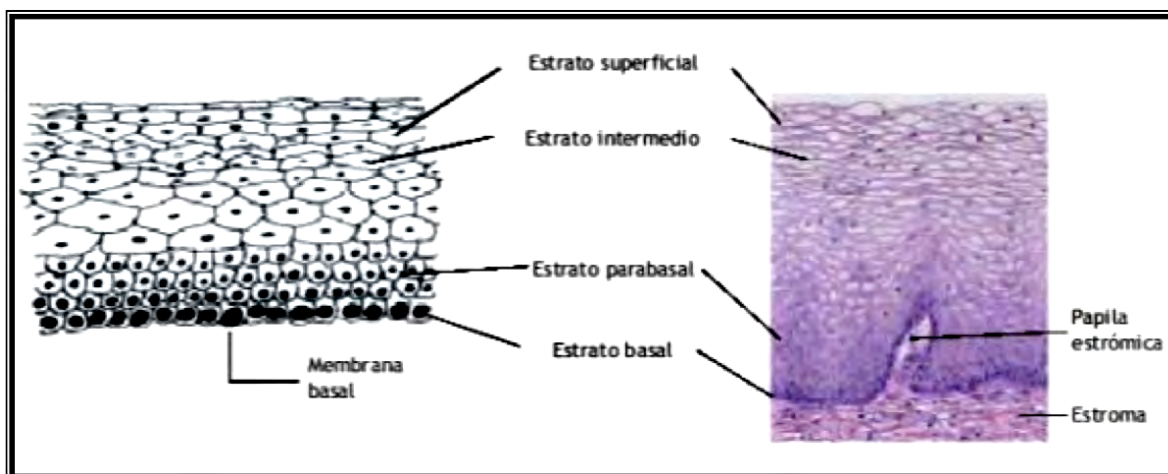


Figura 2. Epitelio exocervical. Esquema de la citoarquitectura del epitelio cervical uterino, donde se muestran las capas basal parabasal y superficial. A la derecha microfotografía de la histología del epitelio exocervical. 20X. (Tomado y modificado de <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=1>.)

Las células basales se dividen y maduran para formar las siguientes capas celulares, denominadas células parabasales, con núcleos relativamente grandes, cromatina densa y citoplasma basófilo. La maduración o diferenciación de estas células forman las capas intermedias de células poligonales con citoplasma abundante y pequeños núcleos redondos. La diferenciación de éstas forman las células de las capas superficiales, las cuales son grandes, planas, de núcleo pequeño, denso y picnótico y citoplasma transparente.

El citoplasma de las células de las capas intermedia y superficial contienen abundante glucógeno, el cual se tiñe de color caoba después de aplicar solución yodurada de lugol con ácido peryódico de Schiff. La presencia de glucógeno en las

capas intermedia y superficial es signo de maduración normal y de desarrollo del epitelio escamoso. La maduración anormal o alterada se caracteriza por la ausencia de glucogénesis. Dicha maduración depende de la presencia de estrógenos ya que en su ausencia no se producen la maduración ni la glucogénesis totales.

Por su parte, el endocérnix está recubierto de una sola capa de epitelio cilíndrico o glandular, con núcleos densos. La transición del epitelio escamoso exocervical y del epitelio cilíndrico endocervical, es conocida como zona de transformación o zona T. (<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=1>). Es en dicha zona donde surgen las alteraciones que dan origen al cáncer cérvico-uterino (CC) (**Figura 3**).

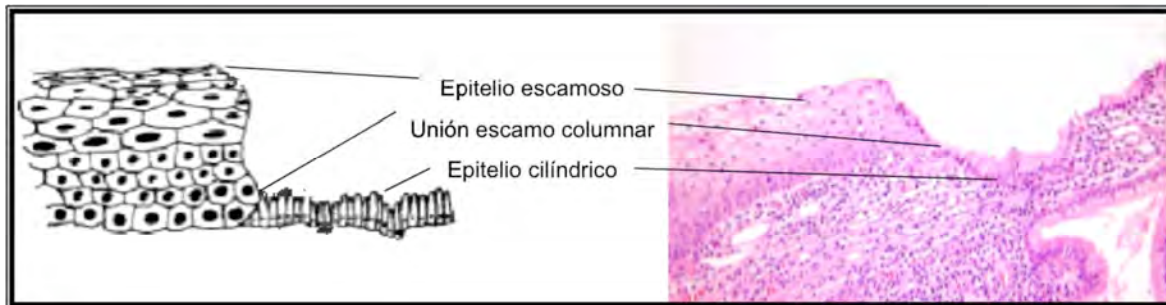


Figura 3. Unión escamo-columnar o zona de transición. Se muestra la transición del epitelio escamosos del exocérnix y el epitelio columnar del endocérnix. (Tomado y modificado de (<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=3&chap=1>))

1.2 Epidemiología e historia natural de cáncer cérvico-uterino

A nivel mundial en 2002 se reportó una incidencia de 493,343 nuevos casos y 273,505 muertes por dicha neoplasia. Es el segundo cáncer más común a nivel mundial en mujeres y el 83% de los casos ocurren en países en desarrollo (Parkin, 2005).

En México en 2002 se registró una incidencia de 12,516 casos de CC y se estimaron 5777 muertes por dicha enfermedad (WHO, 2010). En México el CC junto con el carcinoma *in situ*, hasta 2005 fueron la principal neoplasia en mujeres, en 2006 fue rebasado por cáncer de mama (INEGI, 2010).

En 2007 el cáncer en general representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35,303 defunciones, de las cuales el segundo lugar lo ocupó CC con 12.1%, (INEGI, 2009); mientras que la incidencia por esta neoplasia fue de 29.5 (Parkin, 2008). En 2008 el CC ocupó la segundo lugar en mortalidad por tumores malignos en mujeres con 11.3%. Si bien la mortalidad ha disminuido en comparación con años anteriores, el CC continua siendo un problema de salud pública en nuestro país (OMS, 2010).

El CC es precedido por lesiones precursoras, las cuales han sido objeto de diferentes clasificaciones (**Tabla 1**). En 1967 Richart propuso la clasificación neoplasia intraepitelial cervical con tres grados progresivos (NICI, II y III) (Richart, 1973). Posteriormente en 1988 se propuso la clasificación binaria conocida como lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) y de alto grado (LIEAG), también conocida como clasificación Bethesda. Esta clasificación fue justificada por el alto índice de regresión de las lesiones de bajo grado y por la probabilidad de progresión a CC de las lesiones de alto grado. Esta clasificación fue modificada en 2001 (Salomón *et al.*, 2001) y el equivalente de la LIEBG es NIC I y de las LIEAG son NIC II y NIC III. Estas clasificaciones se basan en el conjunto de alteraciones morfológicas que se presentan a los largo del epitelio endo y exocervical, aunque la hipertrofia nuclear y los cambios de tamaño y forma son características constantes de todas las células displásicas. En la **figura 4** se presentan aspectos característicos de cada una de las lesiones descritas.

Existen datos diversos en la literatura en cuanto al porcentaje de regresión de lesiones precursoras. En 1995 Ponten y cols. mencionaron que aproximadamente el 54% de lesiones precursoras tienen regresión sin tratamiento. Otro estudio menciona que 60% las mujeres que presentan LIEBG tienen regresión de la lesión sin ningún tratamiento, progresando sólo el 16% a un carcinoma *in situ* (Nasiell *et al.*, 1986). La tasa de progresión de NIC III a CC varía aproximadamente entre el 12% al 69% (Chakrabarti *et al.*, 2003). Un último reporte sugiere que 30% al 40% de las NIC III (LIEAG) progresan a CC (Stanley, 2010).

TABLA 1. COMPARACIÓN DE LAS DISTINTAS NOMENCLATURAS DE CITOLOGÍA CERVICO UTERINA.

Sistema Papanicolaou 1954	Sistema Descriptivo OMS 1968	Sistema NIC de Richart 1978	Sistema Bethesda 1988	Sistema Bethesda 2001
Clase 1 (benigno)	Negativo a células malignas	Negativo	Dentro de los límites normales	Negativo para lesión intraepitelial
Clase 2 (metaplasia o displasia)	Atipia inflamatoria Atipia escamosa Atipia coilocítica		Cambios reactivos ASCUS LIEBG	Cambios reactivos ASC-US/H
Clase 3 (sospechosos de malignidad)	Displasia leve Displasia moderada Displasia severa	NIC I NIC II NIC III	LIEBG LIEAG LIEAG	LIEBG LIEAG LIEAG
Clase 4 (positivo a malignidad)	Carcinoma <i>in situ</i>	NIC III	LIEAG	LIEAG
Clase 5 (positivo para invasor)	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical, LIEBG: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, LIEAG: lesión intraepitelial escamosa de alto grado, ASCUS: atipia de células escamosas de significado no determinado. (Tomado y modificado de Papanicolaou 1957; Richart 1973; Salomón 2001).

Debido al reconocimiento de las lesiones precursoras, así como a la implementación de la citología exfoliativa conocida como prueba de Papanicolaou (PAP) es posible el diagnóstico y tratamiento temprano, siempre y cuando esta prueba de tamizaje se lleva a cabo de manera adecuada y oportuna en la población en riesgo. Desafortunadamente en nuestro país no se ha logrado una disminución significativa del CC, como ha ocurrido en otros países (Bray *et al.*, 2005).

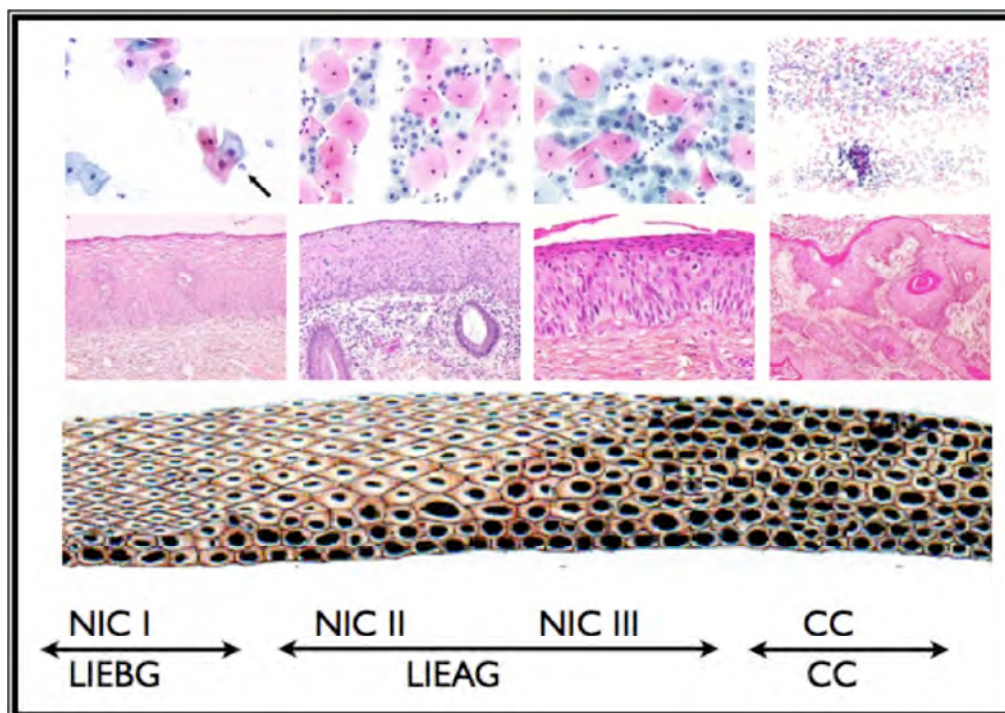


FIGURA 4. Imagen citológica e histológica de las lesiones del cérvix uterino. En la parte superior se muestran las imágenes citológicas de epitelio cervical sin alteraciones neoplásicas, hasta CC. En la parte intermedia se muestran las imágenes histológicas y en la inferior un esquema de las mismas con su correspondiente clasificación. (Modificado de Alonso, 2005; IARC).

Se ha estimado que la evolución del CC es lenta, con un rango de 15-20 años desde que se presenta una LIEBG hasta CC. Desde el punto de vista histopatológico, se han identificado diferentes tipos de CC. El 90% de los CC son de tipo epidermoide y entre 10 y 25% son de tipo adenocarcinoma, carcinomas adeno-escamosos y otros tipos histológicos raros. La incidencia máxima del CC epidermoide se observa alrededor de los 40 años y alrededor de los 30 en las precursoras de alto grado. El carcinoma cervical se manifiesta por tres patrones de crecimiento: fungoso (exofítico) ulcerado e infiltrante. El más frecuente es el tipo exofítico el que produce una masa tumoral evidente, la cual sobresale por encima de la mucosa. El CC avanzado invade por contigüidad afectando estructuras vecinas como peritoneo, vejiga, uréteros, recto y vagina. También puede afectar ganglios linfáticos locales y a distancia. La metástasis a distancia aparece en hígado, pulmones y médula ósea, aunque es menos frecuente que la invasión a ganglios linfáticos locales (Robbins y Cotran, 2008).

Aproximadamente 95% de los CC epidermoides se originan a partir de células grandes queratinizadas (bien diferenciadas) o no queratinizadas (moderadamente diferenciadas) y menos de 5% son tumores cuyas células son pequeñas y poco diferenciadas. La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) clasifica al CC en las siguientes etapas clínicas, las cuales fueron actualizadas en 2009 (Pecorelli *et al.*, 2009; Match *et al.*, 2009).

Estadio I. Carcinoma confinado al cuello del útero.

IA. Carcinoma preclínico, diagnosticado únicamente mediante microscopia, que muestra infiltración al estroma menor de 5 mm de profundidad y menor de 7mm de extensión.

IA1. Invasión del estroma menor o igual a 3 mm de profundidad y extensión menor o igual a 7 mm.

IA2. Invasión al estroma entre 3 y 5 mm y extensión menor o igual a 7 mm.

IB1. Carcinoma clínicamente visible no mayor de 4 cm.

IB2. Clínicamente visible mayor de 4 cm.

Estadio II. El carcinoma se extiende más allá del cuello uterino, pero no alcanza la pared pélvica. Afecta 2/3 de la vagina, pero no afecta el tercio inferior, no afecta los parametrios.

IIA1 . Tumor menor de 4 cm, que involucra 2/3 partes de la vagina.

IIA2. Tumor mayor de 4 cm, que involucra 2/3 partes de la vagina.

IIB. Tumor sin invasión evidente a los parametrios.

Estadio III. El carcinoma se extiende hasta la pared pélvica y afecta el tercio inferior de la vagina.

IIIA. Tumor que involucra el tercio bajo de la vagina sin extensión a la pared pélvica.

IIIB: Tumor con extensión a la pared pélvica y /o hidronefrosis.

Estadio IV. Se extiende más allá de la pelvis e infiltra la mucosa de la vejiga o el recto y metástasis.

IVA. Tumor que invade órganos adyacentes.

IVB. Invasión a órganos distantes.

Las etapas clínicas están muy relacionadas con la supervivencia y respuesta a tratamiento. La supervivencia de las pacientes a 5 años decae conforme avanza el estadio clínico, presentándose en etapas IA hasta IB2 una supervivencia del 70 al 80% en etapas IIB-IIIB de 35 a 45% y menos de 10% en etapa IV (Denton *et al.*, 2000; Bradley *et al.*, 2006),

Diversos factores se han involucrado en el desarrollo de esta neoplasia, sin embargo, a la fecha la infección por virus de papiloma humano (VPH) es el principal factor etiológico.

1.3 Etiología del cáncer cérvico-uterino: VPH

Desde la década de los 70s se propuso la participación de VPH en el desarrollo de CC (zur Hausen, 1977). Actualmente se reconoce la participación de los VPH en el desarrollo de CC, desde el punto de vista epidemiológico y molecular, ya que VPH está presente el 99.7% de los casos (Walboomers *et al.*, 1999).

La infección por VPH se transmite por vía sexual: Algunos autores indican que el uso de condón puede reducir el riesgo de infección por este virus, sin embargo no previene del todo la transmisión (Winer *et al.*, 2006). Se ha propuesto que es en la unión escamo-columnar o zona T donde se inicia la infección debido a pequeñas erosiones o úlceras del epitelio. La infección puede ser transitoria; sin embargo, si es persistente puede originar lesiones precursoras y CC. Se ha estimado de 10 hasta 20 años la progresión desde la infección por VPH hasta el desarrollo de CC. Este periodo depende de diversos factores tanto virales, del hospedero (genéticos) como ambientales.

Diversos estudios sugieren que aproximadamente 70% de las mujeres sexualmente activas han estado expuesta al VPH en algún momento de su vida y que al menos 80% de las mujeres a la edad de 50 años han presentado infección por VPH (Bosch *et al.*, 2003; CDCP, 2004).

Sin embargo la infección por VPH, no es suficiente para el desarrollo de CC. Algunos estudios indican que el 80% de las mujeres que son infectadas con VPH de alto riesgo (VPH-ar) no desarrollan lesiones neoplásicas y 20% restante puede desarrollar una lesión preneoplásica (Meijer *et al.*, 2000). Debido a esto, la detección de la infección por VPH tiene poco valor predictivo para el CC, ya que se presentan altas tasas de infección transitoria en mujeres sexualmente activas (Hidesheim *et al.*, 1994; Snidjers *et al.*, 2006). Sin embargo, la persistencia viral se ha asociado con el desarrollo de lesiones precursoras de CC y de CC (Liaw *et al.*, 2001). Algunos de los factores virales involucrados en la persistencia de la infección viral y, por lo tanto, del desarrollo del CC son el genotipo viral y variante molecular, la carga viral, la coinfección con otras enfermedades de transmisión sexual y la respuesta inmune del hospedero (Mayrand *et al.*, 2000, Brummer *et al.*, 2006). Estos antecedentes demuestran que además de la infección por VPH existen factores ambientales y genéticos que pueden contribuir al desarrollo de esta neoplasia. A continuación se describen algunos ya documentados en la literatura.

Diversas características reproductivas y ambientales se encuentran relacionadas al desarrollo de lesiones precursoras de CC y de CC, por lo cual se consideran factores de riesgo. Tales factores incluyen inicio de vida sexual activa a edad temprana, elevado número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos orales por tiempo prolongado, gran número de gestaciones y tabaquismo entre otros (Castellsagué *et al.*, 2002, *et al.*, 2003, Matos *et al.*, 2005).

La alta paridad se ha encontrado consistentemente asociada a CC y a carcinoma *in situ* en una amplia variedad de estudios de casos y controles. Un estudio de la IARC indica que las mujeres con siete ó más embarazos tienen un riesgo cuatro veces mayor de desarrollar cáncer escamoso, comparado con mujeres nulíparas. Al respecto se ha señalado que tanto los factores hormonales, traumáticos e inmunológicos son los mecanismos que pueden explicar la relación de la alta paridad con el desarrollo de CC. La alta paridad puede incrementar el riesgo de CC debido al mantenimiento de la zona de transformación sobre el exocérnix por varios años lo

cual puede facilitar la exposición de una manera más directa al VPH (Autier *et al.*, 1996).

Por otra parte los cambios hormonales ocurridos durante el embarazo pueden modular la respuesta inmune hacia el VPH e influir en la persistencia y progresión de CC (Muñoz *et al.*, 2002). Adicionalmente, el uso prologado de anticonceptivos hormonales por más de cinco años incrementa el riesgo de desarrollar CC, y se ha demostrado que las hormonas puede alterar la actividad transcripcional del VPH (Moodley *et al.*, 2003).

Sin embargo, de todos los factores anteriormente descritos, la infección por VPH es el de mayor importancia. Diversas evidencias epidemiológicas y moleculares han mostrado que la infección por VPH es un factor necesario para el desarrollo de CC.

Actualmente se conocen aproximadamente 200 tipos virales, de los cuales 40 infectan la región genitourinaria. Cada tipo viral es definido por diferencias en su secuencia nucleotídica, la cual es mayor de 10% entre tipos virales. Las variantes virales son definidas por variaciones en la secuencia nucleotídica de 2% respecto a la secuencia referencia o prototipo, que muestran amplia divergencia respecto a regiones geográficas separadas. Así mismo se ha sugerido que las variantes virales de un mismo tipo viral poseen características patogénicas diferentes (Kämmer *et al.*, 2000; Ordoñez *et al.*, 2004).

Los VPH pueden clasificarse en bajo (VPH-br) y alto riesgo (VPH-ar) debido a su capacidad oncogénica y a su asociación con lesiones proliferativas benignas o malignas respectivamente. Los VPHar son 15 según la clasificación de Muñoz *et al.* (2003) (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), de los cuales los tipos 16 y 18 son los de mayor importancia por estar asociados en un 70% a los casos de CC. Los VPH de bajo riesgo son: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108.

Un evento característico de los VPH-ar es la integración, mientras que los VPH-br, se mantiene de forma episomal. Los VPH-ar, pueden integrarse al genoma del hospedero, -lo cual se considera un evento raro- generando inestabilidad genómica, la cual facilita la inmortalización celular y la transformación (Tungteakkhun *et al.*, 2008).

Los VPH-br, tales como los tipos 6 y 11, pueden inducir proliferación epitelial, la cual se manifiesta como verrugas o papilomas cutáneos, aunque generalmente dichas lesiones son autolimitantes.

Es un hecho que la prevalencia de la infección por VPH se incrementa de acuerdo al grado de lesión. A nivel mundial se ha reportado en promedio prevalencias de infección por VPH en 11% de muestras citológicas normales, 71% en LIEBG, 85% en LIEAG y 87-99% en CC (Walboomer *et al.*, 1999; WHO, 2010).

Un meta-análisis (de San Jose *et al.*, 2007) reporta un promedio de 10% de infección por HPV a nivel mundial, con las respectivas diferencias en cuanto a región geográfica. En África se determinó 22.1%, en Centro América (incluido México) 20.4%, Norte América con 11.3% y Europa con 8.1% en epitelio cervical sin alteraciones neoplásicas.

En México se han realizado diversos trabajos identificando la presencia de VPH tanto por captura de híbridos como por PCR, generalmente utilizando los iniciadores GP5+/GP6+ y MY11/MY09. En la **tabla 2** se muestra el porcentaje de VPH detectado en epitelio cervical sin alteraciones neoplásicas considerado como normal, en lesiones precursoras y CC.

A nivel mundial, dentro de los VPH-ar, el tipo viral 16 es el más frecuente en CC con 54% en CC, seguido del tipo 18 con un 10-20% (Clifford, 2006), por lo cual son los más estudiados, desde el punto de vista epidemiológico y molecular. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la frecuencia de ciertos tipos virales, lo cual está

relacionado a la distribución geográfica y/o poblacional.

En un meta-análisis (Smith *et al.*, 2007) se analizó la distribución geográfica de los HPV en CC, estos datos se indican en la **tabla 3**

TABLA 2
PREVALENCIA DE HPV EN LESIONES DEL CÉRVIX UTERINO EN MÉXICO

NORMAL	LIEBG	LIEAG	CC	Población	Referencia
n.d.	n.d.	n.d.	36 ¹	D.F, Monterrey	González, 1992
13 ¹	n.d.	n.d.	56 ¹	Morelos	Hernández, 1997
17	33	83	87	D.F.	Torroella, 1998
10.1	69.6	92.9	n.d.	México-americanos	Giuliano, 1999
8.8	60.6	59.1	n.d.	Frontera norte	Giuliano, 2001
14.5	n.d.	n.d.	n.d.	Morelos	Lazcano, 2001
n.d.	n.d.	41	69	Jalisco	Montoya, 2001
11	n.d.	n.d.	50.8	D.F	² Berumen, 2001
21	79	89	n.d.	D.F.	³ González, 2002
21	79	89	n.d.	D.F.	³ Hernández, 2002
2.15	94.4	94.4	n.d.	Durango	Rodríguez, 2003
20	79	93	n.d.	D.F.	Hernández, 2003
n.d.	28	92	86	Yucatán	González, 2004
23	66	91	95.5	D.F	Carrillo, 2004
16	n.d	n.d.	95.8	D.F.	Tirado, 2005
12	57	88	92	DF, Edo. Mex.	*Piña, 2006
11.9	27	40	65.8	D.F.	¹ Lizano, 2006
4.8	n.d.	n.d.	n.d.	Durango	Sánchez, 2006
n.d.	n.d.	92	92	SLP, Gto.	López, 2008
35.5	n.d.	n.d.	100	Guerrero	Iliades, 2009
14.7	24.0	29.4	87.5	Puebla	⁴ Velázquez, 2009
40.9	94.5	83.5	100	Guerrero	Illiades, 2010

Prevalencia expresada en porcentaje. n.d. No determinado en el estudio. ¹Sólo se determinó la presencia de VPH 16 y 18. ²Sólo se realizó la detección de VPH16. ³VPH de alto riesgo. ⁴Detección de VPH 16, 18, 31, 6 y 11. *Datos obtenidos en esta tesis.

TABLA 3
PREVALENCIA DE LOS TIPOS VIRALES DE VPH EN CC A NIVEL MUNDIAL

TIPO VIRAL	16	18	31	45	33	52	58	35	56	59	6*
Mundial	54.4	15.9	3.6	3.7	4.3	2.5	3.3	1.7	0.7	1.0	0.5
Africa	54.5	15.5	2.5	6.6	7.6	1.2	1.5	2.9	1.1	0.8	0.4
Asia	52.0	14.9	2.2	2.6	3.9	3.8	5.5	1.7	0.7	1.5	0.5
Europa	58.1	15.7	4.0	2.9	4.4	0.6	1.2	1.5	1.0	0.1	0.3
Norteamérica	54.2	22.2	4.5	3.3	3.5	1.0	0.3	0.4	0.2	0.1	1.2
América central	52.4	12.7	7.0	5.7	4.1	3.7	2.9	2.1	0.6	1.9	0.6
MEXICO**	43	15.6	13.1	6.6	3.3	2.3	2.3	0.85	1.5	2.15	1.7
México***	72.2	4.6	1.9	0.9	0.9	0	1.9	0.9	0	1.9	2.6

* bajo riesgo. Datos tomados de Smith *et al.* 2007. ** Los datos sobre México se basan en sólo dos reportes (Torroella *et al.*, 1998 y Meyer *et al.*, 1998).*** Datos generados de esta tesis y publicados (Piña *et al.*,2006).

Sin embargo, un dato en el que coinciden es en la alta presencia de VPH de alto riesgo (Sánchez *et al.*, 2006), así como una frecuencia mayor a 50% de HPV tipo 16 en CC y la presencia de tipos virales como el 33, 35 52 y 58 en lesiones de alto grado y CC (**tabla 4**).

Como se ha mencionado anteriormente, la infección por VPH es el principal factor involucrado en el desarrollo de CC, a continuación de describen aspectos de los VPH desde el punto de vista molecular y su contribución al desarrollo del CC.

TABLA 4
PREVALENCIA DE TIPOS VIRALES EN DIFERENTES REGIONES DE MÉXICO

DX (n)	16	18	31	45	33	35	52	58	69	6	11	Región	Referencia
CC	26	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	D.F. Mty.	González, 1992
N CC	13 49	7 0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Morelos	Hernández, 1997
N BG AG CC	2.8 4.7 58 42	0 0 12.5 14.4	n.d.	0 4.7 0 10.1	0 0 8.3 0	n.d.	0 0 0 2.8	1.4 0 12.5 4.3	n.d.	n.d.	n.d.	D.F.	Torroella, 1998
AG CC	24 61	3 8	n.d.	n.d.	0 0	5 0	n.d.	16 15	n.d.	n.d.	n.d.	Guadalajara	Montoya, 2001
N	1.7	1	1.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Morelos	Lazcano, 2001
N BG AG	1.8 15 23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Frontera norte	Giuliano, 2004
BG AG CC	20 27 31	13 11 23	10 8 7	3 3 0	3 16 7	0 0 7		23 30 31		13 1 0	7 5 0	Yucatán	González, 2004
N	3.6	0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Durango	Sánchez, 2006.
N BG AG CC	9 24 49 50.3	2.8 5.5. 8.5 15.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	D.F.	Lizano, 2006
LIEAG y CC	55	4.3	18.6	n.d.	2.9	7.9	7.1	0.7	n.d.	n.d.	n.d.	San Luis Potosí	López, 2008
CC	68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	D.F.	Hernández, 2009
N BG AG CC	2.3 10.6 27.4 68.1	0.5 1.5 4.4 8.5	0.4 1.3 9.9 7.1	n.d.	2.7 13.4 12.1 1.4	0.03 0.5 0 0	0.1 0.6 0 1.4	1.3 2.2 2.2 3.5	0.2 0.5 0 2.6	0.5 3.2 0 0.7	0.3 0.4 0 0.7	Guerrero	Illiades, 2010

CC: cáncer cervical uterino, N: sin alteraciones neoplásicas, LIEBG: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, LIAG: lesión intraepitelial escamosa de alto grado. n.d.: no determinados en el estudio

1.4 Virus de Papiloma Humano

Al parecer la vía de entrada del virus a la célula es dependiente de receptores celulares tales como la alfa 6 integrina (Evander *et al.*, 1997) y heparán sulfato (Giroglou *et al.*, 2001) así como endocitosis vía clatrina (Culp *et al.*, 2004). La infección por VPH se inicia en las células basales y/o columnares del cérvix, donde se mantiene de manera episomal en bajo número de copias, de 10 a 200 copias (deGeest *et al.*, 1993). El ciclo de vida viral se encuentra estrechamente ligado al programa de diferenciación epitelial (Garner *et al.*, 2002), ya que utiliza la maquinaria celular para su regulación.

El VPH es un virus de DNA de doble cadena de 8 kb, pertenece a la familia *papillomaviridae*. Contiene 8 marcos de lectura abiertos localizados en la misma cadena de DN, son epiteliotrópicos y especie-específicos.

El genoma de los VPH está dividido en tres regiones funcionales (**Figura 5**). La primera es la región reguladora no codificante (URR o LCR), donde se encuentra la región promotora (promotor p97 para VPH 16) y es la responsable del control de la transcripción de los ORF. La región temprana (E) donde se localizan los genes E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8, los cuales están involucrados en la replicación viral y en la oncogénesis. La tercer región es la región tardía (L) la cual codifica para proteínas estructurales L1 y L2 (Burd, 2003).

E2 y E1: Son los principales genes involucrados en el control de la replicación viral y son los genes más conservados. E1 codifica para una helicasa, funciona como iniciadora de la replicación dependiente de ATP, promoviendo el desenrollamiento del DNA en el origen de replicación, recluta factores celulares de replicación tales como DNA pol α y topoisomerasa I, formando un complejo de replicación o replisoma. La expresión de este gen y en general de los genes tempranos, es

modulada por factores de transcripción celulares y virales, por control postranscripcional como splicing alternativo o poliadenilación, o por traducción selectiva de mensajeros policistrónicos (Lace *et al.*, 2008).

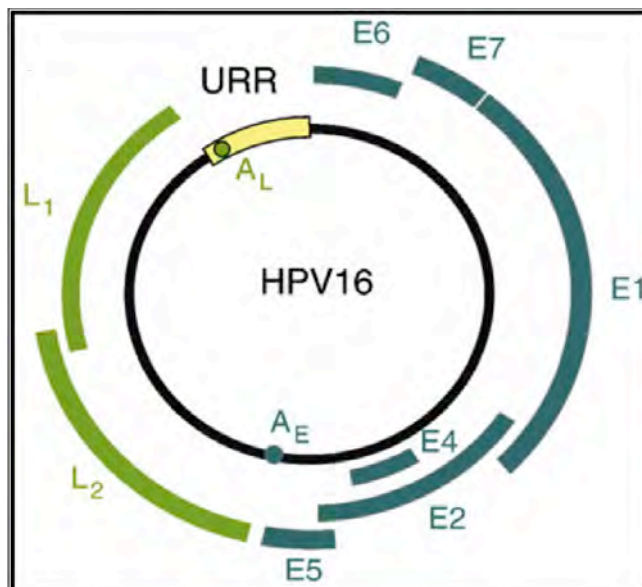


Figura 5. Estructura del genoma de los VPH. Los genes tempranos son señalados E, L1 y L2 corresponde a la región de los genes tardíos los cuáles forman la cápside viral. (Imagen tomada de Stanley, 2010).

E2 codifica una proteína de 50 kD que puede funcionar como activadora de la transcripción cuando está presente en bajas concentraciones y como represor transcripcional cuando se encuentra en altas concentraciones, ya que interfiere con la unión del factor de transcripción TFIID (Longworth *et al.*, 2004). Reconoce secuencias ricas en AT en el origen de replicación. E2 es requerida para la replicación y la transcripción, funciona como dímero y su amino-terminal contiene el dominio de transactivación, mientras que el carboxi-terminal interactúa con E1. E1 por sí misma tiene una débil unión con el *ori*, pero esta unión es facilitada por E2, una vez unidas, E1 forma hexámeros de alta afinidad al DNA (Sedman *et al.*, 1998).

E4: La proteína E4 es traducida en la fase temprana de la infección en niveles bajos, a partir de RNA policistrónico. Posteriormente, en la fase tardía de la infección es la proteína más expresada y lo hace a partir de la fusión con E1 \wedge E4. Esta proteína de

los VPH-ar interactúa con la red de queratinas y también puede regular la expresión génica al interactuar con la helicasas de RNA E4-DBD, la cual a su vez está involucrada en el splicing, transporte e iniciación de la traducción.

E5: Es una proteína hidrófoba de 83 aminoácidos localizada en las membranas endosomales del aparato de Golgi y membrana celular. E5 reduce acidificación de compartimentos endomembrales y promueve una activación sostenida del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R), así como en la inhibición de FAS y TRAIL (Barbaresi *et al*, 2009).

E7: Es una proteína de 100 aminoácidos, la cual se asocia a la familia de las proteínas pRb desestabilizándola del complejo que forma con el factor de transcripción E2F, pRb es degradada por la vía del proteasoma, lo cual libera a E2F, el cual activa genes necesarios para la progresión del ciclo celular. E7 participa en la progresión del ciclo celular aún en células ya comprometidas con la diferenciación. E7 junto con E6 son las proteínas que son expresadas consistentemente en CC.

E6: El gen E6 codifica para una proteína de aproximadamente 151 aminoácidos, contienen dos motivos dedos de zinc altamente conservados caracterizados por un motivo CXXC. E6 es una proteína pequeña con alto contenido de cadenas alfa-hélices y beta plegadas, por lo cual son inestables e insolubles una vez purificadas (Nomine *et al.*,2001).

E6 es una de las proteínas tempranas que se expresa, en etapas iniciales de la infección y es uno de los dos principales oncogenes de HPV junto con E7.

La expresión de E6 de VPH-ar induce proliferación en células epiteliales, pérdida de diferenciación y formación de tumores. La expresión de E6 es suficiente para la **inmortalización** y coopera con E7 para inducir **transformación** en cultivos de queratinocitos primarios (Hawley-Nelson *et al*, 1989); sin embargo las proteínas E6 de los VPH-br no tienen estas características.

El potencial oncogénico de las proteínas E6 de los VPH-ar se debe principalmente a la interacción e inactivación de proteínas celulares, tales como genes supresores de tumores. La primera actividad identificada de las proteínas E6 de HPV-ar fue la capacidad de formar complejos con TP53 (Werness *et al*, 1990), así como de su inactivación por degradación vía ubiquitina-proteosoma, lo cual fue de suma relevancia debido a su función como gen maestro en el control de diversos procesos celulares.

El producto del gen *TP53* no es el único blanco celular que es inactivado por E6 de HPV-ar. Diversas proteínas celulares que participan en la regulación de apoptosis son afectadas por las oncoproteínas E6, tales como BAK, FAS, FADD, inhibiendo la apoptosis. Otras participan en la reparación de daño al DNA, tales como XRCC1 y O6MGT, por lo cual E6 inhibe la reparación del DNA. Además de la interacción con proteínas, también tiene efectos en la activación de la transcripción de genes como en *TERT* (telomerasa transcriptasa inversa), *BIRC5* (survivina) y *MYC*. Se han caracterizado los residuos que intervienen en las interacción con algunas proteínas, tal es el caso de la proteína con dominios PDZ como SCRIB y DLG (Howie *et al.*, 2008). Estudios genéticos han demostrado que variaciones naturales en la secuencia de aminoácidos de la oncoproteína E6 de VPH 16 generan diferencias en cuanto a la eficiencia de degradación de proteínas celulares tales como BAX y TP53 (Lichting *et al.*, 2006).

Sin embargo, una de las principales funciones de las oncoproteínas E6 es la inactivación del gen supresor de tumores *TP53*.

1.5 Gen supresor de tumor *TP53*

1.5.1. Descripción

El producto del gen *TP53* es una proteína de 393 aminoácidos, la cual fue identificada en 1979 y caracterizada como proteína relacionada con la transformación neoplásica. (DeLeo *et al.*, 1979). Sin embargo, fue hasta 1989 que se descubrió que

la proteína originalmente descrita tenía una mutación con sentido y que las propiedades oncogénicas atribuidas originalmente se debían a la mutación (Baker *et al.*, 1999; Finlay *et al.*, 1989).

En 1992 se generó el primer ratón *knockout* (KO), lo cual evidenció la función como gen supresor de tumores de *TP53* Wild Type (WT) o silvestre (Donehower *et al.*, 1992). En estudios subsecuentes fue reconocido como un gen supresor de tumores y fue catalogado por la revista *Nature* como el guardián del genoma (Lane, 1992). Actualmente es reconocida su función antiproliferativa debido al control de la expresión de numerosos genes blanco, además de diversas interacciones proteína-proteína.

La proteína TP53 participa en una gran variedad de funciones e interacciones con otras proteínas, ejerciendo, en general los siguientes efectos:

- Inducción del arresto del crecimiento celular en respuesta a estrés.
- Puntos de control y reparación en la progresión del ciclo celular.
- Apoptosis
- Control de la senescencia
- Control de la estabilidad genómica.

El gen *TP53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17. Estructuralmente consiste en 11 exones los cuales generan una proteína de 393 aminoácidos. La proteína consiste en tres dominios estructurales y funcionales (**Figura 6**).

Dominio de transactivación: Localizado en el N-terminal de los aminoácidos 1-50, codificado por los exones 2-4. La transactivación es la función mejor caracterizada de TP53. Este dominio está involucrado en la modulación de la transcripción de genes blanco a través de la interacción con componentes del aparato transcripcional tales como proteínas de complejo TFIID: TBP (proteína de unión a la caja TATA) y TAFII (factor asociado a TBP), acetiltransferasas y MDM2. Además presenta una región rica en prolina PXXP, importante para la estabilidad, regulada por MDM2.

Dominio central de unión a DNA: Este dominio participa directamente en el reconocimiento y unión a secuencias específicas de DNA, se localiza entre los aminoácidos 92-292 codificados por los exones 5-8. La secuencia consenso de reconocimiento a DNA consiste en dos copias de un motivo de 10pb 5´PuPuPuC(A/T)-(T/A)GPyPyPy-3´ separadas por 0 a 13 pb (Kern *et al.*, 1991). Este dominio es muy conservado entre especies y es donde se han detectado 80% de las mutaciones del gen.

Dominio de oligomerización: localizado en el dominio C-terminal entre los aminoácidos 323-356, es responsable de la oligomerización de la proteína en tetrámeros, también se encuentra la secuencia señal para el transporte al núcleo. Los aminoácidos 363-393 son sujetos a modificaciones por acetilasas, cinasas, glicosilasas e interacción con otras proteínas, lo cual es determinante en la regulación de su actividad funcional. Este dominio es un regulador negativo, debido a su capacidad para bloquear por cambios conformacionales al dominio central de unión a DNA. La interacción del extremo C-terminal y el dominio central es revertida debido a modificaciones postraduccionales, tales como fosforilación y acetilación y el dominio de unión a DNA es activado, de esta manera aumenta la actividad transcripcional de *TP53*.

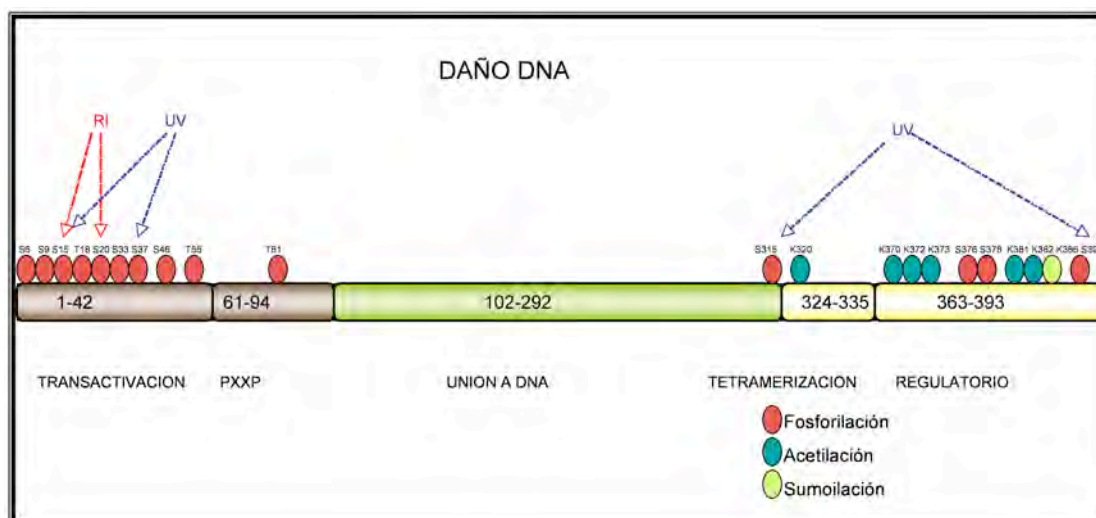


Figura 6. Dominios de la proteína TP53 y modificaciones post-traduccionales por daño a DNA. En la figura se muestran los dominios de la proteína TP53, la cual consta de 393 aminoácidos. En óvalos rojos los residuos que son fosforilados en respuesta al daño al DNA, en azul los residuos que

son acetilados y en amarillo los residuos sumoilados. (Tomado y modificado de Anderson 2002).

1.5.2.Regulación de *TP53*

A nivel de su transcripción *TP53* es regulado a través de dos promotores, el primero (p53P1) y se localiza hacia la región 5' del primer exón y es el responsable de la transcripción de la mayoría de los mRNA. El segundo promotor (p53P2) es un promotor más fuerte que el primero y se localiza 10,738 pb en el primer intrón, aproximadamente a 1000 pb 3' del exón 1 (Reisman *et al.*, 1996).

Yin y cols. (2002) demostraron que la traducción de *TP53* puede llevarse a cabo a partir de dos sitios alternativos. La traducción del segundo sitio resulta en una proteína de 47 kD, la cual pierde el sitio de unión a MDM2 y el dominio N- terminal de transactivación.

La proteína TP53 es mantenida en niveles bajos debido a la degradación activa por parte de la ubiquitina (también llamada ubiquitina) ligasa MDM2 y por la vía del proteosoma. Diversas formas de estrés, particularmente estrés genotóxico inducen la estabilidad y activación de TP53. Dicha estabilidad se lleva a cabo por modificaciones postraduccionales, las cuales a su vez evitan que sea degradado por MDM2.

1.5.3 Modificaciones post-traduccionales y activación

Las modificaciones post-traduccionales son los mecanismos de regulación de la actividad de TP53, y un primer paso en la activación entendida como el incremento en la concentración de la proteína y posteriormente por un incremento en la transcripción de genes con elementos de respuesta a *TP53*.

En células no estresadas, la vida media de TP53 es de 20 a 40 minutos y se encuentra en niveles bajos en forma latente. Diversos factores genotóxicos, tales

como radiaciones ionizantes, UV, hipoxia, agentes alquilantes, especies reactivas de oxígeno, etc., inducen la estabilización y activación de TP53 a través de diversas modificaciones post-traduccionales. Esto causa su acumulación en el núcleo y su activación como factor de transcripción. Dicha activación puede llevar al arresto celular en la transición G1/S o G2/M ó a la apoptosis. El extremo amino-terminal generalmente es fosforilado, para la estabilización de la proteína; mientras que el carboxi-terminal puede ser fosforilado, acetilado y sumoilado. Estas modificaciones se llevan a cabo en al menos 18 sitios. En el extremo amino terminal, siete serinas (6, 9, 15, 20, 33, 37, 46) y dos treoninas (18 y 81) son fosforiladas en respuesta a radiación ionizante o UV, mientras que la treonina 55 es fosforilada en condiciones de no estrés y defosforilada después de daño a DNA (Anderson y Apella, 2002) (**Tabla 5**).

En el extremo carboxi-terminal la Ser315 y la Ser392 son fosforiladas, mientras que Lys320, Lys373 y Lys382 son acetiladas, y Lys386 es sumoilada en respuesta al daño del DNA, mientras que Ser376 y Ser378 son constitutivamente fosforiladas (Waterman *et al.*, 1998). La acetilación incrementa la afinidad de TP53 al DNA, así como para la inhibición de transformación oncogénica inducida por *RAS* (Pearson *et al.*, 2000).

TABLA 5
MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE TP53 EN RESPUESTA A ESTRES

aa	Modificación	Inductor	Efecto
Ser6	Fosforilación por Chk1	UV, RI,	
Ser9	Fosforilación por CK1g	UV, RI	
Ser15	Fosforilación por CHK1, ATM	UV, RI	Inhibición de p53/MDM2, reclutamiento de CBP/p300
Ser20	Fosforilación por Chk2, Chk2	RI, UV	Eliminación de la interacción p53/MDM2
Ser33	Fosforilación por MAPK	RI, UV	
Ser37	Fosforilación portar	UV	
Ser46	Fosforilación por P38K, MAPKC		
Tre18	Fosforilación por CK1δ		
Tre55	Fosforilación por TAF250	basal	Constitutivamente fosforilada y defosforilada en estrés.
Tre81	Fosforilación JNK	UV	Estabilización de p53
Ser315	Fosforilación por CDK2	UV	
Lys320	Acetilación por PCAF	UV	Reclutamiento de CBP/p300
Lys370	Acetilación		Estabilización de p53,
Lys370	Metilación por MSYD2		Estabilización y activación transcripcional.
Lys372	Acetilación		Estabilización de p53
Lys372	Metilación por Set7/9	Estrés genotóxico	Estabilización y activación transcripcional
Lys373	Acetilación CBP/p300?	Daño DNA	Estabilización de p53, bloque la progresión del ciclo celular en G2
Ser376	Fosforilación	IR	Interacción p53/14-3-3
Ser378	Fosforilación	IR	Interacción p53/14-3-3
Lys381	Acetilación		Estabilización de p53
Lys382	Acetilación por CBP/p300	RI, UV, adriamicina, hipoxia	Estabilización de p53
Lys386	Sumoilación por E1+Ubc9	UV	
Ser392	Fosforilación por PKR	UV	Tetramerización de p53

Tomado y modificado de Anderson y Apella 2002.

La activación de la transcripción de genes blanco de TP53 depende tanto del estímulo inductor, de las modificaciones postraduccionales y del tipo celular. La inducción transcripcional de genes involucrados en el arresto de ciclo celular en dos puntos de control, en G1 antes de la fase S y en G2 antes de la mitosis, para llevar a cabo reparación del DNA y en su caso inducción de apoptosis.

Uno de los residuos de mayor importancia es Ser15. Se ha demostrado que la fosforilación de este residuo se incrementa en condiciones de senescencia replicativa o senescencia prematura inducida por el oncogen *RAS* (Webley *et al.*, 2000). En respuesta a radiaciones ionizantes Ser15 es fosforilada, además de fosforilarse en respuesta a diversos fármacos. Mutaciones en los residuos Ser33 y Ser46 decrece la apoptosis inducida por UV dependiente de *TP53*. Mutaciones en las Ser15 o Ser20, evitan la estabilización de TP53 y evitan su acumulación en respuesta a daño del DNA (Chao *et al.*, 2000). La fosforilación de la Ser392 por la cinasa PKR requiere la interacción con 30 aminoácidos del C-terminal y es incrementada por interferón (Cuddihy *et al.*, 1999).

Por otra parte, la acetilación y metilación de TP53 son mecanismos de regulación recientemente descritos. La acetilación de TP53, es importante en la supresión de la transformación oncogénica inducida por RAS (Pearson *et al.*, 2000), así como para su estabilidad, debido a que TP53 es protegida de la ubiquitinación y en consecuencia de la degradación (Ivanov *et al.*, 2007). La acetilación de TP53 es importante para su función co-represora de la transcripción, tal como lo muestra el trabajo de Yang y cols. (2008), donde la acetilación de K373 induce la acumulación nuclear, así como la metilación de K370 induce la represión del promotor del gen del factor de crecimiento derivado de plaquetas *PDGFRB* uniéndose en una secuencia CCAAT, facilitando la inducción de apoptosis. Las metil-transferasas de lisinas de histonas KMT5 KMT3C y KMT5A, metilan lisinas C-terminales específicas. Dicha metilación puede aumentar o disminuir la actividad transcripcional de *TP53*, dependiendo del sitio metilado (Scoumanne, 2008). Al respecto, un estudio reciente demuestra que los sitios metilados en la región promotora no ejercen efectos en la

transcripción del gen, y que su regulación epigenética se debe a modificaciones en la metilación de histonas (H3K9Me3) y a *CTCF* (Soto y Recillas 2010).

El factor de transcripción YY1 inhibe la interacción de TP53 con p300/CBP y por lo tanto la acetilación para su estabilidad, de esta manera se evita la acumulación de TP53 en respuesta al estrés genotóxico, además de aumentar la interacción con su regulador negativo MDM2 (Gronroos *et al.*, 2004)

Recientemente, se han identificado otros mecanismos de regulación en los que participa TP53. Se ha identificado que TP53 puede inducir la expresión de miRNAs, específicamente de mir-34, lo cual tiene efectos en la inducción de apoptosis. (Cheng *et al.*, 2007). Por otra parte, se identificó un miRNA que regula negativamente la actividad de *TP53*, mir-125b, por unión directa al 3'UTR del RNA de *TP53*, reprimiendo los niveles de proteína de manera dependiente de la unión al miRNA. (Le *et al.*, 2009).

1.5.4 Vías y genes regulados por *TP53*

La proteína TP53 es reconocida principalmente como activadora transcripcional y se ha demostrado que algunos de los genes que regula, tienen expresión dosis dependiente, tal es el caso del gen *VCAN* (versican o proteoglicano de matriz extracelular) (Yoon *et al.*, 2002). Al mismo tiempo TP53 funciona como represor de la transcripción de genes como *RNA pol III* (Cairns y White, 1998) y *CCNB1* (ciclina B) (Levesque *et al.*, 2005).

La capacidad de transactivación de diferentes genes blanco es influida por la estructura de los elementos de respuesta a *TP53*, tales como el número de nucleótidos que separan las dos secuencias palíndromes, al incrementar el espacio entre las dos secuencias la afinidad por el DNA disminuye (Resnick, *et al.*, 2007).

Se ha determinado que aproximadamente 107 genes son inducidos por TP53 y 45 inhibidos, entre los que destacan genes asociados con la apoptosis, arresto de

crecimiento, citoesqueleto, factores de crecimiento y sus inhibidores, matriz extracelular y genes de adhesión (Levine *et al.*, 2000). La topoisomerasa II, *MDRI*, *HSP70*, proteína asociada a microtúbulos 5, factor de transcripción *SPII* y *HIF-1* también son regulados por TP53 (Levine, 1997).

Un estudio reciente de Smeenk demostró por medio de inmunoprecipitación de cromatina e hibridación en genoma completo, que existen al menos 1545 sitios de alta probabilidad de unión de TP53 en el genoma (Smeenk *et al.*, 2008), de los cuáles 28% se encuentran dentro de genes fuera de primer intrón y del primer exón, además de la interacción en regiones cercanas a *EST* y regiones intergénicas, por lo cual es posible identificar nuevos sitios regulatorios.

1.5.5 Familia de *TP53*

La familia *TP53* consiste de tres genes *TP53*, *TP63* y *TP73*, los cuales tienen homología y cuyos productos funcionan como activadores de la transcripción. *TP73* fue descubierto en 1997, se localiza en 1p36, cuyo *loci* es referido como pérdida de heterocigosidad en varios tipos de cáncer en humanos (Kaghad *et al.*, 1997). *TP63* fue descubierto en 1998 (Yang *et al.*, 1998), localizado en 3q27; esta región no se reporta con pérdida o ganancia en tumores. Tanto *TP63* como *TP73* no son mutados frecuentemente en tumores, tal como ocurre con *TP53*. Esta familia (tal como los factores de transcripción) comparten los dominios de transactivación (TA), dominio de unión a DNA (DBD) y un dominio de oligomerización en el carboxi-terminal (Kaghad *et al.*, 1997). *TP63* y *TP73* pueden unirse a sitios consenso de *TP53* y transactivar genes responsivos a *TP53* induciendo el arresto de crecimiento y generando apoptosis (Kaghad *et al.*, 1997).

TP63 se compone de 15 exones y *TP73* de 14 exones. Ambos genes generan diversas proteínas producto del corte y empalme alternativo (Kaghad *et al.*, 1997), así como al uso de promotores alternativos (Yang *et al.*, 2000; Pozniak *et al.*, 2000).

1.5.6 *TP53* y cáncer

La frecuencia de mutaciones en *TP53* varía considerablemente de acuerdo al tipo de tumor, desde 10% en neoplasias hematológicas, hasta 79% en tumores sólidos tales como ovario, colo-rectal y cabeza y cuello (Brosh *et al.*, 2009). Sin embargo CC, es una excepción, ya que la frecuencia de mutaciones es muy baja comparada con otros tipos de tumor (Tommasino *et al.*, 2003).

Debido a que *TP53* funciona en forma de tetrámero, se ha encontrado que aún en presencia de un alelo silvestre, este puede formar heterodímeros con la forma mutada y tener un efecto dominante negativo. Al respecto, Vogelstein (1992) postuló cinco mecanismos de inactivación de *TP53*.

1. Deleción de uno o ambos alelos.
2. Mutaciones sin sentido o que afectan el *splicing*
3. Mutaciones con cambio de sentido que generan una reducción de la actividad funcional del tetrámero.
4. Alteraciones en MDM2 como sobre expresión puede afectar la regulación de *TP53*.
5. Inactivación por oncoproteínas virales, tales como E6 de VPH de alto riesgo y antígeno T de SV40.

TP53 es un supresor de tumores que no cumple con el modelo de Knudson del “doble hit”, ya que la simple reducción de la expresión constitutiva de *TP53* es suficiente para la predisposición tumoral, es decir tiene un efecto de dosis génica. Yoon y colaboradores (2002) identificaron por medio de arreglos de expresión que al menos 35 genes cambian sus niveles de expresión por efecto de dosis génica. Estos genes participan en la transducción de señales, adhesión celular, regulación de la transcripción y neurogénesis. El análisis de secuencias en dicho trabajo reveló que los genes altamente expresados en células con *TP53* silvestre y heterocigoto contienen varios sitios de unión putativos a *TP53*. Entre dichos genes se encontró

VCAN (versican), que contiene un sitio de unión a TP53 en su primer intrón y su expresión correlaciona con la dosis génica de *TP53*, posteriormente se demostró por ensayos *in vitro* e *in vivo*, que dicho gen es transactivado por TP53.

Por otra parte, las mutaciones de *TP53* reportadas en la literatura se han compilado en la base de datos de la IARC (versión R14, noviembre 2009), donde se registran 26596 mutaciones somáticas en todo el gen de *TP53* en más de 60 tumores distintos; donde sólo se detectaron mutaciones en 78 casos de 1304 analizados con CC. Respecto a las mutaciones de tipo germinal esta base de datos reporta un total de 2333 de las cuales sólo siete se han asociado al tumores del cérvix uterino (Petitjean *et al.*, 2007).

De las mutaciones reportadas, 97% se encuentran en el dominio de unión a DNA, afectando a 300 residuos y a diferencia de otros genes supresores de tumores, la mayoría de sus mutaciones son puntuales (80% son mutaciones con sentido y 8% mutaciones sin sentido). Por ejemplo en el gen *APC* (adenoma pólipos) sólo el 9% son mutaciones con sentido.

Debido a la alta frecuencia de mutaciones en todas las neoplasias, actualmente se reconocen cinco puntos calientes en los codones: 175, 245, 248, 249 y 273. Martin y colaboradores (2002) predijeron por medio de análisis estructural las alteraciones funcionales de las mutaciones que comprometen el dominio central de *TP53*. Dichas alteraciones pueden ser explicadas en términos de alteraciones en el plegamiento de la proteína así como del contacto proteína-DNA. Por ejemplo R175H y R249S son las mutantes de TP53 mejor caracterizadas, ambas muestran una pérdida total de su actividad transcripcional en ensayos funcionales con levaduras en sistema reportero. En cuanto a la mutación R249S, probablemente no produzca una proteína muy estable (Cho *et al.*, 1994). Esta mutación es más común en carcinoma hepatocelular y ocurre como consecuencia directa de aflatoxina B1, una toxina hepatocarcinógena de los hongos (Martin *et al.*, 2002).

En la base de datos de la IARC se reportan hasta el momento 0.21% de mutaciones de tipo germinal en *TP53* y 110 mutaciones de tipo somático.

Donehower (1992) y Jacks (1994) desarrollaron ratones *knockout* de *TP53*. Los ratones que carecen de uno o ambos alelos de *TP53* tienen predisposición a múltiples tipos de tumores, tales como linfomas, sarcomas, cáncer de cerebro y de pulmón, antes de los seis meses de edad (Harvey *et al.*, 1993, Jacks *et al.*, 1994), mientras que el heterocigoto *TP53*+/- sobrevive más tiempo que el *knockout*, sin embargo, no muestran un fenotipo en particular durante el desarrollo. En contraste, ratones *knockout* de *TP63* y *TP73* muestran defectos en el desarrollo embrionario y no desarrollan tumores espontáneos como los ratones nulos de *TP53* (Yan *et al.*, 1999, 2000). Aunque los ratones *TP53*+/- conserven un alelo silvestre, éste no es suficiente para la supresión de crecimiento tumoral, por lo que se clasifica como una haploinsuficiencia (Venkatachalam *et al.*, 2001).

El tipo de tumores desarrollados en ratones con alelos nulos de *TP53*, semeja el tipo de tumores en pacientes con síndrome Li-Fraumeni. Por otra parte, los tumores que pierden *TP53* son resistentes a tratamiento con radiación gama o adriamicina en contraste con tumores que conservan *TP53* silvestre, los cuales tienen a generar apoptosis rápidamente (Lowe *et al.*, 1994). El tiempo de desarrollo de los tumores decrece cuando la pérdida de uno o ambos de los alelos de *TP53* se pierden y se combina con otra alteración genética, tal como mutaciones en K-RAS (Jonson *et al.*, 2001).

Por otra parte, García y colaboradores (2002) desarrollaron un "súper *TP53*" el cual lleva una tercer copia del gen silvestre controlado por un promotor endógeno, que es más resistente a los tumores que los silvestre y muestran elevada actividad de *TP53* es respuesta a irradiación.

1.5.7 Síndrome LI-FRAUMENI (SLF)

El síndrome Li-Fraumeni (SLF) (MIM #151623), es un síndrome de predisposición familiar a múltiples tipos de cáncer, es clínica y genéticamente heterogéneo, caracterizado por herencia autosómica dominante y desarrollo de tumores a edad temprana, con múltiples miembros de la familia afectados (Olivier *et al.*, 2003). Está caracterizado por mutaciones germinales en *TP53* con alta penetrancia ya que aproximadamente 70% de los afectados presentan mutaciones en este gen (Hwang *et al.*, 2003). A diferencia de otros síndromes, los cuales se caracterizan por tumores sitio-específicos, el SLF presenta una variedad de tumores, siendo los de mayor frecuencia sarcomas, cáncer de mama, cerebro y leucemia. Recientemente, se identificaron mutaciones germinales de *novo* y se sugiere que estas podrían ser relativamente comunes y podrían ayudar a identificar a pacientes con potencial SLF con escasos antecedentes familiares de cáncer (González, 2009).

1.5.8 Polimorfismos de *TP53*

Los polimorfismos son variaciones que ocurren de manera normal en la secuencia de DNA. Se clasifican en cambios de un solo nucleótido o SNPs, deleciones, inserciones, variación en el número de repetidos o microsatélites y variación en el número de copias génicas.

Un SNP se define como el cambio de un nucleótido en una posición determinada en más de 1% de la población. Los SNPs son marcadores genéticos ampliamente distribuidos en el genoma (más de 12 millones) y han sido seleccionados como primera opción para estudios de asociación en diversas enfermedades multifactoriales debido a su abundancia.

Diversos estudios han demostrado que determinados polimorfismos genéticos se encuentran asociados al riesgo de desarrollar ciertas enfermedades complejas o multifactoriales, por lo cual son considerados una herramienta importante como

prueba genética para la identificación de genes asociados a enfermedades humanas. En CC se ha demostrado la asociación de ciertos haplotipos de HLA, especialmente de alelos MHC clase II (Zoodma *et al.*, 2005). Adicionalmente, se han estudiado polimorfismos de diversos genes como se muestra en la **tabla 6**.

TABLA 6
POLIMORFISMOS ASOCIADOS A CC

GENES	POLIMORFISMO	REFERENCIA
IL-10	-592A>	Zoodma, 2005.
MMP-7	-181G>A	Singh, 2008
HLA TIPO I		Deshpande, 2008
GSTM1, GSTT1, GSTM3	GSTM1 y GSTT1 null, GSTM3*AB	Singh, 2008
FAS	-1377G>A	Kang, 2008.
FASL	-844C>T	Sun, 2005
IL-4R	I75V	Ivansson, 2007
TNFa	-308G>A	Kohaar, 2007.
IL-6	-174 G>C	Nogueira, 2006.
IL-1B	-511 C>T	Kang, 2007
XRCC1	Arg399Gln	Niwa, 2005
COX-2	-1186NF-kappaB	Kang, 2005
MMP-1	-1607inG	Lai, 2005
AKNA	R1119Q	Perales, 2010

La base de datos del NCBI reportó en su construcción número 126 un total de 199 SNPs, de los cuales 23 se encuentran en la región codificante, cuatro son SNPs de tipo sinónimo, es decir, que no generan cambio de aminoácido (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi). En la construcción 136 actualmente se reportan 36 SNP en la región codificante de un total de 402 en todo el gen. De estos polimorfismos se tienen información de las frecuencias alélicas de solamente 11 SNP en la región codificante. De los polimorfismos validados sólo uno de ellos, en el codón 72, ha recibido especial atención ya que se han publicado múltiples reportes donde se asocia la presencia de este polimorfismo con diversas patologías incluidas el cáncer (Whibley *et al.*, 2009).

El SNP del codón 72 (rs1042552) se localiza en el exón 4 (CGC/CCC) y genera un cambio Arg>Pro, este SNP se localiza en una región rica en prolina (PXXP), la cual involucra a los aminoácidos 61 al 94. Este dominio es requerido para la supresión del crecimiento y apoptosis mediada por TP53 (Walter *et al.*, 1996). Este motivo se

ha demostrado que participa en señales de transducción vía dominios SH3. Este dominio es indispensable para la activación de la transcripción y su delección impide a TP53 la capacidad de inhibición del crecimiento (Walker *et al.*, 1996). Estos residuos forman un hélice tipo II la cual crea un sitio de unión para dominios SH3 (Yu *et al.*, 1994) y este dominio se encuentra conservado evolutivamente en especies divergentes.

Al respecto, Sidique y colaboradores (2005) demostraron en sujetos heterocigotos sanos asiáticos y caucásicos, que existe una expresión diferencial de los alelos Arg y Pro del codón 72. Los asiáticos expresan preferentemente Pro72, mientras que los caucásicos expresan preferentemente Arg72. En contraste, pacientes chinas con cáncer de mama expresan preferentemente Arg72 (la cual raramente contiene mutaciones somáticas), incluso en tejido histológicamente normal. Estos datos sugieren que la expresión diferencial de TP53 en sujetos heterocigotos es regulada en razón de la etnicidad y durante el desarrollo de cáncer.

Estudios epidemiológicos han mostrado resultados contradictorios respecto a la asociación del polimorfismo 72 y CC. Sin embargo estudios de poblaciones como la indú y la griega, muestran asociación de riesgo de CC en mujeres homocigotas para Arginina (Mitra *et al* 2005).

Por otra parte ensayos bioquímicos han demostrado que existen diferencias funcionales de las proteínas con estas variantes. La proteína Pro72 tiene mayor capacidad (dos veces mayor) como activador transcripcional y muestra altos niveles de unión a TAFII32 y TAFII70, respecto a Arg72 mientras que ambas proteínas muestran igual capacidad de unión a su secuencia consenso de DNA (Thomas *et al.*, 1999). Sin embargo TP53 Arg72 induce muerte celular con mayor eficiencia que Pro72 en algunos tipos celulares (Dumont *et al.*, 2003).

El polimorfismo del codón P47S es un polimorfismo de baja frecuencia, el cual se ha reportado únicamente en poblaciones de origen africano. La presencia de 47S,

disminuye la fosforilación de S46 y por lo tanto de la activación de genes pro-apoptóticos, por lo cual puede potencialmente aumentar el riesgo de cáncer (Feng *et al.*, 2006; Kurihara *et al.*, 2007). En el dominio de unión a DNA se encuentra el SNP V217M (debido a la transición G>A) y estudios funcionales han demostrado mayor activación de los genes *CDKN1A*, *BAX* y *NOXA* con la variante M217 que con el polimorfismo V217, por lo que se sugiere que tiene un efecto protector contra el cáncer (Whibley *et al.*, 2009). El polimorfismo G360A se encuentra en la región de tetramerización e induce un ligero decremento en la transactivación de *BAX*, *MDM2*, y *P53AIP*, 14-3-3- sigma y *GADD45* (Kato *et al* 2003).

En general la importancia de *TP53* como gen supresor de tumor en el desarrollo de cáncer está bien establecida ya que aproximadamente 50% de los tumores tienen mutaciones en este gen. Sin embargo en CC es muy baja la frecuencia de mutaciones en *TP53*, aunque es inactivado por las oncoproteínas virales E6 de los VPH-ar. Sin embargo, la infección por VPH no es suficiente para el desarrollo de CC, por lo cual otros factores como los genéticos, específicamente polimorfismos, pudieran asociarse al riesgo de desarrollo de CC junto con la infección por VPH.

2.0 ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 Oncoproteína E6 y *TP53*

La proteína E6 de los HPV-ar se une a *TP53* en dos sitios distintos; uno a través de la estructura central de *p53*, y otra en el extremo carboxi-terminal. La unión en la parte central es requerida para la degradación de *TP53* (Li *et al.*, 1996). La interacción de *TP53* con E6 decrece la cantidad efectiva de la proteína *TP53* por estimulación de su degradación, la cual requiere de la participación de la proteína celular E6-AP, la cual es una ubiquitin-ligasa que promueve la degradación de *TP53*. Únicamente las oncoproteínas E6 de los VPH-ar pueden mediar la degradación de *TP53* (Scheffner *et al*, 1990). La unión de E6 a *TP53* en el dominio central requiere de la interacción con E6AP, mientras que la interacción con el C-terminal no requiere la interacción con E6AP, por lo cual únicamente la unión en el dominio central es

relevante para la degradación de TP53. Respecto a las proteínas E6 de HPV de bajo riesgo si existe interacción con el C-terminal, más no con el dominio central. Los aminoácidos 66 al 326 del gen *TP53*, la cual corresponde al dominio de unión a DNA, contienen la región mínima requerida para su degradación por E6 de los VPH-ar. Adicionalmente, los aminoácidos 376 al 384 (Li *et al.*, 1999) y los aminoácidos 364-393 (Gu *et al.*, 2001) de la región C-terminal de p53, interaccionan con E6. La región 364-393 es prescindible para la degradación de p53, ya que ocurre la degradación de TP53 aún con la delección de esta región (Gu *et al.*, 2001). La unión de E6 y E6AP no es suficiente para la degradación de TP53, mientras que el dominio N-terminal (aminoácidos 1 a 112) es necesario pero no suficiente para la degradación de TP53 y el dominio 113-290 se une al complejo E6AP/E6 (Gu *et al.*, 2001).

La proteína E6AP es una ubiquitina-ligasa E3 de 100kD, pertenece a la familia de ubiquitín-ligasas llamadas proteínas E3 HECT, las cuales transfieren directamente la ubiquitina a sus sustratos. La vía de degradación por ubiquitinación involucra una cascada de eventos enzimáticos incluyendo la activación de la ubiquitina, su unión a la proteína sustrato y degradación de la enzima-sustrato. La enzima activadora de la ubiquitina E1 cataliza la formación de un enlace tiol-éster entre una cisteína y el C-terminal de la glicina de la ubiquitina, lo cual requiere ATP. La ubiquitina es transferida al sitio tiol de una o varias proteínas conjugadoras de la ubiquitina E2, antes de transferirse al sustrato, en combinación con la ubiquitin ligasa E3. El conjugado ubiquitina-proteína es producido por la formación de un isopéptido unido entre el C-terminal de la glicina de la ubiquitina y grupo ϵ -amino del un residuo de lisina de la proteína blanco. El sustrato proteico ubiquitinado es reconocido y degradado por el complejo 26S del proteosoma (**Figura 7**) (Daniels *et al.*, 1998). Debido a esta cascada de eventos, los niveles celulares de TP53 (cuya vida media se estima en 20 a 40 minutos), en células infectadas con VPH-ar son dos o tres veces más bajos comparados a queratinocitos normales debido a su degradación por E6 (Butz *et al.*, 1995).

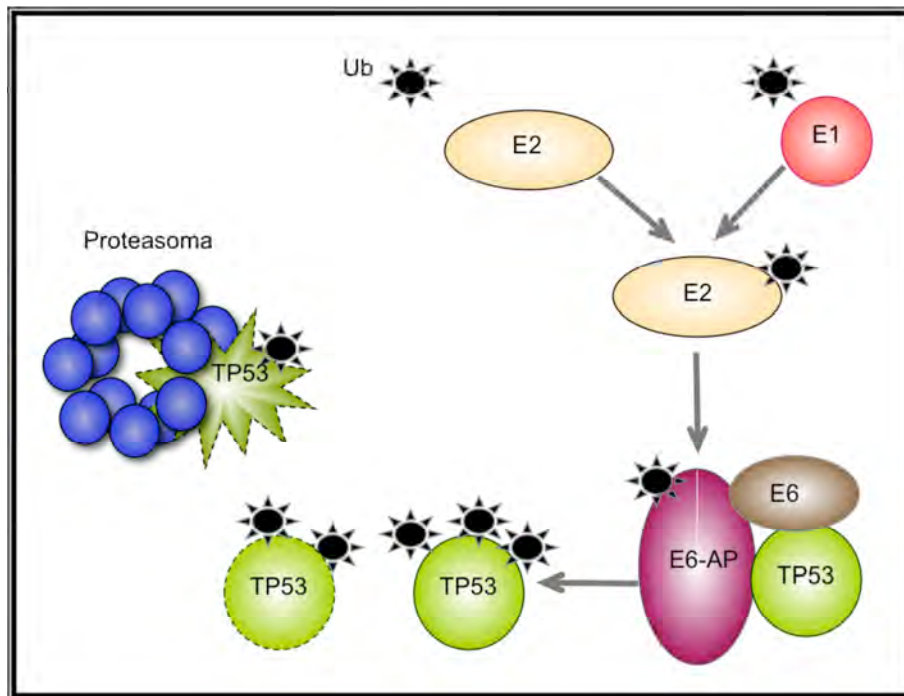


Figura 7. Degradación de TP53 por E6. E1 es la enzima activadora de la ubiquitina cataliza la formación de un enlace tío-éster entre la ubiquitina, posteriormente la ubiquitina es transferida a un sitio tío-éster de la enzima conjugadora de ubiquitina E2, después la ubiquitina se transfiere a la ubiquitin ligasa E3 o E6AP quien a su vez la transfiere a la proteína blanco, en este caso a p53, la cual una vez ubiquitinada es reconocida por el sistema proteosoma 26S para su degradación. (Tomado y modificado de Daniela *et al.*, 1998).

Sin embargo, se ha determinado que E6 puede interactuar con TP53 en ausencia de E6AP y a su vez, E6AP puede interactuar con p53 en ausencia de E6 y que la degradación de p53 ocurre en la región perinuclear de las células (Daniels *et al.*, 1998). Por otra parte se ha determinado que E6 de VPH16 promueve la ubiquitinación y auto-degradación de E6AP, la vida media de E6AP es más corta en células de CC positivas para HPV que en las negativas (Kao *et al.*, 2000). Ensayos con RNAi para E6AP indican que existe baja expresión de E6AP y acumulación de TP53, así como supresión del crecimiento en células HPV positivas (Hengstermann *et al.*, 2005).

Se ha determinado que E6 de VPH-br y VPH-ar puede alterar la capacidad transcripcional de TP53 al unirse a su región C-terminal, independientemente de la

degradación de TP53 (Li y Coffino, 1996). Esta interacción resulta en la inhibición de la represión transcripcional de genes que contienen en sus promotores caja TATA, (Lechner *et al.*, 1992), así como represión de la transactivación en promotores que contienen elementos de respuesta a TP53 (Thomas *et al.*, 1995).

Por otra parte, diversos estudios, han sugerido que un polimorfismo de tipo SNP en el codon 72 de TP53 afecta su degradación por E6. Se ha propuesto que el genotipo 72 Arg/Arg representa un posible riesgo en el desarrollo de CC, ya que se ha encontrado más representado en casos de CC que en sujetos normales, además que estudios *in vitro* demuestran que es más susceptible a la degradación por E6 de VPH 16 que TP53 72 Pro/Pro (Storey *et al.*, 1998). Sin embargo, estudios clínicos en otras poblaciones no muestran tal asociación (Minaguchi *et al.*, 1998). Además, la frecuencia de los polimorfismos varía de acuerdo con la región geográfica así como a la etnicidad (Beckman *et al.*, 1994).

El SNP del codón 72 de TP53 tiene efectos biológico distintos, por ejemplo, el SNP 72 Pro posee una capacidad transcripcional más fuerte que el SNP 72 Arg (Thomas *et al.*, 1999).

Por otra parte, se han demostrado diferencias en cuanto a la actividad funcional de las proteínas E6 de los VPH-ar. Se sabe por ejemplo que E6 de VPH 16 produce una degradación más eficiente de TP53, que E6 de HPV18 (Wernes *et al.*, 1990); mientras que la interacción de la proteína DLG es más estable con E6 de VPH 18 que con E6-VPH-16 para inducir su degradación (Gardioli *et al.*, 1999).

Por lo que es posible que la presencia de polimorfismos de TP53 como el del codón 72, estén asociados a la susceptibilidad de CC, sin embargo no se han descrito la frecuencia de los polimorfismos de TP53 en la población mexicana.

3.0 JUSTIFICACIÓN

El CC es la segunda neoplasia más común en mujeres mexicanas y la infección por VPH es el principal factor de riesgo. A nivel mundial los VPH 16 y 18 son los de mayor frecuencia, aunque la distribución de los tipos virales varía de acuerdo a la región geográfica y/o étnica. En México, a pesar de ser un país con una incidencia de CC elevada, hasta el 2006 sólo se habían publicado dos trabajos (Torroella *et al.*, 1998; Carrillo *et al.*, 2004) donde se mostraba la detección de VPH en las distintas etapas del desarrollo del CC y se conocía poco sobre los tipos virales en la población mexicana. Por esta razón en la primera etapa de este trabajo se realizó la detección y tipificación de VPH en muestras del epitelio cervical en mujeres provenientes de la región central del valle de México.

Por otra parte, actualmente es aceptado que la infección por VPH no es suficiente para el desarrollo de CC, por lo cual se sugiere que otros factores como los genéticos, particularmente los polimorfismos, pudieran estar involucrados en la susceptibilidad para el desarrollo de CC. Uno de los genes candidatos para el estudio de polimorfismos como factor de riesgo en el desarrollo de CC es el gen *TP53*, debido a que es inactivado por las oncoproteínas E6 de los VPH-ar.

TP53 es un gen supresor de tumores que participa en el control del ciclo celular y apoptosis. Se ha demostrado que en aproximadamente 50% de los casos de cáncer en general, *TP53* es inactivado por mutación. En contraste, en CC la presencia de mutaciones es muy baja y la inactivación se debe a la degradación de la proteína por el complejo E6-E6AP-ubiquitinación y degradación por proteosoma. Por otra parte, *TP53* presenta 36 SNPs en la región codificante y 366 en regiones no codificantes. Los SNPs codificantes que generan cambios en el aminoácido pueden generar ligeros cambios conformacionales o funcionales, lo cual pudiera afectar las interacciones con E6 de los VPH-ar y favorecer la interacción y degradación, como se ha mostrado en el SNP del codon 72. En la literatura, sólo se ha descrito al SNP del codón 72 como posible factor de riesgo para el desarrollo del CC con resultados

controvertidos, debido en parte a las distintas técnicas empleadas, etnicidad, tipo de muestras etc.

Por lo cual en el presente trabajo, realizamos una caracterización de los polimorfismos del exón 4 y así como del dominio de unión a DNA de *TP53*, el cual es codificado por los exones 5 al 9 con la finalidad de determinar si alguno o algunos de los polimorfismos detectados se encuentran con mayor frecuencia en los casos de CC, lo cual pudiera ser un factor de riesgo genético para el desarrollo del CC.

4.0 HIPÓTESIS

Identificaremos cambios en la secuencias de *TP53*, específicamente SNP, algunos de los cuales se encuentren más representados en pacientes con CC, por lo cual podrían considerarse como factor de susceptibilidad genética en CC.

5.0 OBJETIVO GENERAL

Determinar los tipos de VPH y los polimorfismos del dominio de unión a DNA del gen *TP53* asociados a cáncer cervical uterino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la prevalencia y tipos de VPH en muestras del epitelio cervical sin alteraciones neoplásicas, lesiones precursoras y CC.
- Determinar los polimorfismos del exón 4 y del dominio de unión al DNA, el cuál comprende a los exones 5, 6, 7, 8, y 9 de *TP53*, en células de sangre periférica en mujeres sin lesión neoplásica y en pacientes con CC.
- Determinar si existen diferencias en la presencia de los polimorfismos en mujeres sin lesiones neoplásicas y en mujeres con CC.
- Determinar si existe una asociación entre la presencia de polimorfismos y el tipo de VPH.

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestras biológicas

Es un estudio de tipo observacional de casos y controles con las siguientes características:

Criterios de inclusión controles

- ❖ Mujeres con vida sexual activa (VSA),
- ❖ colposcopia negativa,
- ❖ Papanicolaou negativo
- ❖ Con datos clínicos de las pacientes
- ❖ Consentimiento informado firmado

Criterios de inclusión de casos con cc

- ❖ Mujeres con diagnóstico histopatológico de CC
- ❖ Con datos clínicos
- ❖ Consentimiento informado firmado

Criterios de inclusión de lesiones precursoras

- ❖ Mujeres con vida sexual activa (VSA),
- ❖ Con diagnóstico citopatológico de LIEBG y LIEAG
- ❖ Con datos clínicos
- ❖ Consentimiento informado

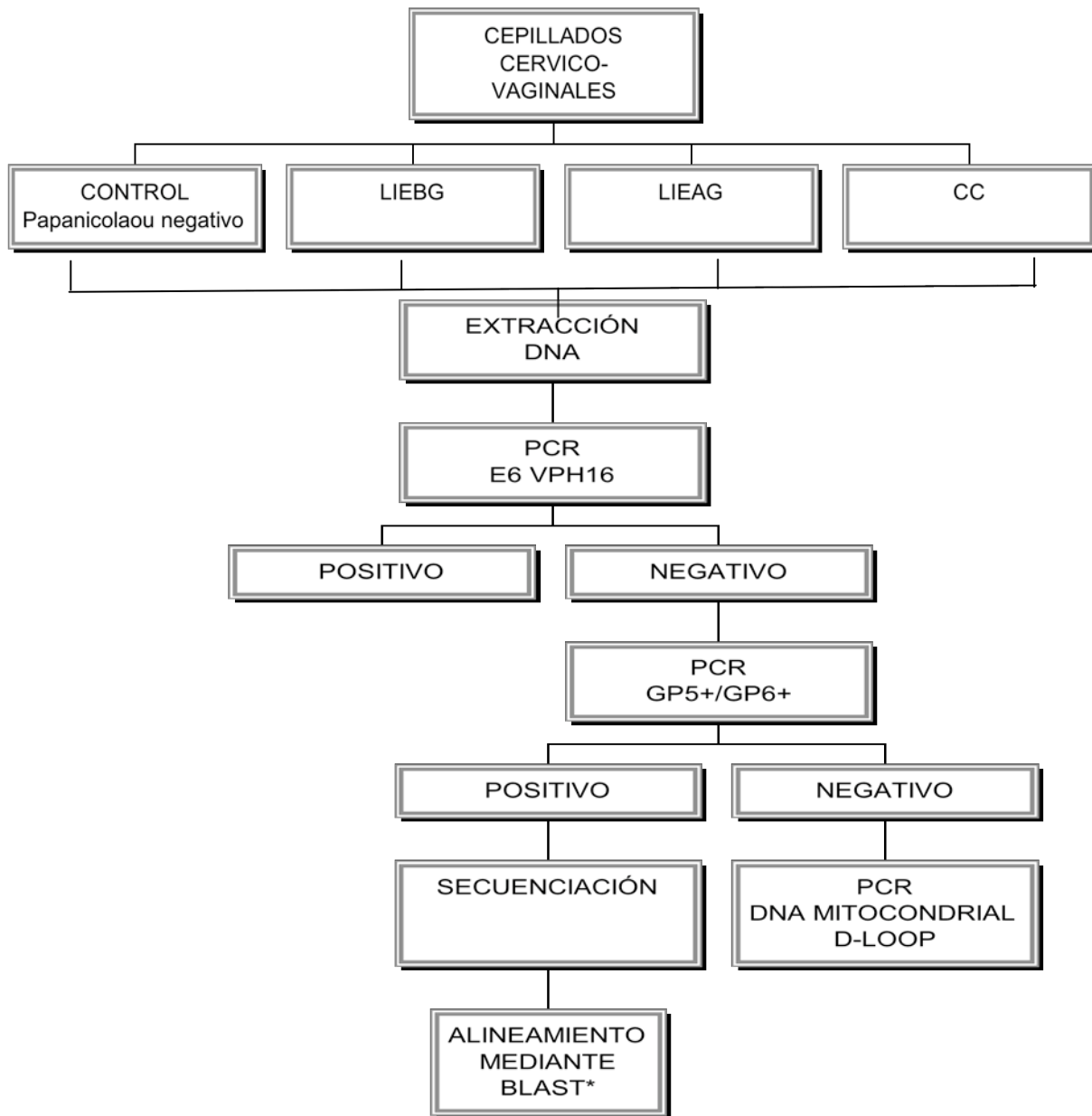
Las muestras fueron colectadas a partir del programa de Detección Oportuna del Cáncer (DOC), de las Clínicas de Displasias y Servicio de Ginecología Oncológica del Hospital General de México y del Hospital de Oncología de CMN S XXI. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación con 3062.

6.2 Diseño experimental

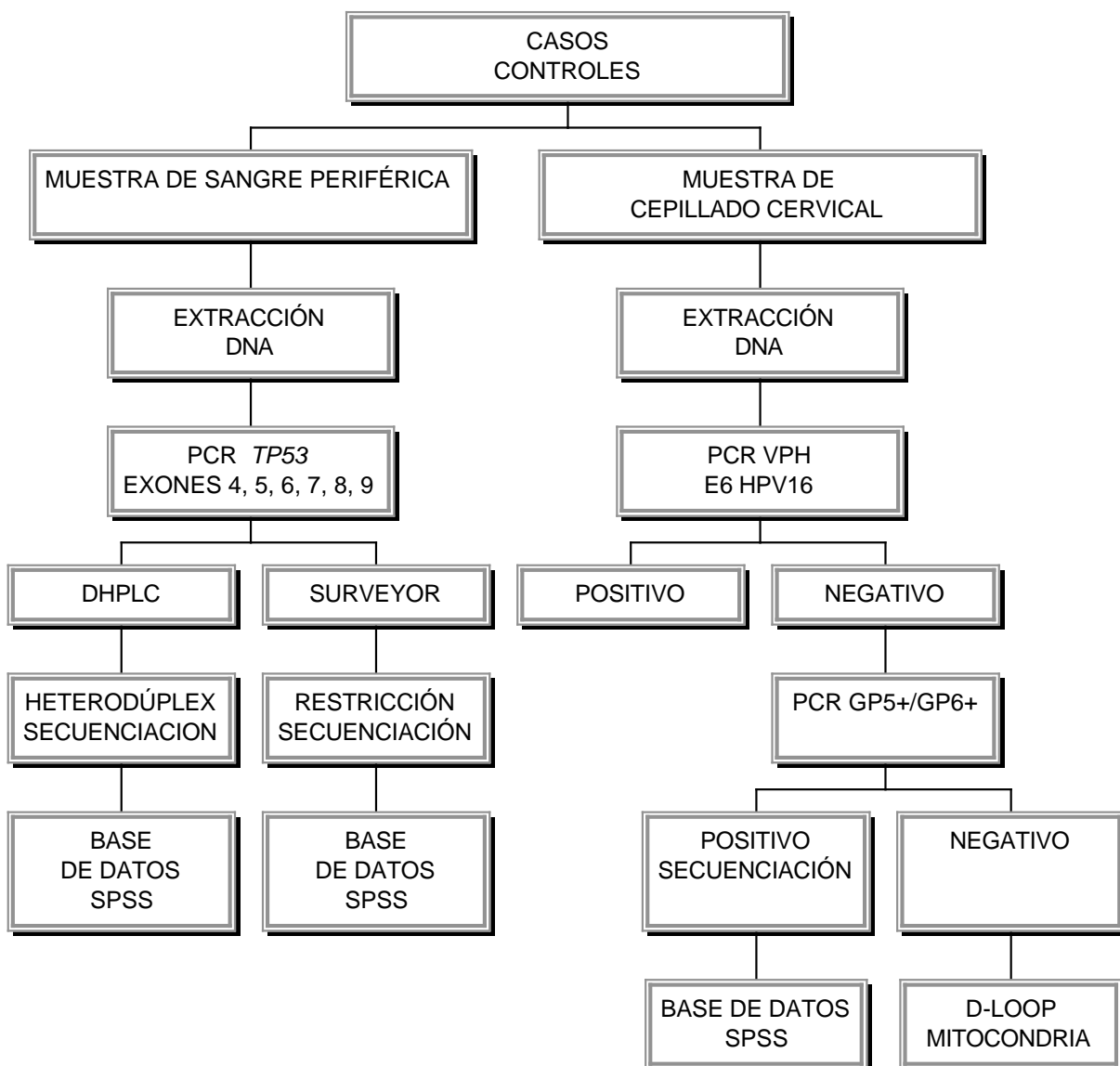
En la primera fase se realizó la detección y tipificación de VPH. Para ello se tomaron muestras de cepillados cérvico-vaginales, las cuales fueron asignadas al grupo control cuando el reporte de Papanicolaou fue negativo.

En los casos según el diagnóstico histopatológico las muestras se asignaron como LIEAB, LIEAG y CC. Se tomaron los datos clínicos de cada paciente y se realizó la extracción de DNA para la tipificación de VPH, como se muestra en el esquema del diseño experimental.

En la segunda fase se realizó la detección de polimorfismos de *TP53*, para lo cual se seleccionaron casos y controles, según el diagnóstico histopatológico. De cada paciente se tomaron dos muestras biológicas: se tomaron 5 ml de sangre periférica para la determinación de los polimorfismos la cual fue colectada en tubos estériles con EDTA. Por otra parte se tomó un cepillado de células del cuello uterino, el cual fue colocado en medio de transporte para la tipificación del VPH. Las muestras fueron etiquetadas y transportadas al laboratorio para su proceso.

DISEÑO PARA LA DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH

BLASTdel inglés *Basical Local Alignment Search Tool*

DISEÑO PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS

6.2.1 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA de las muestras de sangre periférica y de las muestras del cérvix por medio Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) según las indicaciones del proveedor. Una vez purificado e hidratado en agua libre de DNasa, se realizó la cuantificación mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000. La integridad del DNA fue corroborada por medio de electroforesis en gel de agarosa y visualizado por medio de la tinción de bromuro de etidio. Todas las muestras se almacenaron a 4°C.

6.2.2 PCR de *TP53*

Se realizó PCR para la amplificación de los exones 4, 5, 6, 7, 8 y 9 con iniciadores específicos según lo reportado por Gross (2001). La secuencia de los iniciadores y condiciones de amplificación se muestran en la **tabla 7**. La reacción para PCR consistió en: 2 mM de MgCl₂, 200 nM de cada oligonucleótido, y 1.5U de enzima Discoverase (Invitrogen USA), 100ng de DNA en un volumen final de 50 µl. Se utilizó un termociclador PCR Sprint Thermo Hybaid con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 95°C por 4 min, 30 ciclos de denaturalización a 95°C 45 sec, 60°C 30 sec, y 72°C 1 min, y una extensión final de 4 min at 72 °C. Los productos de PCR fueron resueltos en gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio, los cuáles fueron visualizados en un transiluminador para verificar la presencia de productos específicos.

Adicionalmente se realizó la amplificación del DNA de las regiones mencionadas, de las líneas celulares MCF-7, la cual presenta una secuencia silvestre (número de acceso U94788) así como de las líneas celulares SW480 y Jurkat, las cuales presentan mutaciones en *TP53* para utilizarse como control de mutación.

TABLA 7
INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE TP53 Y TM UTILIZADA PARA LA PCR

EXON	SENTIDO	ANTISENTIDO	Tm	PB	REGIÓN
4	ACCTGGTCCTCTGACTGCTC	GCCAGGCATTGAAGTCTC	60	363	11984-12346
5 y 6	CCGTGTTCCAGTTGCTTTAT	TTAACCCCTCCTCCCAGA	60	488	12983-13471
7 a 9	TGCTTGCCACAGGTCTCC	AGAAAACGGCATTGAGTG	62	883	13939-14821
7	TGCTTGCCACAGGTCTCC	CCGGAATGTGATGAGAGGT	60	301	13939-14239

6.3 Detección de polimorfismos

6.3.1 Detección de polimorfismos de TP53 mediante Cromatografía Líquida Parcialmente Desnaturalizante (D-HPLC)

El tamizaje de los polimorfismos se realizó mediante la tecnología de D-HPLC (Equipo Transgenomic Wave™), la cual se basa en la formación y separación por cromatografía líquida y temperatura, de moléculas heterodúplex parcialmente desnaturalizadas, formadas a partir de una cadena de DNA mutante o polimórfica y otra normal (O'Donovan *et al.*, 1998). Las moléculas heterodúplex tiene en perfil de elusión más rápido que las homodúplex, estas son detectadas por UV y graficadas en un cromatograma. Una vez obtenidos los perfiles cromatográficos se realizó secuenciación directa de las muestras con patrones heterodúplex.

Para este procedimiento se mezclaron 20 µl del producto de PCR de cada una de las muestras, tanto casos como controles con 20 µl de la secuencia de referencia control (WT), que en este caso fue el producto de MCF7. Esta mezcla fue desnaturalizada 95° C por 5 minutos se enfriaron hasta 65° C con disminución gradual de temperatura de 1° C/min, y finalmente 1 minuto a 65° C. 6 µl de los productos mezclados fueron corridos en la columna precalentada del DHPLC (Transgenomics). Las muestras se eluyeron 0.9 ml/min con un gradiente del amortiguador A (acetato de trietilamonio 0.1 M, TEAA,) y del amortiguador B (0.1 M TEAA, 25% acetonitrilo). La selección de la temperatura para la elusión de las

cadena heterodúplex fue con base en los resultados obtenidos por el *software* (<http://insertion.stanford.edu/cgi-bin/melt.pl>), así como por estandarización de productos previamente caracterizados como silvestres o WT y productos controles con mutación. Las muestras se resolvieron 1° C arriba y 1° C debajo de la temperatura calculada, con el fin de asegurar la detección de todas las posibles cadenas heterodúplex. En la **tabla 8** se muestran las condiciones de corrida para cada producto. Los productos con patrones polimórficos fueron purificados mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281) para posteriormente realizar la secuenciación.

TABLA 8
CONDICIONES DE DHPLC EN CADA PRODUCTO.

PRODUCTO	Tamaño	Tm calculada	Tm óptima	% B
Exón 4	363	61.50	62.9 ±1	56.3
Exón 5 y 6	488	60.75	60.5 ±1	58.4
Exón 7 a 9	883	60.50	58.3 ±1	61.5

Donde B=0.1M TEAA, pH 7, 25% acetonitrilo.

6.3.2 Detección de polimorfismos de *TP53* mediante restricción enzimática *Surveyor*

Otro método de tamizaje utilizado fue por medio de la enzima Surveyor® (Transgenomics) que es una nucleasa derivada del apio, la cual reconoce puntos de “mismatch” o no apareamiento. Para ello se realiza la hibridación de los productos de PCR con una muestra control normal de referencia, de la misma manera que para el DHPLC a fin de formar cadenas homodúplex y hetodúplex. Posteriormente, los productos son digeridos con 1 µl de la enzima por 20 minutos a 42° C y 1 µl de Surveyor Enhancer S; se detuvo la reacción con la solución inhibidora. Posteriormente, los productos fueron resueltos en geles de agarosa al 3% y con en el base al patrón de restricción se identificaron las que presentan puntos de no apareamiento, los cuales corresponden a polimorfismos y/o mutaciones. Las muestras seleccionadas fueron sometidas nuevamente a PCR y purificadas mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281) para posteriormente realizar la secuenciación.

6.3.3 Secuenciación

Las muestras que fueron detectadas como polimórficas por los métodos de DHPLC y Surveyor fueron purificadas mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281). Posteriormente se cuantificó el DNA en espectrofotómetro Nanodrop 1000 y los productos fueron resueltos en geles de agarosa al 2% para verificar la presencia de producto específico. Posteriormente se tomaron 10-20 ng de DNA los cuales fueron marcados para secuenciación mediante el sistema de reacción por terminación de la cadena Big Dye v3.1 (Applied Biosystem). El marcaje se realizó en 25 ciclos a 96° C 10 segundos, 50° C 10 segundos y 65° C 4 minutos. Se realizó la secuenciación con los iniciadores sentido y antisentido. Posteriormente se purificaron los productos mediante columnas DyeEx de Qiagen. Los productos purificados fueron secados mediante el sistema *Speed Vac*, posteriormente fueron desnaturalizados en 20 µl de formamida HiDi (Applied Biosystem) 5 minutos. Los productos fueron secuenciados en el secuenciador de capilares ABI3100 de Applied Biosystem. Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron analizadas mediante el programa 4Peaks y el algoritmo BLAST por sus siglas en inglés *Basical Local Alignment Search Tool* para determinar los cambios en la secuencia de acuerdo con la secuencia de referencia X54156.

6.4 Detección de VPH

Se realizó la detección de VPH en las muestras provenientes de cepillados cervicales mediante PCR con iniciadores específicos para el gen E6 de VPH tipo 16. Las muestras negativas fueron sometidas a PCR con los iniciadores GP5+ y GP6+, los cuales amplifican una región consenso del gen L1 de los VPH. Los productos amplificados fueron purificados, cuantificados y marcados con el sistema Big Dye v3.1 como se mencionó anteriormente. Se determinó el tipo de VPH por medio de BLAST.

Las muestras negativas para ambos iniciadores fueron sometidas a PCR de un gen

endógeno para descartar que la no amplificación se debiera a la degradación del DNA, por lo cual se utilizaron iniciadores de la región regulatoria (D-Loop) de mitocondria cuyo producto es de 160 pb.

TABLA 9
INICIADORES EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DE VPH

INICIADORES	SECUENCIA	TM	PRODUCTO
E6HPV16F	CAGGACCCACAGGAGCGACCC	55 C	126 pb
E6HPV16R	GTCATATACCTCACGTCGCAG		
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	40 C	155pb
GP6+	GAAAATAAACTGTAAATCATATTC		
D-Loop F	CGTACATTACTGCCAGCCACCAT	55 C	166 pb
D-Loop R	GGTGGCTTTGGAGTTGCAGTTG		

Los iniciadores para la región regulatoria del DNA mitocondrial (D-Loop) fueron utilizados como control endógeno de amplificación.

6.5 Análisis estadístico

Los datos tanto clínicos como los resultados de la tipificación viral y la secuenciación fueron manejados en el paquete estadístico SPSS v12. Se realizó un análisis descriptivo de los datos clínicos, así como la prueba de χ^2 para comparar las frecuencias y significancia de las variables clínicas y de los polimorfismos encontrados.

Se realizó la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), y la prueba de máxima expectación para determinar las frecuencias genotípicas con fase desconocida. Estas pruebas se llevaron a cabo en el programa Arlequín versión 1.1.

Por último se determinó la razón de momios (RM) y regresión logística no condicionada ajustando por variables potencialmente confusorias. El análisis de sobrevida se realizó mediante la prueba de Kaplan-Meier.

7.0 RESULTADOS

7.1 Detección y tipificación de VPH

Se obtuvo DNA de citologías exfoliativas del cuello uterino de un total de 421 muestras, de las cuales 159 correspondieron a epitelio cervical con diagnóstico de Papanicolaou negativo a células displásicas, 95 con diagnóstico de LIEBG, 59 LIEAG y 108 CC. Se realizó PCR con iniciadores específicos para E6 de VPH tipo 16, (ya que es el de mayor frecuencia). En las muestra que resultaron negativas para HPV16 se realizó PCR con iniciadores GP5+/GP6+ (los cuáles amplifican una amplia variedad de VPH del género alfa), los productos fueron secuenciados y alineados mediante el algoritmo BLAST para identificar los tipos virales.

El análisis de las secuencias mostró un total de 20 tipos virales, de los cuales 11 fueron de alto riesgo: 16, 31, 35, 52, 58, 33, 18, 45, 39, 59 y 56; 4 tipos virales de bajo riesgo: 70, 11, 6b y CP8304, tres de riesgo no determinado: 67, 73 y 69; y dos de probable alto riesgo: 66 y 53. La prevalencia de VPH fue de 12%, 57%, 88% y 92% en controles, LIEBG, LIEAG y CC, respectivamente. Respeto al grupo de controles se encontró una proporción de cinco VPH de alto riesgo por uno de bajo riesgo (5:1 VPH-ar:VPH-br). En las LIEBG, detectamos VPHar en 50% de las muestras analizadas.

El VPH16 fue el más frecuente en todas las muestras analizadas con un 3.8%, 25.3% 42.4% y 72.2% en controles, LIEBG, LIEAG y CC, respectivamente. Mientras que VPH58 fue el segundo en frecuencia en LIEBG y LIEAG con 5.6 y 18.3% respectivamente; mientras que en CC fue VPH18 con 4.6%.

El análisis filogenético demostró que 75% de los tipos virales detectados corresponden a la especie A9 (donde se encuentra VPH16), 15% a la especie A7 (VPH18) y 5% a la especie A6 (**Tabla 10**).

TABLA 10
PREVALENCIA DE VPH EN LESIONES DEL CÉRVIX UTERINO

sp	TIPO	CE	NORMAL		LIEBG		LIEAG		CC		TOTAL n
			%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	
	16	AR	3.8	(6)	25.3	(24)	42.2	(25)	72.22	(78)	133
	31	AR	0	(0)	4.2	(4)	3.4	(2)	1.9	(2)	8
	35	AR	0	(0)	1.1	(1)	0	(0)	0.9	(1)	2
	52	AR	1.3	(2)	1.1	(1)	3.4	(2)	0	(0)	5
	58	AR	0.6	(1)	5.3	(5)	18.6	(11)	1.9	(2)	19
	33	AR	0	(0)	0	(0)	1.7	(1)	0.9	(1)	2
	67	ND	0	(0)	0	(0)	1.7	(1)	0	(0)	1
A9			5.6	(9)	36.8	(35)	71.1	(42)	77.7	(84)	170
	18	AR	0.6	(1)	4.2	(4)	6.7	(4)	4.6	(5)	14
	45	AR	1.3	(2)	4.2	(4)	1.7	(1)	0.9	(1)	8
	59	AR	1.9	(3)	2.1	(2)	0	(0)	1.9	(2)	7
	70	BR	1.3	(2)	2.1	(2)	0	(0)	0	(0)	4
	39	AR	0	(0)	0	(0)	1.7	(1)	0.9	(1)	2
A7			5.0	(8)	12.6	(12)	10.16	(6)	6.5	(9)	38
	66	PAR	0.6	(1)	1.1	(1)	1.7	(1)	0	(0)	3
	53	PAR	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1.9	(2)	2
	56	AR	0	(0)	4.2	(4)	3.4	(2)	0	(0)	6
A6			0.6	(1)	5.2	(5)	5.08	(3)	1.9	(2)	11
A10	11	BR	0	(0)	1.1	(1)	0	(0)	0	(0)	1
A10	6b	BR	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2.8	(3)	3
A11	73	ND	0.6	(1)	0	(0)	1.7	(1)	0	(0)	2
A5	69	ND	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0.9	(1)	1
A3	CP8304	BR	0	(0)	1.1	(1)	0	(0)	0	(0)	1
	Otro		0	(1)	2.1	(2)	0	(1)	0.9	(4)	8
	POSITIVO		11.9	(19)	56.8	(54)	88.1	(52)	91.6	(99)	224
	TOTAL		100	(159)	100	(95)	100	(59)	100	(108)	421

Sp: especie, CE: clasificación epidemiológica, AR: alto riesgo, BR: bajo riesgo, PAR, probable alto riesgo, ND: no determinado, LIEBG: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, LIEAG: lesión intraepitelial escamosa de alto grado, CC: cáncer cervical invasor.

Posteriormente fueron clasificados los tipos virales de acuerdo a su grupo filogenético y se determinaron los riesgos de infección en los distintos grupos de muestras, con respecto al grupo control. Como se puede observar en la **tabla 11** la RM más alta fue para el grupo de VPH relacionados a VPH16 en LIEBG (RM 16 IC 6.4-42.4), y en LIEAG fue el grupo de los VPH donde se encuentra VPH58 (RM 100 IC 95% 23.3-427.8).

TABLA 11
ASOCIACIÓN ENTRE LOS SUBGRUPOS DE VPH Y EL GRADO DE LESIÓN

VPH	N n	LIEBG		LIEAG		CC	
		n	RM ² IC ^{95%}	n	RM ² IC ^{95%}	n	RM ² IC ^{95%}
NEGATIVO VPH ¹	140	41	1.0	7	1.0	9	1.0
VPH 16, 31, 35	6	29	16.5 (6.4-42.4)*	27	90.0 (28.0-288.7)*	81	210.0 (72.1-611.3)*
VPH 58, 33, 52, 67	3	6	6.8 (1.6-28.5)*	15	100.0 (23.3-427.8)*	3	15.5 (2.7-88.3)*
VPH 18, 45, 59	6	10	5.7 (1.9-16.6)*	5	16.7 (4.0-68.1)*	8	20.7 (5.9-72.7)*
VPH 56, 53, 66	1	5	7.0 (0.9-150.3)	3	60.0 (5.5-652.9)*	2	31.1 (2.5-376.4)*
OTROS VPH	3	4	-	2	-	5	-
Positivos VPH	19	54	9.7 (5.2-18.2)*	52	54.7 (21.7-1137.8)*	99	81.0 (35.2-186.6)*

¹ Grupo de referencia. RM² ajustada por edad. *Estadísticamente significativo.

7.1.2 Características clínicas

Se tomaron datos clínicos de las pacientes y se analizaron para determinar cuáles eran factores de riesgo. Como se observa en la **tabla 12**, en este grupo de muestras estudiadas, la edad no es un factor de riesgo para el desarrollo de LIEBG y LIEAG, sólo para CC. La edad de inicio de vida sexual, el número de parejas sexuales y número de embarazos no fueron asociados al desarrollo de LIEBG. En contraste estos factores se asociaron significativamente al desarrollo de LIEAG y CC.

Posteriormente se realizó el análisis de polimorfismos del gen *TP53*. Dicho análisis se realizó en un grupo independiente de casos y controles, es decir, pacientes con diagnóstico histopatológico de CC y un grupo de mujeres con diagnóstico de Papanicolaou y colposcopia negativos.

TABLA 12
FACTORES CLÍNICOS ASOCIADOS A LESIONES DEL CÉRVIX UTERINO

FR	¹ C n ₀	LIEBG			LIEAG			CC		
		n ₁	RMa	IC _{95%}	n ₂	RMa	IC _{95%}	n ₃	RMa	IC _{95%}
EDAD										
<40	108	56	1.0		34	1.0		23	1.0	
≥40	51	39	1.0	0.6-1.8	25	0.9	0.4-1.8	83	4.1	2.0-8.3*
IVS										
≥18	112	63	1.0		30	1.0		47	1.0	
<18	47	32	1.4	0.8-2.6	29	3.0	1.4-6.5*	61	4.0	2.1-8.2*
P.SEX										
≤ 2	144	84	1.0		47	1.0		79	1.0	
> 2	33	11	1.3	0.5-3.2	12	2.7	1.0-7.5*	29	3.7	1.4-9.5*
EMB.										
0-2	79	45	1.0		18	1.0		13	1.0	
2-4	65	27	0.6	0.3-1.1	21	1.0	0.4-2.4	20	1.0	0.4-2.4
≥5	15	23	2.2	0.9-5.4	20	5.0	1.7-14.7*	45	14.9	5.2-42.1*

¹El grupo de referencia o control son mujeres con reporte de citología y colposcopia negativa a lesiones. FR: factor de riesgo, IVS: edad de inicio de vida sexual, Par sex: número de parejas sexuales. RMa: razón de momios ajustada por infección., IC: intervalo de confianza de 95% C n₀ número de controles. * Estadísticamente significativo.

Estos datos son ampliados en el anexo 1 (Int J Gynecol Cancer 2006).

7.2 Detección de polimorfismos del exón 4 de *TP53* y características clínicas

Para este estudio se seleccionó un grupo independiente de casos (CC) y controles con los criterios antes descritos, de los cuales se obtuvieron muestras de sangre periférica para la detección de polimorfismo y de células exfoliadas del cuello uterino para la detección y tipificación de VPH. De las muestras colectadas, se seleccionaron las que contaban con datos clínicos completos, los cuales se describen a continuación.

7.2.1 Características clínicas

Se analizaron un total de 111 casos de CC y 126 controles (reporte de Papanicolaou y colposcopia negativos). La edad promedio en los casos fue de 53.63 ± 12 y de 43.9

± 12.8 años en los controles. El inicio de vida sexual activa fue de 18.5 ± 4 y de 19.0 ± 3.6 años en casos y controles respectivamente. El número de embarazos fue de 6 ± 3 en los casos y 4 ± 2 en los controles. Estas variables fueron estratificadas y se determinaron posibles diferencias entre los casos y controles, mediante la prueba de χ^2 .

TABLA 13
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS MUESTRA ESTUDIADAS

VARIABLE	CC		CONTROL		RM (IC95%)	p
	N	(%)	n	(%)		
EDAD						
< 50	47	(42.3)	78	(61.9)	1.0	0.003*
≥ 50	64	(57.7)	48	(38.1)	2.12 (1.31-3.72)	
IVSA						
≥ 18	52	(46.8)	81	(64.3)	1.0	0.007*
< 18	59	(53.2)	45	(35.7)	2.04 (1.21-3.43)	
PAREJAS SEXUALES						
0-1	61	(55.0)	78	(61.9)	1.0	0.278
≥ 2	50	(45.0)	48	(38.1)	1.3 (0.80-2.23)	
EMBARAZOS						
0-2	15	(13.5)	49	(38.9)	1.0	0.000*
3-6	50	(45.0)	57	(45.2)	2.83 (1.43-5.72)	
≥ 7	46	(41.4)	20	(15.9)	7.5 (3.44-16-40)	
TABAQUISMO						
NO	70	(66.1)	90	(73.8)	1.0	0.203
SI	36	(34.0)	32	(26.2)	1.44 (0.81-2.55)	
ANTICONCEPTIVOS HORMONALES						
NO	73	(69.5)	56	(72.7)	1.0	0.382
SI	32	(30.5)	21	(27.3)	1.16(0.60-2.42)	
VPH						
VPH 16	56	(53.3)	13	(10.6)		0.000*
VPH 18	8	(7.6)	0	(0)		
OTROS	34	(32.4)	17	(13.8)		
NEGATIVO	7	(6.7)	93	(75.6)		
M.I.	6	-	3	-		
ETAPA (FIGO)						
IB	8	(7.2)	-			
IIA	3	(2.7)				
IIB	58	(52.2)				
IIIB	38	(34.2)				
IVA	3	(2.5)				
IVB	1	(0.9)				
TIPO HISTOLÓGICO						
Escamoso	87	(82.0)				
Adenocarcinoma	14	(13.2)	-			
Adenoescamoso	5	(4.7)				
TRATAMIENTO						
Radioterapia y BQT	94	(89.5)				
Radioterapia y CT	12	(11.4)	-			

MI: Muestra inadecuada. Significancia de $p < 0.05$.

Como se muestra en la **tabla 13**, las variables que mostraron ser diferentes en ambos grupos fueron la edad, el IVSA y el número de embarazos ($p < 0.05$).

7.2.2 Polimorfismos del exón 4 de *TP53*

Se realizó la estandarización para el análisis del producto del exón 4 tanto para PCR como para DHPLC. Las condiciones óptimas para PCR fueron empleando una T_m de 60°C y concentración de MgCl de 4 mM.

Se obtuvieron productos de PCR de 111 casos y 126 controles del exón 4 de *TP53* cuyo producto es de 363 pb (**figura 8**) los cuales fueron resueltos en geles de agarosa al 2% para verificar la amplificación de un producto específico. Dichos productos fueron tamizados por DHPLC. Se realizaron corridas cromatográficas un grado centígrado arriba y un grado centígrado por debajo de la temperatura calculada con muestras provenientes de MCF-7 como control negativo de mutación y con una muestra con polimorfismo en el codon 72 que fue analizada por secuenciación en ambos sentidos. Basados en este análisis se determinó que la temperatura donde se identifican mejor los picos de las cadenas heterodúplex es 62.9°C . En la figura 6 se muestran los patrones cromatográficos de la muestra control MCF7 y de una muestra heterocigota en el codon 72 (CGC/CCC) el cual genera un cambio no sinónimo Arg>Pro.

En la figura 5 se muestran los patrones cromatográficos de las muestras control en A) corresponde al control WT de MCF-7 y en B) el cromatograma de la muestra heterocigota.

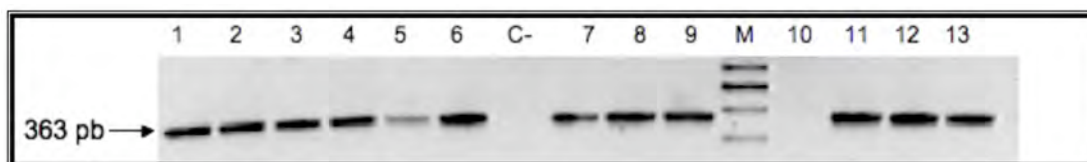


Figura 8 . Productos de PCR del exon 4 de *TP53*. Los productos fueron resueltos en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Visualizado en el fotodocumentador Eagle Eye. El producto es

de 363 pb y se observa la amplificación de un producto específico. Los carriles 1 a 13 son muestras, C- es el control negativo de la reacción, M marcador de peso molecular de 100 pb.

Una vez estandarizadas las condiciones para la cromatografía, se realizaron las corridas de las muestras control y de casos de CC que habían sido amplificadas. En la **tabla 14** se muestran los resultados obtenidos, donde el 56.8% de los casos mostraron patrones cromatográficos normales y el 43.2% (48/111) polimórficos; mientras que en los controles de los 126 productos amplificados el 65.9% fueron WT y el 34.1% mostraron patrón heterodúplex.

Se confirmó por secuenciación alguna muestras con patrón homodúplex, mostrando como se esperaba una secuencia normal.

Todas las muestras (n=91) con patrón heterodúplex fueron secuenciadas y analizadas, mediante alineamiento con el algoritmo BLAST con la secuencia de referencia GenBank X54156.

En casos y controles, detectamos dos SNPs ya reportados: rs:1800370 correspondiente al codón 36 G>A, el cual es un cambio sinónimo Pro>Pro y el SNP rs:1042252 correspondiente al codón 72 G>C el cual genera un cambio no sinónimo Arg>Pro. El SNP del codon 72 fue el de mayor frecuencia en controles.

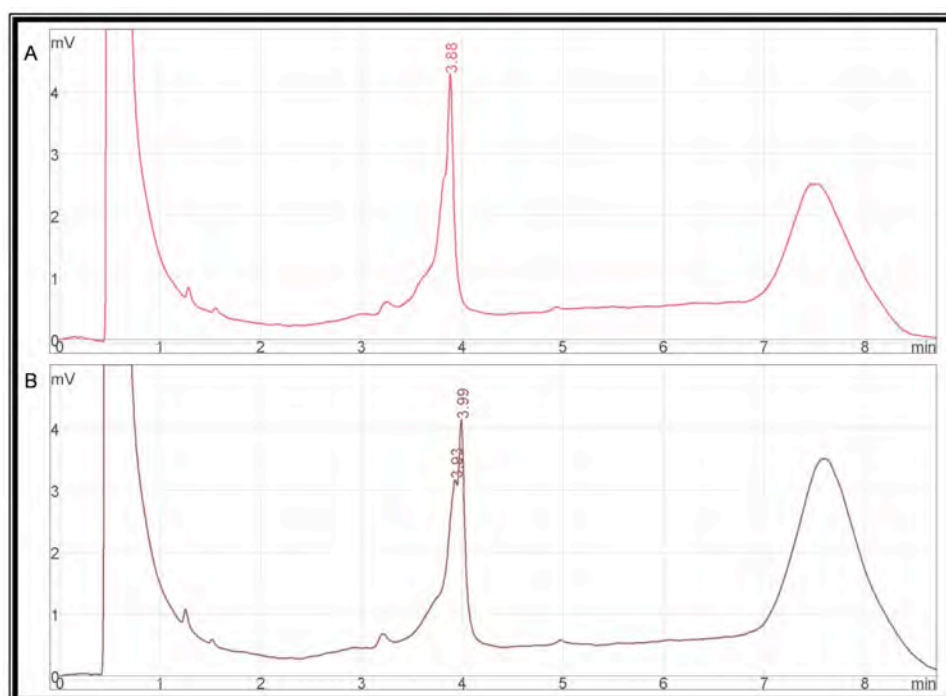


FIGURA 9. Patrones cromatográficos del control WT o silvestre y polimórfico del exón 4. En A) se presenta la muestra control MCF7 sin polimorfismos en el exón 4 (WT), en B) se presenta el patrón cromatográfico de una muestra polimórfica en el codón 72 de *TP53*. La temperatura de desnaturalización fue 62.9° C.

Se realizó una análisis de desequilibrio de ligamiento de Hardy-Weinberg, el cual mostró que tanto casos como controles se encontraban en equilibrio ($p > 0.05$).

Logramos identificar tres patrones cromatográficos característicos los cuales corresponden a tres tipos de variación en la secuencia y se muestran en la figura 10.

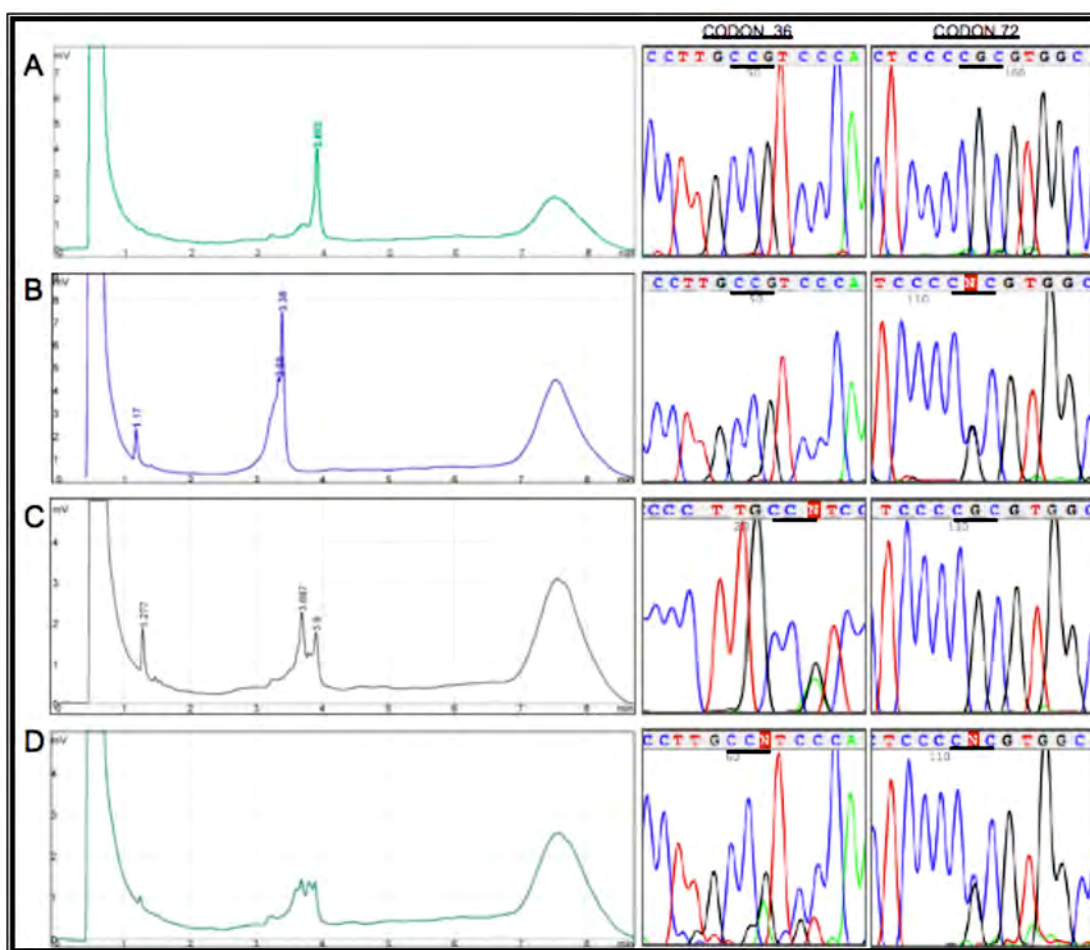


FIGURA 10. Patrones cromatográficos del exón 4 de *TP53*. Determinados patrones cromatográficos corresponden a distintos polimorfismos confirmados por secuenciación. A) un patrón corresponde al codón 36 y 72 WT o silvestre. B) corresponde al codón 72 polimórfico y 36 WT. C) Codón 36 heterocigoto y codón 72 homocigoto. D) Ambos codones polimórficos.

Se realizó la prueba de χ^2 para determinar si existían diferencias entre casos y

controles. Los resultados mostraron que el polimorfismo del codón 72 es significativamente diferente en casos y controles, ($p=0.043$) presentándose con mayor frecuencia en los controles (**tabla 14**).

TABLA 14
POLIMORFISMOS DEL EXÓN 4 DE TP53 EN CONTROLES Y MUESTRAS CON CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.

	CC (%)	CONTROL (%)	<i>p</i>
EXÓN 4			
POLIMORFICO	48 (43.2)	43 (34.1)	0.144
WT	63 (56.8)	83 (65.9)	
CODÓN 72			
AA	66 (59.5)	92 (73.0)	0.043*
AP	35 (31.5)	30 (23.8)	
PP	10 (9.0)	4 (3.2)	
CODÓN 36			
GG	107 (96.4)	117 (92.9)	0.232
GA	4 (3.6)	6 (7.1)	
AA	0	0	

*Estadísticamente significativo

Se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento mediante el programa Arlequín, así como el análisis de los haplotipos mediante el programa Maxlik. Los resultados se muestran en la **tabla 15**, donde se muestra que el haplotipo GC (codon 36 y 72: Pro/Pro) con diferencias significativas entre casos y controles ($p=0.011$).

TABLA 15
RAZÓN DE MOMIOS PARA LOS HAPLOTIPOS EN EL EXON 4 DE TP53

Haplotipo	CASOS	CONTROLES	χ^2	<i>p</i>	RM (IC95%)
GG	163	205	3.826	0.050	0.633(0.401-1.000)
AG	4	9	0.802	0.371	0.495(0.126-1.789)
GC	55	38	6.434	0.011*	1.855 (1.142-3.017)

RM: razón de momios, IC: Intervalo de confianza.*Estadísticamente significativo.

Adicionalmente se detectaron otros cambios no descritos previamente. Dichos cambios se detectaron en casos de CC, dos de los cuales presentaron una inserción en la posición 11,993 la cual corresponde al intrón 3. Uno de los cambios se detectó en una región exónica correspondiente al nucleótido 12271 de tipo heterocigoto, el cual genera un cambio de la Ser116 a Phe116. Los resultados de la secuenciación se muestran en la **tabla 16**.

TABLA 16

**OTROS CAMBIOS NUCLEOTÍDICOS DETECTADOS EN EL EXON 4 DE TP53
EN MUESTRAS DE PACIENTES CON CÁNCER CÉRVICO-UTERINO**

muestra	11993 in3	12271 116	12302 in4
3042	inT		-
1020	-		C>T ^{he}
11248	inT		-
11229		TCT>TTT ^{he} Ser>Phe	

he: Cambio heterocigoto.

7.2.3 Asociación con polimorfismos del exón de 4 de TP53 y VPH

Se detectó VPH en 24.4% de las muestras control y en 93% de los casos. El VPH tipo 16 fue el más común con 10.6% y 53.3% en controles y CC, respectivamente; mientras que VPH18 fue detectado sólo en CC en 7.6%. Otros tipos virales, fueron detectados en 13.8% de los controles y 32.4% de los casos. Se identificaron diferencias significativas ($p=0.043$) en el codón 72, encontrando una presencia mayor del genotipo Arg/Arg en casos. No se identificaron diferencias en la edad y etapa clínica de los casos con respecto a la presencia del SNP 72. Cuando se analizó con respecto a los tipos virales de manera individual, no se detectaron diferencias. Sin embargo, cuando se agruparon los tipos virales de mayor frecuencia en CC VPH16 y VPH18, encontramos una asociación ($p=0.026$) de dichos casos con el genotipo Arg/Arg, como se muestra en la **tabla 17**.

TABLA 17

RELACIÓN DEL SNP DEL CODÓN 72 CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

	N	Arg/Arg (%)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)	p
CONTROL	126	92 (73.0)	30 (23.8)	4 (3.2)	0.043*
CASOS	111	66 (59.5)	35 (31.5)	10 (9.0)	
CONTROL VPH					0.955 ²
16	13	11 (84.6)	2 (15.4)	0	
18	0	0	0 (0)	0	
OTROS	17	14 (82.4)	3 (17.6)	0	
NEGATIVO	93	65 (69.9)	24 (25.8)	4 (4.3)	
MI	3	2 -	1 -	0 -	
CONTROL VPH					0.109 ²
16/18	13	11 (84.6)	2 (15.4)	0	
OTROS	157	12 (82.4)	3 (17.6)	0	
CASOS VPH					0.727 ²
16	56	37 (66.1)	14 (25.0)	5 (8.9)	
18	8	6 (75.0)	2 (25.0)	0	
OTROS	34	15 (44.1)	15 (44.1)	4 (11.8)	
NEGATIVOS	7	4 (57.1)	3 (42.9)	0	
MI	6	4 -	4 -	1 -	
CASOS VPH					0.026 ^{3*}
VPH 16/18 ¹	64	43 (67.2)	16 (25.0)	5 (7.8)	
OTROS	34	15 (44.1)	15 (44.1)	4 (11.8)	
FIGO					0.553 ²
IB-IIA	11	8 (72.7)	1 (9.1)	2 (18.2)	
IIB-IIIB	96	54 (56.3)	34 (35.4)	8 (8.3)	
IIIA-IVB	4	4 (100)	0	0	
ESTATUS					0.987
VIVA	69	41 (59.4)	22 (31.9)	6 (8.7)	
MUERTA	42	25 (59.5)	13 (31.0)	4 (9.5)	
EDAD					0.675
<50	47	28 (59.6)	16 (34.0)	3 (6.4)	
>=50	64	38 (59.4)	19 (29.7)	7 (10.9)	

¹VPH18 y VPH16 vs. otros tipos virales en CC. MI muestra inadecuada, * estadísticamente significativo, ²corrección de Yates. ³Arg/Arg v.s. Arg/Pro y Pro/Pro.

7.2.4. Análisis de sobrevida

Se realizó un análisis de sobrevida de las pacientes con CC respecto a la presencia del polimorfismo del codón 72, ya que fue el polimorfismo de mayor frecuencia y por otra parte reportes en la literatura señalan que este polimorfismo puede estar asociado con la respuesta a terapia y por lo tanto a la sobrevida (Gomes *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Tominaga *et al.*, 2010).

El análisis de Kaplan-Meier mostró una tendencia de mejor sobrevida de las

pacientes con CC heterocigotas en el codón 72 que en las homocigotas, aunque no fue estadísticamente significativo $p=0.95$ (figura 11). La media de sobrevivida de pacientes con genotipo Arg/Arg fue de 24.13 meses, mientras que en pacientes con genotipo Arg/Pro fue de 26.05 meses.

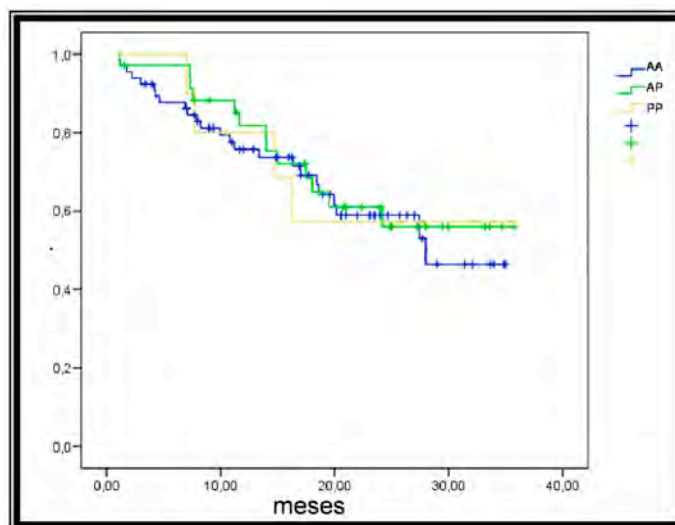


Figura 11. Análisis de sobrevivida respecto al codón 72 de *TP53*. Se muestra que las pacientes con CC homocigotos para Arg (AA) tienen menor sobrevivida que las heterocigotos (AP) y homocigotas para Pro (PP).

Datos publicados, anexo 2 (Medical Oncology 2010).

7.3 Análisis cromatográfico y de secuenciación de los exones 5 y 6 de *TP53*

Se obtuvieron los productos de 488 pb por PCR de los exones 5 y 6 de *TP53*, los cuales fueron resueltos en geles de agarosa al 1% como se muestra en la figura 12.

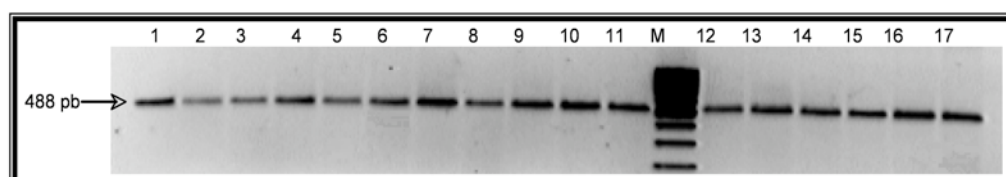


Figura 12. Productos de los exones 5 y 6 de *TP53*. Los productos fueron resueltos resueltos en geles de agarosa al 1.0% en los carriles del 1 al 17 se cargaron muestras, M marcador de 100 pb.

La temperatura calculada por el programa DHPLC Melt

(<http://insertion.stanford.edu/melt.html>) fue de 62° C, por lo cual se realizaron corridas a las temperaturas 61° C, 62° C y 63° C con productos de PCR de las líneas celulares MCF-7 (Control negativo) y Jurkat como control positivo de mutación. Sin embargo, se probaron otras temperaturas, dando mejor resultado a 60.0° C y 60.5° C. En la **figura 13** se muestran los patrones cromatográficos de las muestras en presencia o ausencia de mutación.

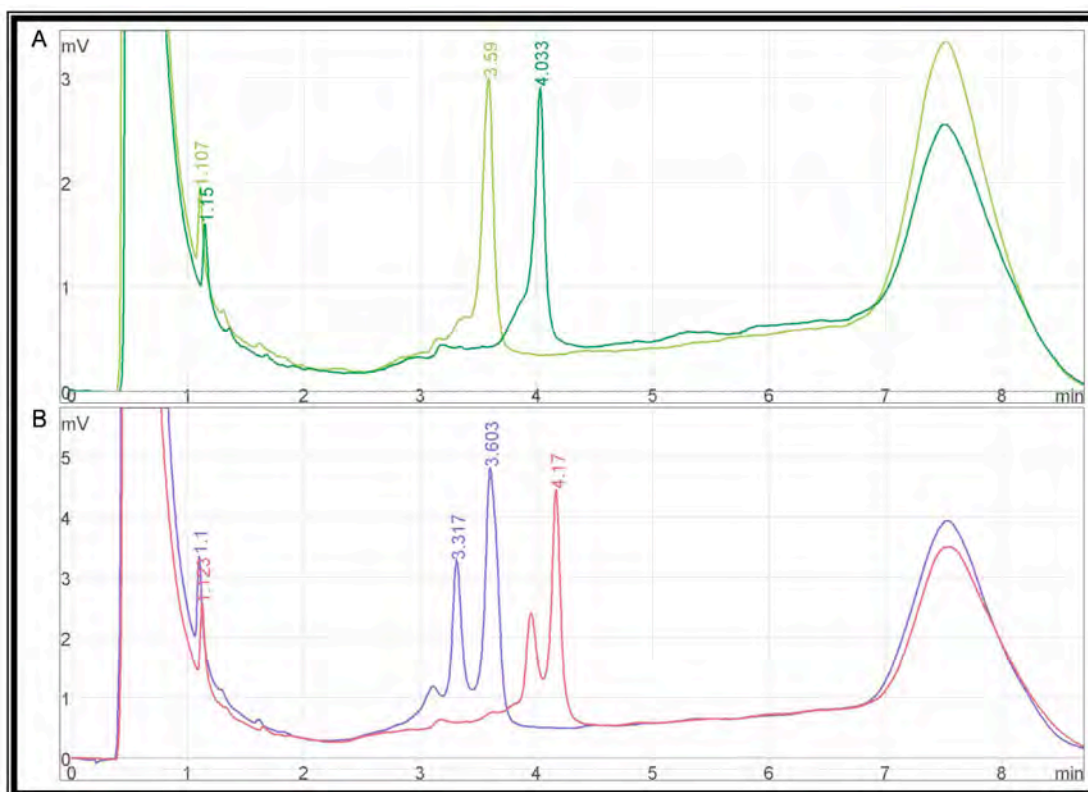


FIGURA 13. Patrones cromatográficos del producto de los exones 5 y 6 de *TP53*. En A) se presenta el patrón homocigoto de la muestra control o WT a dos temperaturas 60° C en verde claro y 60.5° C en verde oscuro. En B) Patrón cromatográfico de la línea celular Jurkat la cual fue mezclada con producto de la línea celular MCF7 como control WT, en morado a 60.0° C y en rosa a 60.5° C.

En la **figura 14** se muestran los patrones cromatográficos heterodúplex de muestras analizadas una vez estandarizadas las condiciones de DHPLC.

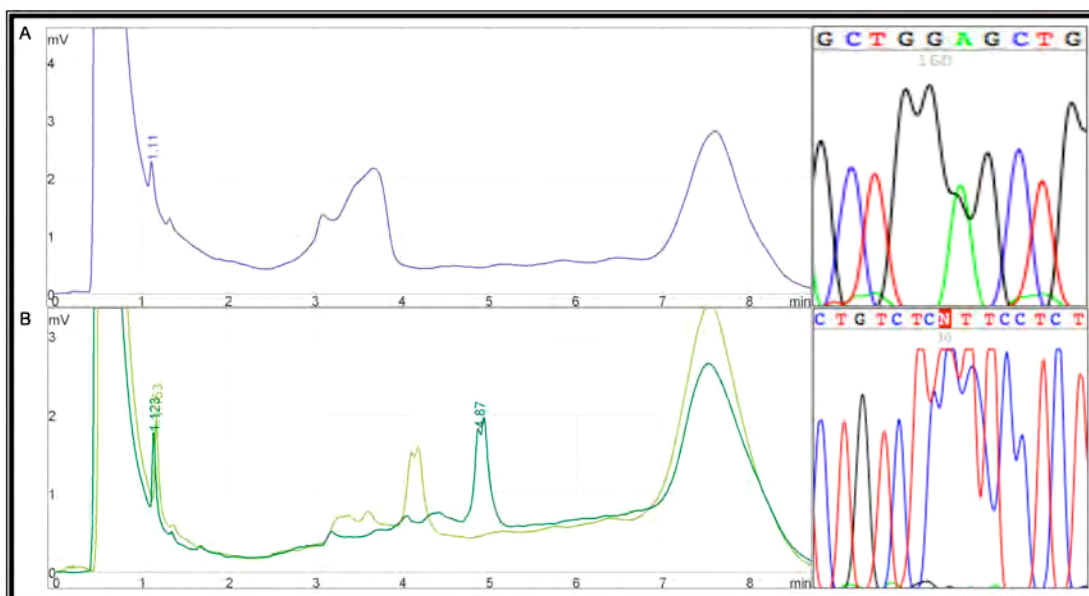


FIGURA 14. Diferentes patrones cromatográficos obtenidos de muestras del exón 5 y 6. Las muestras fueron corridas a 60.0° C y 60.5° C. A) Muestra con mutación en la posición 13251 con su respectivo electroferograma. B) Muestra con patrón heterodúplex y respectivo electroferograma donde se muestra un cambio de tipo heterocigoto en el intrón 4 en la posición 13039.

El análisis de DHPLC mostró un patrón homodúplex -el cual corresponde a secuencias silvestres- en 95% de los controles y en 90% de los casos. El análisis de secuenciación mostró cambios heterocigotos en la secuencia del intrón 4, en la posición 13,039 C>T de la cuál no se tiene información previa. Otras mutaciones se encontraron en el intrón 5 en la posición 13,251 G>A, aunque teóricamente no afecta a la proteína ya que se encuentra fuera de los sitios de *splicing*. **(figura 15 A).**

Se identificó en el codón 213 (exón 6) un cambio sinónimo Arg>Arg ya reportado [rs1800372](#) en el cual no se encontraron diferencias significativas entre los casos y controles con $p= 0.34$. **(figura 15 B)**

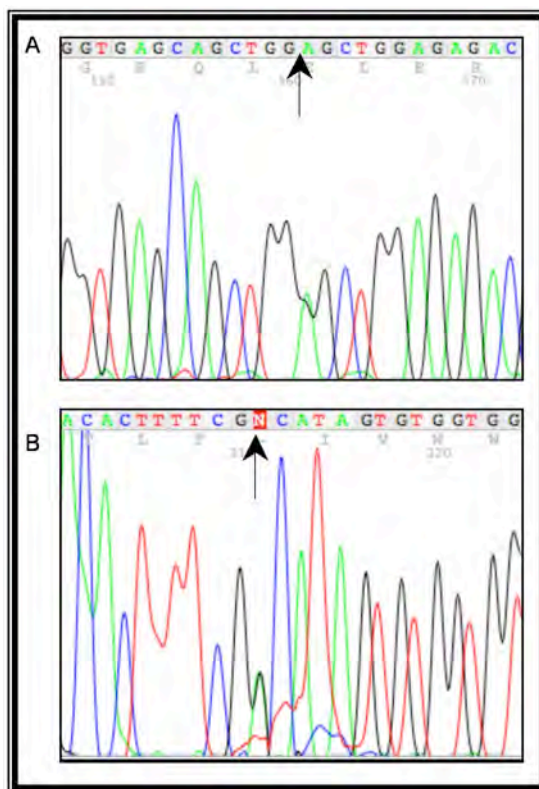


FIGURA 15. Electroferogramas que muestran los cambio en el producto de los exones 5-6. En A) muestra 11,346 mutación en el intrón 5 posición 13,251 G>A. En B) muestra de CC 11234 con polimorfismo en la posición 13,339 que corresponde al codon 213, exón 6 CGA>CGG polimorfismo sinónimo (rs:1800372).

7.4 Análisis cromatográfico y de secuenciación de los exones 7 a 9 de *TP53*

Respecto a los exones 7 a 9 se obtuvieron productos de PCR de 889 pb (**Figura 16**). Los productos fueron tamizados por DHPLC y/o mediante enzima Surveyor™. La temperatura óptima para DHPLC fue de 58.3° C y 58.9° C.

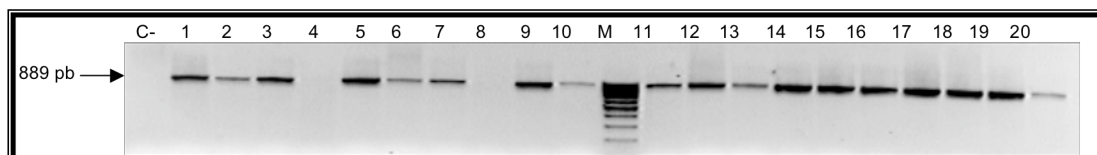


Figura 16. PCR de los exones 7 a 9. Los productos fueron resueltos en gel de agarosa al 1%, C- control negativo de la reacción, muestras problema en los carriles 1 a 20, M marcador de 100 pb. El producto es de 889 pb.

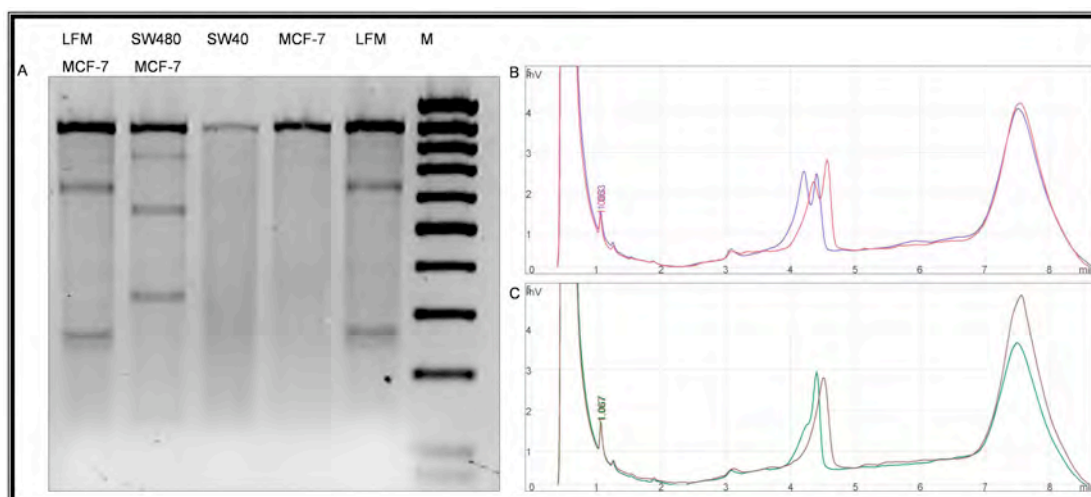


Figura 17. Estandarización del tamizaje por restricción enzimática y DHPLC de los exones 7 a 9 de *TP53*. A) Los productos de PCR de los exones 7 a 9 fueron incubados en enzima Surveyor™ por 20 minutos a 40°C y resueltos en gen de agarosa, como controles de mutación se utilizó DNA de la línea celular SW480 y DNA de un paciente con diagnóstico de Li-Fraumeni. B) Patrón cromatográfico obtenido con la línea celular SW480 y MCF-7 a dos temperaturas. C) Patrón cromatográfico de la línea celular MCF-7 como control silvestre.

Se realizó la estandarización de la detección de cambios en la secuencia de la región comprendida entre los exones 7 a 9 mediante restricción enzimática con la enzima Surveyor™, la cual corta en sitios de “mismatch” o no alineamiento, obtenidos de la mezcla de una muestra silvestre, en este caso de la línea celular MCF-7 y de un control de mutación, para lo cual utilizamos DNA de la línea celular SW480 y de un paciente con síndrome de Li-Fraumeni, cuyo resultado se muestra en la **figura 17A**. Se establecieron las condiciones adecuadas de tamizaje mediante DHPLC, cuyo resultado se muestra en la figura 17B y 17C.

En la **figura 18** se muestra el patrón de restricción de muestras analizadas mediante Surveyor™, las cuales posteriormente fueron secuenciadas para identificar los cambios en la secuencia.

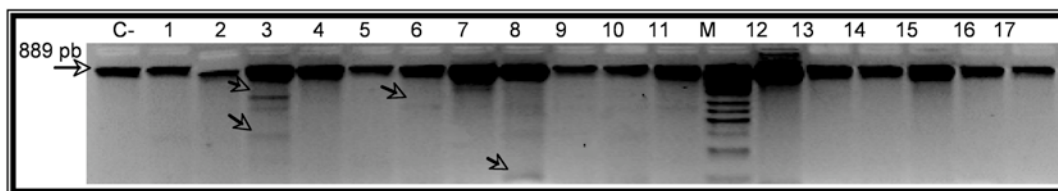


Figura 18. Detección de cambios en la secuencia mediante Surveyor™. C- es una muestra silvestre o WT la cual se incubó con la enzima Surveyor, las muestras se cargaron en los carriles 1 al 17. M, marcador de 100 pb. Las flechas indican los fragmentos obtenidos, estas muestras fueron amplificadas y secuenciadas.

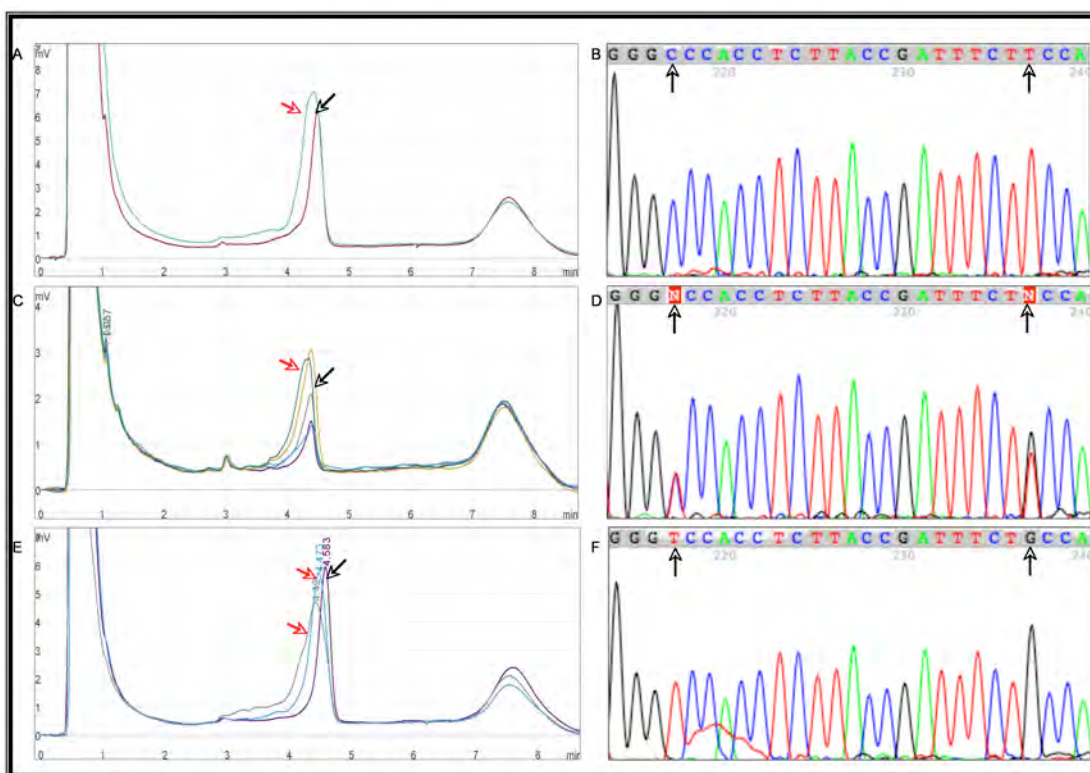


Figura 19. Patrón cromatográfico y secuenciación de los productos de los exones 7 a 9 de TP53. A) cromatograma de una muestra control silvestre en rojo (flecha negra) y de una muestra con patrón heterodúplex en azul (flecha roja). B) Electroferograma de una muestra silvestre donde se señalan los SNPs de mayor frecuencia. C) Cromatograma de muestras silvestres sobrelapadas y una muestra heterodúplex (flecha roja). D) Electroferograma donde se muestran los SNP heterocigotos en las posiciones 14181 y 14201 en el intrón 7. E) Cromatograma donde se muestran tres patrones uno WT (flecha negra) y dos polimórficos (flechas rojas). F) Electroferograma donde se señalan los SNPs homocigotos de las posiciones 14,181 y 14,201

7.5 Polimorfismos identificados en TP53

Una vez realizados los análisis cromatográficos y de secuenciación, se revisaron las bases de datos, específicamente en las bases <http://p53.bii.a-star.edu.sg/> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. De los 8 SNP reportados en las bases de datos en la secuencia codificante de las regiones analizadas, encontramos 3 SNPs en los codones 36, 72 y 213. En la **tabla 18** se muestran los cambios de secuencias reportados y validados como SNPs en la secuencia codificante, así como las frecuencias genotípicas encontradas en las muestras control y el valor de p obtenido por las diferencias en las frecuencias entre casos y controles. Como se puede observar, solo en el SNP del codón 72 se encontraron frecuencias en casos y controles estadísticamente significativas, como ya se mencionó anteriormente.

TABLA 18
SNPs REPORTADOS Y VALIDADOS EN SECUENCIAS CODIFICANTES.

SNP	E	rs	GENOTIPO AA (WT)	AA % No.	GENOTIPO AB	AB % No.	GENOTIPO BB	AB % No.	p
34 CCC	4	rs11575998	CC	100	CA	0	AA	0	-
36 CCG	4	rs1800370	GG	92.8	GA	7.1	AA	0	-
47 CCG	4	rs1800371	CC	100	CT	0	TT	0	-
72 CGC	4	rs1042522	GG	72	GC	23.8	CC	3.1	0.043**
110* CGT	4	rs11540654	GG	100	GT GC	0	TT CC	0	-
213 CGA	6	rs1800372	AA	100	AG	0	GG	0	-
217* GTG	6	rs35163653	GG	100	AG	0	AA	0	-
290* CGC	8	rs55819519	GG	100	AG	0	AA	0	-

La información fue tomada de la base de datos <http://p53.bii.a-star.edu.sg> y de SNP de NCBI. *Reportados sólo en NCBI construcción 131. Los datos mostrados corresponden a los resultados en los controles, el valor de p respecto a los casos. **Estadísticamente significativo.

En la **tabla 19** se muestran los cambios en la secuencia codificante que no corresponden a SNP, sino a mutaciones, todas ellas de tipo heterocigoto. Estas mutaciones sólo fueron identificadas en los casos de CC.

TABLA 19
CAMBIOS EN SECUENCIAS CODIFICANTES NO REPORTADOS PREVIAMENTE

Nucleotido	CODON	E	WT	AA	CAMBIO	AA	CASOS/CONTROL	p
12271	116	4	TCT	Ser	TTT ^{he}	Phe	1/0 1/111-0/126	-
13323	188	6	CTG	Leu	CGG ^{he}	Arg	2/0 2/93-0/115	.001*
14090	255	7	ATC	Ile	GTC	Val	1/85-0/108	-

En la **tabla 20** se muestran los SNPs reportados en la secuencia no codificante, de las regiones analizadas donde detectamos 9 cambios.

TABLA 20
SNPs REPORTADOS Y VALIDADOS EN SECUENCIAS NO CODIFICANTES

SNP ID	Posición	I	GENOTIPO AA (WT)	AA % No.	GENOTIPO AB	AB % No.	GENOTIPO BB	BB % No.
rs17883323	11992	3	CC	100	C A	0	AA	0
rs75343564	13251	5	GG	100	GA	0	AA	0
rs1642786	14168	7	GG	0	GT	0	TT	100
rs12947788	14181	7	CC	79.9	CT	18.34	TT	2.7
rs12951053	14201	7	TT	79.8	TG	17.43	GG	2.7
rs79191618	14234	7	TT	0	TC	0	CC	100
rs1642787	14235	7	TT	0	TC	0	CC	100
rs1794288	14271	7	CC	0	CT	0	TT	100
rs11653656	14294	7	CC	100	CT	0	TT	0

rs: datos tomados de la bases de datos del NCBI construcción 131. I intrón.

Por otra parte, identificamos 12 cambios en la secuencia no codificante, no reportados previamente en las bases de datos del NCBI. Dichos cambios se muestran a continuación (**tabla 21**).

TABLA 21
CAMBIOS EN REGIONES INTRÓNICAS NO REPORTADAS PREVIAMENTE.

NUCEÓTIDO	INTRÓN	GENOTIPO SILVESTRE	CAMBIO	CASO/ CONTROL
11993	3	TT	inT	2/0
13019	4	CC	delC	1/1
13023	4	CC	CA	1/1
13039	4	CC	CT	0/1
14130	7	CC	CA	0/1
14157	7	CC	CA	1/0
14203	7	CC	CA	1/0
14256	7	CC	CTCCCA	1/0
14258	7	TT	TC	1/-0
14267	7	GG	GA	2/0
14282	7	GG	GA	4/0
14642	7	CC	CT	1/0

En las siguientes figuras se muestran los SNP previamente validados con sus respectivas frecuencias genotípicas reportadas a nivel mundial, las frecuencias encontradas en la población control de nuestro estudio fueron agregadas para fines de comparación.

rs1800370		Sample Ascertainment			Genotype Detail ^{NEW}			Alleles	
ss#	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	A/G	G/G	HWP	A	G
ss32469464	PDR90	Global	156	IG	0.013	0.987	1.000	0.006	0.994
	MEX		252		0.071	0.928			

Figura 20. Frecuencias genotípicas del SNP del codón 36, exón 4 rs: 1800370.

rs1042522		Sample Ascertainment			Genotype Detail ^{NEW}				Alleles	
ss#	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	C/C	C/G	G/G	HWP	C	G
ss105111344	Radiation Research 2007 P53		184	GF	0.272	0.402	0.326		0.473	0.527
ss129888223	pilot.1.YRI		50	AF					0.740	0.260
ss132645907	ENSEMBL_Venter		2	IG			1.000		1.000	
	ENSEMBL_celera		2	IG			1.000		1.000	
ss136962647	ENSEMBL_Watson		2	IG			1.000		1.000	
ss2463129	CEPH		184	AF					0.480	0.520
ss3176059	MITOGPOP6	multiple	64	IG	0.062	0.531	0.406	0.251	0.328	0.672
ss32469466	PDR90	Global	176	IG	0.148	0.409	0.443	0.343	0.352	0.648
ss40756430	HapMap-CEU	European	120	IG	0.083	0.300	0.617	0.251	0.233	0.767
	HapMap-HCB	Asian	90	IG	0.200	0.578	0.222	0.479	0.489	0.511
	HapMap-JPT	Asian	88	IG	0.227	0.364	0.409	0.150	0.409	0.591
	PAC1		48	GF	0.333	0.542	0.125	0.527	0.604	0.396
ss66856877	HSP_GENO_PANEL		118	IG	0.153	0.339	0.508	0.100	0.322	0.678
	CEU_GENO_PANEL	European	120	IG	0.083	0.300	0.617	0.251	0.233	0.767
	AAM_GENO_PANEL	African American	124	IG	0.323	0.435	0.242	0.343	0.540	0.460
	CHB_GENO_PANEL	Asian	88	IG	0.227	0.568	0.205	0.371	0.511	0.489
	YRI_GENO_PANEL	Sub-Saharan African	118	IG	0.441	0.441	0.119	1.000	0.661	0.339
	JPT_GENO_PANEL	Asian	88	IG	0.205	0.364	0.432	0.150	0.386	0.614
ss71641730	HapMap-CEU	European	120	IG	0.083	0.300	0.617		0.233	0.767
	HapMap-HCB	Asian	90	IG	0.200	0.578	0.222		0.489	0.511
	HapMap-JPT	Asian	88	IG	0.227	0.364	0.409		0.409	0.591
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	118	IG	0.458	0.424	0.119		0.669	0.331
ss84172835	PA141824203		188	AF					0.681	0.319
ss84172846	PA141823945		130	AF					0.208	0.792
ss84172869	PA141823664		180	AF					0.239	0.761
ss84173063	PA136109606		170	AF					0.424	0.576
ss96578357	J. Craig Venter		2	IG			1.000		0.500	0.500
	MEX		252		0.031	0.238	0.730			

Figura 21. Frecuencias genotípicas del SNP del codón 72 exón 4 rs:1042522.

rs1800372		Sample Ascertainment			Genotype Detail ^{NEW}			Alleles	
ss#	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	A/A	A/G	HWP	A	G
ss125571340	pilot.1.CEU		72	AF				0.972	0.028
ss12675669	P1		204	GF	0.971	0.029		0.985	0.015
	CAUC1		62	GF	0.968	0.032		0.984	0.016
	AFR1		48	GF	1.000			1.000	
	HISP1		46	GF	0.913	0.087		0.957	0.043
	PAC1		48	GF	1.000			1.000	
ss32469471	PDR90	Global	174	IG	0.977	0.023	1.000	0.989	0.011
ss48401998	AGI ASP population	multiple	78	IG	0.974	0.026	1.000	0.987	0.013
	MEX		226		1.0				
	MEX CC		186		0.967	0.021			

Figura 22. Frecuencias genotípicas del SNP del codón 213, rs:1800372.

rs75343564		Sample Ascertainment			Genotype Detail ^{NEW}		Alleles	
ss#	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	C/T	HWP	C	T
ss136962629	ENSEMBL_Watson		2	IG	1.000		0.500	0.500
	MEX		226		1.00			
	MEX CC		186		0.989	0.010		

Figura 23. SNP del intrón 5 rs:7534564.

rs12947788	Sample Ascertainment				Genotype Detail ^{NEW}				Alleles	
ss#	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	A/A	A/G	G/G	HWP	A	G
ss125571337	pilot.1.CEU		72	AF					0.097	0.903
	pilot.1.CHB+JPT		88	AF					0.330	0.670
ss132645903	ENSEMBL_Venter		2	IG	1.000				0.500	0.500
ss32469478	PDR90	Global	176	IG	0.023	0.273	0.705	1.000	0.159	0.841
ss48297304	P1		204	AF	0.020	0.235	0.745	1.000	0.137	0.863
	CAUC1		62	AF	0.065 0.935			1.000	0.032	0.968
	AFR1		48	AF	0.292 0.708			0.403	0.146	0.854
	HISP1		46	AF	0.043	0.087	0.870	0.050	0.087	0.913
	PAC1		48	AF	0.041	0.542	0.417	0.200	0.312	0.688
ss96578356	J. Craig Venter		2	IG	1.000				0.500	0.500
	→ MEX		218	DS	0.027	0.183	0.78			

Figura 24. Frecuencias genotípicas del SNP del intrón 7 en la posición 14181 rs:12947788.

rs12951053					Genotype Detail <small>NEW</small>				Alleles	
ss#	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	A/A	A/C	C/C	HWP	A	C
ss125571335	pilot.1.CEU		72	AF					0.903	0.097
	pilot.1.CHB+JPT		88	AF					0.693	0.307
ss132645900	ENSEMBL_Venter		2	IG	1.000				0.500	0.500
ss21427197	CHMJ	Asian	74	IG					0.757	0.243
ss24116452	AFD_EUR_PANEL	European	48	IG	0.833	0.167		0.752	0.917	0.083
	AFD_AFR_PANEL	African American	46	IG	0.783	0.130	0.087	0.020	0.848	0.152
	AFD_CHN_PANEL	Asian	48	IG	0.458	0.417	0.125	1.000	0.667	0.333
ss32469479	PDR90	Global	178	IG	0.708	0.270	0.022	1.000	0.843	0.157
ss44033287	HapMap-CEU	European	120	IG	0.833	0.133	0.033	0.050	0.900	0.100
	HapMap-HCB	Asian	90	IG	0.356	0.511	0.133	0.655	0.611	0.389
	HapMap-JPT	Asian	90	IG	0.511	0.311	0.178	0.050	0.667	0.333
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	IG	0.767	0.217	0.017	1.000	0.875	0.125
ss48297305	P1		204	AF	0.745	0.235	0.020	1.000	0.863	0.137
	CAUC1		62	AF	0.935	0.065		1.000	0.968	0.032
	AFR1		48	AF	0.708	0.292		0.403	0.854	0.146
	HISP1		46	AF	0.870	0.087	0.043	0.050	0.913	0.087
	PAC1		48	AF	0.416	0.542	0.042	0.200	0.687	0.313
ss66155917	HapMap-CEU	European	118	GF	0.847	0.119	0.034		0.907	0.093
	HapMap-HCB	Asian	90	GF	0.356	0.511	0.133		0.611	0.389
	HapMap-JPT	Asian	90	GF	0.511	0.311	0.178		0.667	0.333
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	GF	0.767	0.217	0.017		0.875	0.125
ss66856879	HSP_GENO_PANEL		54	IG	0.741	0.259		0.479	0.870	0.130
	CEU_GENO_PANEL	European	68	IG	0.882	0.088	0.029	0.050	0.926	0.074
	AAM_GENO_PANEL	African American	122	IG	0.738	0.246	0.016	1.000	0.861	0.139
	CHB_GENO_PANEL	Asian	90	IG	0.356	0.511	0.133	0.655	0.611	0.389
	YRI_GENO_PANEL	Sub-Saharan African	120	IG	0.767	0.217	0.017	1.000	0.875	0.125
	JPT_GENO_PANEL	Asian	24	IG	0.417	0.417	0.167	0.752	0.625	0.375
ss69190642	HapMap-CEU	European	120	GF	0.833	0.133	0.033		0.900	0.100
	HapMap-HCB	Asian	90	GF	0.356	0.511	0.133		0.611	0.389
	HapMap-JPT	Asian	90	GF	0.511	0.311	0.178		0.667	0.333
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	GF	0.767	0.217	0.017		0.875	0.125
ss76191525	ICMHP		10	IG	0.800	0.200		1.000	0.900	0.100
ss96578355	J. Craig Venter		2	IG	1.000				0.500	0.500
	MEX_		218		0.798	0.174	0.027			

Figura 25. SNP del intrón 7 en la posición 14201 rs:12951053.

8. DISCUSIÓN

8.1 Factores clínicos

Diversos estudios han establecido que la edad, el inicio de vida sexual antes de los 18 años, el número de parejas sexuales y el número de embarazos son factores de riesgo para el desarrollo de CC (Castellsague, 2002).

En el primer grupo de pacientes analizadas (VPH), encontramos que todos estos factores son asociados al desarrollo de CC ($p > 0.05$). En dicho grupo se estratificó la edad con base en la distribución de las edades de las pacientes, en menores de 40 años y 40 años y más. Se encontró que las mujeres con más de 40 años tiene un riesgo cuatro veces mayor de desarrollar CC, que las mujeres menores de 40 .

En el segundo grupo de estudio (polimorfismos) se estratificó la edad en menores de 50 años y 50 años y más. En este grupo el riesgo fue menor (polimorfismos) respecto al primer grupo (VPH) (RM=2.12 IC95% 1.31-3.72). Estas diferencias pueden ser debido principalmente a los intervalos de edad de ambos grupos, ya que el primer grupo la media de edad fue de 36 años y en el segundo grupo de 43 años. Esta diferencia se debe a la selección de controles del segundo grupo de estudio, ya que el objetivo era comparar diferencias en polimorfismo de CC y controles; por lo tanto era necesario que las características clínicas fueran lo más homogéneas posibles. Sin embargo, en ambos grupos (VPH y Polimorfismos) la edad es un factor de riesgo, como en cualquier tipo de enfermedad crónico degenerativa como lo es el cáncer.

Estudios de la OMS (2010) muestran dos picos de edad donde se presenta con mayor frecuencia el CC, uno entre los 45 y 54 años y otro en mujeres de 65 años y más (**figura 25**). En este caso las tasas de incidencia son mucho mayores a las estimadas a nivel mundial.

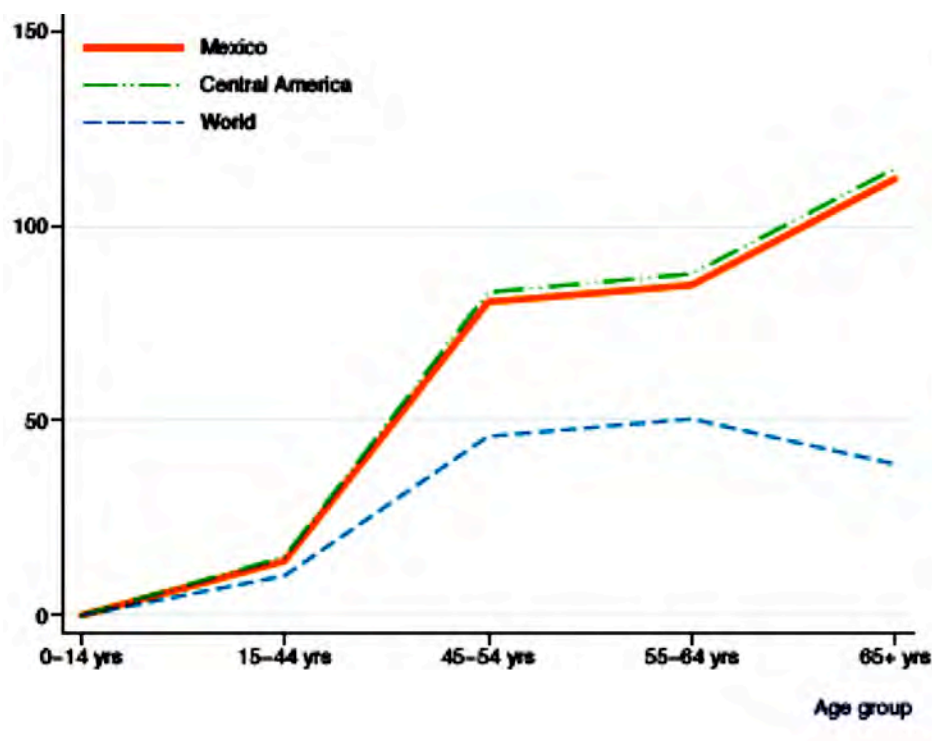


Figura 25. Tasas de incidencia de CC por grupos de edad, en México comparado con América Central y el Mundo. (Datos tomados de HPV information Center. Human papillomavirus and related cancer, WHO, ICO).

El inicio de vida sexual antes de los 18 años también es un factor de riesgo significativo en el desarrollo de CC, en ambos grupos de estudio. Este factor está relacionado con la posibilidad de una mayor exposición a la infección por VPH y en combinación con un elevado número de parejas sexuales sin protección, puede contribuir al desarrollo de CC, incluso a edad más tempranas (Edelstein *et al.*, 2009). Adicionalmente se ha sugerido que la exposición a HPV en el cuello cervical uterino de adolescentes es más susceptible a la infección persistente por HPV, comparado con el de adultos, (Kahn *et al.*, 2002).

Respecto al número de parejas sexuales, en la primera serie encontramos que tener más de dos parejas sexuales es un factor de riesgo en el desarrollo de CC, mientras que en la segunda serie el riesgo no fue significativo. Como se ha mencionado la conducta sexual es un factor que influye en el riesgo de infección por VPH, y por lo tanto con el riesgo de desarrollar lesiones precursoras y CC. Sin embargo, en la

población mexicana analizada no representa un factor de riesgo, debido posiblemente a que si bien el número de parejas sexuales de las mujeres es bajo, no se tienen datos respecto al número de parejas sexuales de sus respectivas parejas. Es conocido que las relaciones sexuales con más múltiples parejas, sin uso de preservativo es frecuente en la población masculina mexicana lo cual es un reflejo de la conducta machista que prevalece aún en nuestro país. Si bien el uso de condón no protege al 100% de la infección por VPH, si disminuye el riesgo de infección (Winer *et al.*, 2006). Dicha conducta puede ser un factor importante en la transmisión de VPH y por lo tanto del desarrollo de lesiones asociadas a la infección por VPH de alto riesgo, lo cual está documentado en población latina (Fernández *et al.*, 2009).

Por otra parte, la OMS reportó en 2010 que aún no se tienen datos sobre la incidencia de VPH en otros tipos de cáncer asociados a la infección por VPH, específicamente en la región anogenital (ano, vulva, vagina y pene) (www.who.int/hpvcentre). Se ha estimado que aproximadamente el 4% de todos los tipos de cáncer son atribuidos a la infección por VPH (Parkin *et al.*, 2006).

Respecto al número de embarazos, las mujeres que han tenido cinco ó más hijos tienen un riesgo dos veces mayor de desarrollar LIEBG y 15 veces más riesgo de desarrollar CC. Si bien diversos estudios epidemiológicos han demostrado esta relación, llama la atención que mientras estos riesgo (2 y 15) se tienen en mujeres con cinco hijos o más, reportes de la IARC mostraron que mujeres con siete hijos o más tiene un riesgo de tres veces. (RM=3, IC 95% 2.66-5.48). El factor de riesgo tan alto que representa el número de embarazos en nuestra población, puede reflejar otros factores que se conjuntan, tales como pobreza y falta de acceso a servicios de salud, entre otros.

En general podemos decir que el factor clínico más importante después de la infección por VPH de alto riesgo es el número de embarazos. Aunque, el número de parejas sexuales no se encontró relacionado, es muy posible que la alta incidencia en infección por VPH y de CC en la población mexicana sea debido en gran parte a

factores relacionados con la conducta sexual, tales como múltiples parejas sexuales sin uso de condón, lo cual incrementa el riesgo de transmisión de infecciones por VPH, aunado al elevado número de embarazos y falta de acceso a servicios de salud.

8.2 Detección y tipificación de VPH

México tiene una de las tasas de mayor incidencia de CC (Parkin *et al.*, 2005, 2008; INEGI, 2007). Se ha demostrado que la infección por VPH de alto riesgo es el factor etiológico más importante en el desarrollo de CC, el cuál es precedido por lesiones precursoras (www.who.int/hpvcentre).

En los controles encontramos una incidencia de VPH similar a reportes mundiales (12%-22%) (**figura 26**). Las diferencias de frecuencia de VPH en los dos grupos de controles, puede deberse a las diferencias de edad en ambos grupos. Lazcano y cols. previamente reportaron en 2001, una incidencia de VPH de 12% en mujeres control menores de 34 años y de 20% en mujeres mayores de 55 años sin alteraciones neoplásicas.

Se ha estimado que entre 50% a 80% de las mujeres con vida sexual han sido infectadas con VPH (Koutsky *et al.*, 1997). Aproximadamente 90% de las mujeres infectadas con VPH eliminan espontáneamente la infección en un periodo de 6 meses a 1 año (Schiffman *et al.*, 2010). Por lo cual como se ha mencionado, la infección por VPH por sí sola no es suficiente para el desarrollo de lesiones precursoras y de CC. Factores virales como el tipo, variante, carga viral; así como características relacionadas a la conducta sexual y la susceptibilidad genética pueden favorecer el desarrollo de lesiones precursoras y de CC.

Se ha reportado que sólo el 10%-20% de las mujeres con infección de VPH pueden persistir y desarrollar una lesión precursora y que entre el 30% y 40% de las LIEAG progresan CC (McCredie *et al.*, 2008). Las mujeres que presentan VPH de

alto riesgo y persistencia viral son las que desarrollan lesiones precursoras y CC (Liaw *et al.*, 2001). Por lo cual sería de gran importancia identificar tempranamente la persistencia de VPH de alto riesgo, para prevenir el desarrollo de lesiones precursoras y CC.

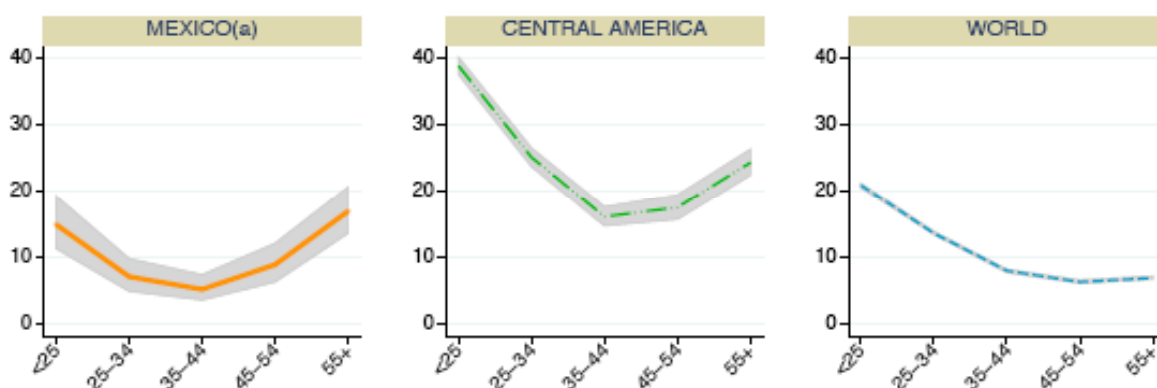


Figura 26. Prevalencia de VPH en mujeres con citología normal en México comparada con América central y el Mundo. (Datos tomados de HPV information Center. Human papillomavirus and related cancer, WHO, IC).

Un hallazgo importante en nuestro estudio es que la infección por VPH de alto riesgo en mujeres sin alteraciones neoplásicas es tres veces mayor que lo reportado en otros países. Mientras que en América Central y el mundo la prevalencia de VPH 16 y 18 es de 4%, en nuestro estudio detectamos hasta 10% de mujeres con reporte de Papanicolaou negativo con infección por VPH 16. Encontramos que una de cada 10 mujeres de edad promedio de 36 años con diagnóstico de Papanicolaou negativo pueden tener infección por VPH de alto riesgo, mientras que en mujeres con una edad promedio de 43 años es posible encontrar dos de cada 10 mujeres con VPH de alto riesgo. Por ello, realizar la detección de VPH para determinar la persistencia viral sería de gran importancia en este grupo de pacientes.

Si bien la infección por VPH de alto riesgo no es suficiente para el desarrollo de CC, es establecido que es el factor etiológico más importante y que la presencia de otros factores de riesgo como el número de embarazos sería de gran utilidad para identificar mujeres con riesgo de desarrollar lesiones precursoras. Se ha reportado

que la sensibilidad y especificidad de la prueba de Papanicolaou es baja en nuestro país (Alonso *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 2001) por lo cual la incorporación de la detección molecular de VPH de alto riesgo a la par de la toma de Papanicolaou, (como se realiza en otros países) sería de gran utilidad para mejorar los sistemas de tamizaje y disminuir los índices de CC (Lorincz *et al.*, 2003; Cuzick *et al.*, 2008).

En la primera serie de muestras encontramos VPH de alto riesgo en 50% de las LIEBG. Estos datos pueden asociarse a la progresión de las LIEBG en donde se ha reportado que aproximadamente un 50 % de lesiones progresan a LIEAG. Estos datos coinciden con lo reportado a nivel mundial, respecto a la frecuencia de VPH16. Sin embargo, contrastan con lo reportado por González y col. (2004) donde detectan HPV58 como el de mayor frecuencia en un estudio realizado en Yucatán. Aunque en nuestro estudio detectamos VPH 58 en LIEAG como el segundo en frecuencia. En regiones de Asia también se ha detectado una alta frecuencia de VPH58 (Hwang, 1999; Huang *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2010).

Adicionalmente se ha reportado que pacientes con CC y VPH 58 tienen buen pronóstico, respecto a pacientes con CC y otros tipos virales (Lai *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2009). Aunque se desconoce la razón por la cual este tipo viral se presenta con alta frecuencia en regiones de Asia, se ha sugerido que los VP han co-evolucionado con su hospedero, por lo cual es probable que debido a presión selectiva, VPH58 se haya distribuido en esta población. Mientras que la presencia de VPH58 en México particularmente en zonas de Yucatán, puede deberse tanto al origen ancestral de la población amerindia (Gómez *et al.*, 2003), como al reciente flujo de inmigrantes asiáticos a esta zona de México (Nubick *et al.*, 1998).

A nivel mundial se ha reportado que VPH 18 es el segundo en frecuencia en CC con un 15%-20% de los casos; sin embargo nuestros estudios y otros realizados en México han reportado menos de 10% de VPH 18 en CC, lo cual pone de manifiesto que aparentemente VPH 18 no es tan frecuente como en otras regiones de mundo. En este sentido, otros trabajos en México publicados por Montoya y cols. (2001)

apoyan nuestros resultados. Aunque una hipótesis alternativa sería que debido a que VPH 18 se ha asociado a peor pronóstico en CC, sea baja la detección de este tipo viral, debido a mayores decesos de las pacientes respecto a las que portan otros tipos virales. Sin embargo, en LIEBG y LIEAG, VPH 18 tampoco se detectó con la frecuencia reportada a nivel mundial. Lo cual sugiere que en México VPH 18 no es tan frecuente como en otras regiones de mundo.

A la fecha en México se han obtenido varios reportes acerca de la prevalencia y tipificación de VPH. Las diferencias en cuanto a la prevalencia y tipos virales puede deberse a la selección de las muestras, tipo de muestras y específicamente al método empleado para la detección. A pesar de estas diferencias se coincide en que VPH 16 es el de mayor frecuencias y que un alto porcentaje de los VPH detectados en muestras control son VPH de alto riesgo, aún con un diagnóstico negativo de Papanicolaou, por lo cual siendo México un país con alta incidencia de CC, es necesario incluir la detección molecular de VPH como prueba de tamizaje (Meijer *et al.*, 2001), más específicamente, en pacientes con alto riesgo tales como mujeres con alto número de embarazos o elevado número de parejas sexuales.

A pesar de que México es uno de los países con mayor incidencia de CC, actualmente hay pocos estudios epidemiológicos respecto al VPH y otros tipos de cáncer asociados a la infección (OMS, 2010). Con el desarrollo de pruebas moleculares para la detección de VPH más sensibles y accesibles, se espera que se desarrollen más estudios para identificar la distribución de los VPH en el país, ya que se ha demostrado una distribución diferente por región geográfica.

Se espera que con la introducción de la vacuna contra VPH tipos 16 y 18, disminuyan los casos de CC; sin embargo, queda desprotegida aproximadamente un 35%-40% de la población en riesgo, ya que los datos hasta ahora disponibles en México muestran que la infección por VPH16 y VPH18 es de aproximadamente 65%. Un problema relacionado con la vacuna es el desapego a la prueba de Papanicolaou, por la falsa expectativa de estar protegidas contra el CC, lo cual es un error. Por otra

parte, no se está considerando la vacunación contra otros tipos virales cuya frecuencia es relativamente más alta que en otras regiones del mundo, tal es el caso de VPH31 y VPH58. Actualmente no se cuenta con una vacuna que proteja al 100% de la infección por VPH de alto riesgo, por lo cual la detección molecular de VPH de alto potencial oncogénico puede contribuir enormemente a identificar mujeres con riesgo de desarrollar lesiones preneoplásicas y CC, ya que puede determinarse la persistencia viral como signo de probable desarrollo de lesiones (Cuschieri *et al.*, 2005). Debido a la alta frecuencia de VPH58 en regiones de Asia y América Latina, actualmente se está desarrollando una vacuna trivalente la cual incluye protección contra VPH58, sin embargo, aún está en fase experimental (Zhang, 2010).

8.3 Polimorfismos del exón 4 de *TP53*

La infección por VPH no es suficiente para el desarrollo de CC, por lo cual otros factores como los genéticos pueden contribuir al desarrollo del mismo. Los polimorfismos genéticos son variaciones en la secuencia de DNA y pueden contribuir a la susceptibilidad para el desarrollo de diversas enfermedades de tipo multifactorial.

En CC se han desarrollado diversos trabajos con el objetivo de identificar polimorfismos como factores de riesgo para el desarrollo de CC, adicional a la infección por VPH. Estos trabajos se han enfocado principalmente a identificar polimorfismos de genes que participan en la respuesta inmune. Sin embargo, la distribución de los polimorfismos a nivel poblacional es diferente y pueden representar un factor de riesgo en una población, pero no en otra, debido a la interacción con el ambiente.

El desarrollo del Hap Map ha contribuido al conocimiento sobre las variaciones genéticas de diversas poblaciones. Especialmente las bases de datos muestran el análisis de SNPs en muestras representativas de una población. Sin embargo, es escasa la información acerca de los polimorfismos de *TP53* en la población Mexicana.

Hasta el momento sólo se ha publicado un reporte sobre el SNP72 en CC en población mexicana; sin embargo este estudio no estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg (Suárez *et al.*, 2002).

Storey y cols. (1998), reportaron que pacientes con genotipo Arg/Arg en el codón 72 de *TP53*, tienen mayor riesgo para el desarrollo de CC, al encontrarlo con mayor frecuencia en casos que en controles. Posteriormente, un gran número de estudios a nivel mundial, trataron de reproducir sus hallazgos con datos inconsistentes. Al respecto, cuatro meta-análisis (Koushik *et al.*, 2004; Jee *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007 y Kloug *et al.*, 2009) sugieren que los datos contradictorios en las diversas publicaciones, pueden deberse a diversos factores tales como: selección inadecuada de muestras (fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg), diversidad en el tipo de muestras (frescas, parafina, raspado cervical, biopsia), sensibilidad de la técnica empleada (PCR, restricción enzimática) y etnicidad.

Por su parte Makni y cols. (2000) demostraron que existe una gran variedad interlaboratorio cuando se analiza dicho polimorfismo y al excluir los casos discordantes se obtenía un riesgo con el alelo Arg, aunque este estudio únicamente se evaluó en una población de Canadá.

En nuestro trabajo realizamos la detección de los polimorfismos de la región comprendida entre los nucleótidos 11984-12346 del gen *TP53* donde se encuentra el exón 4, mediante un tamizaje por D-HPLC y secuenciación. Los resultados obtenidos mostraron tanto polimorfismos del codón 72 como del 36, ambos ya reportados. En la población control, el codón 72 homocigoto para Arg es el de mayor frecuencia, otro reporte en población mexicana apoya dicho hallazgo como el de Bendesky y cols. (2007).

Tanto el análisis cromatográfico como el de secuencia mostró un patrón característico para cada tipo de haplotipos en el exón 4 de *TP53*, como se mostró en la **figura 10**. Debido al uso de técnicas altamente sensibles como DHPLC y

secuenciación fue posible identificar cambios en la secuencia nucleotídica, tanto los SNP ya reportados de los codones 36 y 72, como otros cambios de secuencia no reportados hasta el momento.

El codón 72 fue el de mayor frecuencia, tanto en controles como en CC, sin embargo, con diferencias significativas ($p \leq 0.05$), encontrando menor frecuencia en los casos de CC. Por lo cual en primera instancia se sugiere un riesgo en pacientes 72 Arg/Pro, lo cual estaría en sentido opuesto de lo sugerido por Storey y cols (1998). Sin embargo, el análisis posterior en los casos, mostró una asociación de VPH16 y VPH18 (los cuales son los de mayor riesgo por encontrarse en 70% de los casos de CC) con el genotipo Arg/Arg. Estos datos son apoyados por estudios realizados en tres poblaciones de India, Brasil y China (Saranath *et al.*, 2002; Brenna *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2006). En este sentido, los tipos virales, tales como 31, 33, 35, 52 y 58 se han asociado a pronósticos menos severos que con VPH 16 y VPH18 en CC (Schwartz *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2009).

Adicionalmente, el análisis de Kaplan-Meier mostró una menor sobrevida en las pacientes homocigotas para Arg, aunque no fue estadísticamente significativa. Estudios de Brenna (2004) mostraron que si hay mejor sobrevida de pacientes heterocigotos en el codón 72, lo cual fue estadísticamente significativo. Al respecto en otros estudios en tumores de mama se ha observado menor sobrevida en pacientes homocigotas para Arg (Vannini *et al.*, 2008) y que dicho polimorfismo puede modular la respuesta a quimioterapia *in vivo* e *in vitro* (Sullivan *et al.*, 2004), por modulación de la apoptosis (Bergamaschi *et al.*, 2006).

Es un hecho que el principal factor asociado al pronóstico en CC es la etapa clínica, por lo que es posible que en nuestro estudio no se haya encontrado una asociación significativa debido a que el grupo de pacientes tenía diferentes etapas clínicas. Con estos resultados se sugiere que tanto, el genotipo 72 Arg/Arg y la infección por HPV 16 y/o 18 estén asociados a un mal pronóstico. Sin embargo, es necesario probar esta hipótesis. Aproximadamente 50% de las pacientes en etapas clínicas II a III

tiene buena respuesta a terapia, (radio, braquiterapia), y no se conocen marcadores genéticos o moleculares que se asocien a tal respuesta y por lo tanto sean predictivos. Por lo cual un candidato a explorar es la presencia tanto del SNP 72, así como el tipo viral. Para determinar si efectivamente el polimorfismo del codon 72 se asocia a la sobrevida en pacientes con CC, es necesario realizar un análisis con pacientes estratificadas por etapas clínicas, ya que la etapa clínica es el principal factor de respuesta a terapia y de sobrevida.

Desde el punto de vista bioquímico se ha demostrado que TP53 Arg es más susceptible de ser degradada por E6 de HPV 16 que TP53 Pro (Thomas *et al.*, 1999) y por otra parte estudios de Hilles y colaboradores (2006) muestran que TP53 es degradada en menor proporción por E6 de VPH56, VPH58 y VPH88, aunque no lo mencionan, asumimos que la proteína TP53 con la que trabajaron es Arg72, ya que es la de mayor frecuencia por lo cual es considerada WT.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la infección por VPH16 y 18, homocigocis en el codón 72 Arg de *TP53* y más de cinco embarazos, son factores que en conjunto pueden contribuir de manera importante al desarrollo de CC y posiblemente a un mal pronóstico.

8. 4 Cambios en la región de los exones 5 a 9 de *TP53*

La oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo interaccionan con la proteína TP53 mediante el dominio de unión a DNA, posteriormente es ubiquitinada y degradada por la vía de proteosoma. En esta región se han identificado polimorfismos, algunos de los cuales podrían generar cambios conformacionales y/o en las propiedades de la proteína que pudieran afectar la interacción con E6. A la fecha no se tenía información sobre las variaciones de secuencia de *TP53* en la población mexicana, por lo cual se identificaron los polimorfismos en el dominio de unión a DNA.

Se realizó la búsqueda de cambios en la secuencia de la región comprendida entre los exones 5 a 9 de *TP53*, la cual abarca un total de 1782 pb, mediante la misma estrategia de tamizaje por DHPLC y método enzimático por Surveyor y secuenciación de las muestras que mostraban patrones heterodúplex.

El SNP del codón 213 genera un cambio sinónimo Arg/Arg y hasta el momento no hay reportes sobre su frecuencia en la población mexicana. Este polimorfismo ha sido determinado en otras poblaciones, específicamente en el proyecto del *National Institute of Environmental Health Sciences Environmental Genome Project* (NIEHS), en donde determinaron en 99% el alelo A y 1% el alelo G. En nuestro trabajo encontramos en los controles un 100% del alelo A, mientras que en los casos un 98.9%, lo cual no fue estadísticamente significativo.

Respecto a la importancia de los cambios sinónimos, Candeilas y cols. (2008) demostraron que el RNAm de *TP53*, específicamente de la región que codifica para el sitio de interacción con MDM2, se une directamente al dominio RING de MDM2, lo cual impide la actividad de ligasa y promueve la traducción de *TP53*. En dicho trabajo se demostró que una mutación de tipo silente en *TP53*, la cual no afecta la secuencia de la proteína, disminuye la unión de MDM2 al RNAm de *TP53* y por consiguiente se reduce la eficiencia en la traducción de la proteína.

Actualmente, en la construcción 136 de SNP de NCBI se muestran un total de 402 SNPs en región codificante y no codificantes; sin embargo, no todos están validados, es decir no de todos se tienen datos sobre la frecuencia genotípica de los distintos grupos de poblaciones donde se analizan variaciones genéticas. Así mismo, en nuestros resultados detectamos 12 cambios o variaciones en la secuencia no codificante, respecto a la secuencia de referencia. Hasta hace poco tiempo, no se había dado importancia a las secuencias no codificantes. Actualmente se realizan estudios para determinar el papel funcional de las secuencias no codificantes. Por ejemplo el RNA no codificante (ncRNA) representa 97% del genoma humano y se ha demostrado su papel funcional como en el caso de los miRNA y RNA no codificantes

largos. Otros mecanismos de regulación se han observado en los RNA antisentido, por lo que las variaciones en secuencias no codificantes, pueden tener efectos funcionales. Como ocurre en las bases de datos públicas, los cambios detectados en nuestro trabajo deben ser validados para clasificarse como mutaciones o polimorfismos, adicionalmente al estudio funcional de dichas variaciones.

De los cambios detectados en la región intrónica, uno de ellos es de tipo heterocigoto C>T en la posición 13039, aunque en la base de datos no se tienen reportes sobre dicho cambio. Interesantemente, en citosinas adyacentes en las posiciones 13042 y 13045 del intrón 4, se han reportado el mismo tipo de cambio. Es conocido que el tipo de mutación más común es C>T debido a la deaminación de la citosina metilada, la cual cambia a uracilo y en posteriores ciclos de replicación cambia a timina. Aunque en teoría esta mutación no genera cambios en las propiedades de la proteína por estar localizada fuera de los sitios de *splicing*, es interesante encontrar evidencia del tipo de mutación de mayor frecuencia.

Otra de las mutaciones fue en la posición 13215 G>A del intrón 5 y puede ser causada por el mismo mecanismo de desaminación de la citosina de la cadena complementaria a timina. Esta mutación ya fue reportada previamente (Shiao *et al.*, 1995).

En la base de datos de la IARC (R14) se reporta que la mutación de tipo germinal de mayor frecuencia con un 51% es G:C a A:T en sitios CpG, seguido del mismo cambio en sitios no CpG con 12%.

Por otra parte, los polimorfismos hasta ahora detectados en el intrón siete son tanto reportados previamente como nuevos y es la región donde hemos detectado mayor número de cambios. El significado de estos, no es claro, ya que la mayoría de los estudios en *TP53* se enfocan en la región codificante. Se han descrito al menos 2% de mutaciones en región intrónica de *TP53* que afectan el *splicing*; sin embargo, estudios más detallados sugieren que se subestima dicho porcentaje y puede llegar a

más de 20%. Por su parte Barel (1998), sugiere que las mutaciones en la regiones no codificantes de *TP53*, específicamente río abajo del exón 6, pueden ser un mecanismo alternativo de activación.

Respecto a los cambios o polimorfismos intrónicos que no involucran los sitios donadores o aceptores de *splicing*, no se ha analizado el significado biológico de éstos. Se han reportado cambios nucleotídicos en el intrón siete en muestras con cáncer urinario y linfoma. Otros estudios han mostrado asociación de variantes en el intrón 7 con cáncer de pulmón de células no pequeñas y en carcinoma oral (Li *et al.*, 2005; Qi-hua *et al.*, 2007). Sin embargo, no se discuten los posibles mecanismos funcionales de dichos polimorfismos, o si puede estar asociados a otros polimorfismos en regiones exónicas o intrónicas funcionales.

Específicamente los SNP del intrón 7 rs12947788 y rs12951053, en un 12% y un 20% de los controles, respectivamente se presentan con relativa alta frecuencia tanto en casos como en controles, aunque no se identificaron diferencias significativas. La importancia funcional de dichos polimorfismos no se ha establecido, ya que no se encuentran dentro de los sitios donadores y aceptores de *splicing*.

Recientemente numerosas secuencias intrónicas han sido reportadas que codifican miRNA. Los miRNA son secuencias cortas de 22 nucleótidos capaces de regular el silenciamiento de genes codificantes a través de la interacción con el RNAm para inhibir su traducción. Se exploró la posibilidad de que en esta secuencia intrónica de 343 pb formara estructuras secundarias compatibles con miRNA, sin embargo, las delta G no fueron compatibles con una estructura estable.

Adicionalmente a los miRNA, otros RNA no codificantes pueden regular la expresión génica. Algunos de ellos son transcritos en la cadena antisentido de RNA de una región genómica de un gen codificante. En el caso de *TP53* recientemente se identificó al gen *WRAP53*, el cual se sobrelapa en la región 5' de *TP53* y se encuentra en antisentido y es codificante. Se demostró que el transcrito *WRAP53*

puede regular los niveles endógenos de *TP53* a nivel del mensajero (Mahmoundi, 2009).

En general se ha descrito que las mutaciones en *TP53* son raras en CC, en contraste con otros tipos de tumores, donde aproximadamente 50% presentan mutaciones en el gen, aunque no se ha descrito el por qué no se presentan mutaciones independientemente de que la proteína sea inactivada por E6 y E6AP. Por su parte, las mutaciones de tipo germinal están documentadas en pacientes con SLF y SLF Like, siendo baja la frecuencia en CC. En la base de datos de la IARC (R14) de mutaciones germinales, se han documentado siete casos en regiones exónicas, dos de las cuales provienen de pacientes con síndrome de Li-Fraumeni, uno con Li-Fraumeni-Like y cuatro en pacientes con historia familiar de cáncer, pero que no cumplen con los criterios de Li-Fraumeni. Por lo cual es posible que haya más mutaciones de tipo germinal en *TP53* no asociadas a Li-Fraumeni. Al respecto González y cols (2009), sugieren que las mutaciones germinales de *novo* son relativamente comunes y que deben identificarse en pacientes con cáncer a edades tempranas que no tengan historia familiar de cáncer. En el grupo de pacientes analizado encontramos un total de 15 cambios no descritos, tres de los cuales se encuentran en región codificante, mientras que en las bases de datos, el número de variaciones ha ido incrementando conforme se van actualizando, por lo cual el número de variaciones en *TP53* es relativamente alto y una vez validadas, deben realizarse ensayos para determinar su función.

9.0 CONCLUSIONES

- El factor clínico que más contribuyó al desarrollo de CC, después de la infección por VPH de alto riesgo en la población mexicana es el elevado número de embarazos.
- La infección por VPH de alto riesgo se presenta con alta frecuencia en mujeres con resultado de Papanicolaou negativo, por lo cual se sugiere incluir la detección de VPH de alto riesgo adicional a la prueba de Papanicolaou, con la finalidad disminuir falsos negativos y realizar una vigilancia en las pacientes con resultado positivo a VPH de alto riesgo.
- VPH 58 se presenta con relativa alta frecuencia especialmente en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, no así en CC, por lo que se sugiere realizar una tipificación de las variantes virales.
- El alelo Arg es el de mayor frecuencia en la población Mexicana sin enfermedades neoplásicas.
- El SNP Arg en el codón 72 por sí solo no es un factor de riesgo para el desarrollo de CC.
- La infección con VPH16 y/o 18 adicional a la presencia de Arg72 es un factor que puede contribuir al desarrollo y progresión del CC.
- Identificamos una gran variedad de cambios en la secuencia de *TP53*, especialmente en regiones no codificantes, algunas de ellas muy conservadas por lo cual no se descarta que contribuyan a mecanismos de regulación, dadas las recientes evidencias sobre el papel funcional de los intrones, así como de RNAs no codificantes.
- A pesar del gran número de variaciones identificadas en *TP53*, no se encontraron diferencias entre casos y controles, excepto para el SNP 72. Sin embargo, no se descarta un posible papel funcional de las variaciones conservadas.
- Es necesario determinar la frecuencia poblacional y el papel funcional de las variaciones conservadas de *TP53*.
- Este estudio contribuyó al conocimiento sobre la frecuencia y tipos virales de VPH en México, así como a identificar las variaciones de secuencia del gen *TP53* en la población mexicana, de la que se tenía escasa información.

- Los resultados sugieren que la infección con VPH16 o VPH18 y el genotipo Arg/Arg en el codón 72, como factores ambientales y genéticos respectivamente, asociados al desarrollo y progresión del CC.

9.0 CONCLUSIONES

- El factor clínico que más contribuyó al desarrollo de CC, después de la infección por VPH de alto riesgo en la población mexicana es el elevado número de embarazos.
- La infección por VPH de alto riesgo se presenta con alta frecuencia en mujeres con resultado de Papanicolaou negativo, por lo cual se sugiere incluir la detección de VPH de alto riesgo adicional a la prueba de Papanicolaou, con la finalidad disminuir falsos negativos y realizar una vigilancia en las pacientes con resultado positivo a VPH de alto riesgo.
- VPH 58 se presenta con relativa alta frecuencia especialmente en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, no así en CC, por lo que se sugiere realizar una tipificación de las variantes virales.
- El alelo Arg es el de mayor frecuencia en la población Mexicana sin enfermedades neoplásicas.
- El SNP Arg en el codón 72 por sí solo no es un factor de riesgo para el desarrollo de CC.
- La infección con VPH16 y/o 18 adicional a la presencia de Arg72 es un factor que puede contribuir al desarrollo y progresión del CC.
- Identificamos una gran variedad de cambios en la secuencia de *TP53*, especialmente en regiones no codificantes, algunas de ellas muy conservadas por lo cual no se descarta que contribuyan a mecanismos de regulación, dadas las recientes evidencias sobre el papel funcional de los intrones, así como de RNAs no codificantes.
- A pesar del gran número de variaciones identificadas en *TP53*, no se encontraron diferencias entre casos y controles, excepto para el SNP 72. Sin embargo, no se descarta un posible papel funcional de las variaciones conservadas.
- Es necesario determinar la frecuencia poblacional y el papel funcional de las variaciones conservadas de *TP53*.
- Este estudio contribuyó al conocimiento sobre la frecuencia y tipos virales de VPH en México, así como a identificar las variaciones de secuencia del gen *TP53* en la población mexicana, de la que se tenía escasa información.

- Los resultados sugieren que la infección con VPH16 o VPH18 y el genotipo Arg/Arg en el codón 72, como factores ambientales y genéticos respectivamente, asociados al desarrollo y progresión del CC.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso de Ruiz P, Lazcano E, Hernández M. Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y tratamiento. Ed. Panamericana pp.254.
2. Alonso de Ruiz P, Lazcano Ponce E, Duarte Torres R, Ruíz Juárez I, Martínez Cortéz I. Reproducibilidad diagnóstica del papanicolaou en dos zonas de México: necesidad de mecanismos de control de calidad. Bol Oficina Sanit Panam, 1996, 212: 518-527.
3. Anderson C and Appela E. Signaling to the p53 Tumor Suppressor through Pathways Activated by Genotoxic and Non-genotoxic Stresses. In Handbook of Cell Signaling R. A. Bradshaw and E. Dennis, eds. Academic Press, New York, 2002.
4. Andrade A, Zepeda Zaragoza J, Rodríguez Blancop B. Evaluación del Papanicolaou y la colposcopia en el diagnóstico de la infección por el virus de papiloma humano. Rev Fac Med UNAM, 2001, 44:5-7.
5. Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegne AR. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. Br J Cancer 1996, 74:488-490.
6. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 1989, 244:217-221.
7. Barbaresi S, Cortese MS, Quinn J, Ashrafi GH, Graham SV, Campo MS. Effects of human papillomavirus type 16 E5 deletion mutants on epithelial morphology: functional characterization of each transmembrane domain. J Gen Virol 2010, 91:521-30.
8. Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection?. Hum Hered 1994, 44:266-70.
9. Bendesky A, Rosales A, Salazar AM, Sordo M, Peniche J, Ostrosky-Wegman P. p53 codon 72 polymorphism, DNA damage and repair, and risk of non-melanoma skin cancer. Mutat Res. 2007, 619:38-44.
10. Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T, Lu X. ASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. Nat Genet 2006, 38:1133-41
11. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. J Natl Cancer Inst 2001, 93:1325-30.
12. Bosch X, de San José S. Human papillomavirus and cervical cancer-Burden and assessment of causality. J Natl cancer Inst monogr 2003; 31:3-13.
13. Bradley KA, Petereit DG. Radiation therapy for gynecologic malignancies. Hematol Oncol Clin North Am 2006, 20:347-61
14. Bray F, Loos AH, McCarron P, Weiderpass E, Arbyn M, Moller H, Hakama M, Parkin DM. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and effects screening. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14:77-86.

15. Brenna SM, Silva ID, Zeferino LC, Pereira JS, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Prognostic value of P53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. *Gynecol Oncol*, 2004; 93:374-80.
16. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 2009 10:701-13.
17. Brummer O, Hollwitz B, Bohmer G, Kuhnle H, Petry KU. Human papillomavirus-type persistence patterns predict the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2006,102:517-22.
18. Burd E Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16: 1-17.
19. Butz K, Shahabeddin L, Geisen C, Spitkovsky D, Ullmann A, Hoppe-Seyle. Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells *Oncogene* 1995, 10:927-36.
20. Cairns C and White R. p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *The EMBO Journal* 1998, 17:3112-3123.
21. Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frias_mendivil, Solorza G, Lizano M. Usefulness of combining universal oligonucleotides in detecting human papillomavirus in cervical cancer and premalignant lesions. *Salud Pública de México* 2004, 46:7-15.
22. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002, 89:191-9.
23. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:20-8.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV Infection-CDC Fact Sheet. Centers for Disease Control and Prevention. 2004.
25. Chakrabarti O and Krishna S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumor progression. *J Biosci* 2003, 28 337-348.
26. Chan PK, Li WH, Chan MY, Ma WL, Cheung JL, Cheng AF. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. *J Med Virol* 1999, 59:232-8.
27. Cheng T, Wentzel E, Kent, O, Ramachandran K, Mullendore M, Lee K, Feldman G, YamakuchiM, Ferlito M, Lowenstein C, Arking D, Beer M, Maitra A, Mendel J. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Moll Cell* 2007, 26:745-752.
28. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994, 265:346-355.
29. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006,24:26-34.
30. Cuddihy AR, Wong AH, Tam N, Li S. & Koromilas AE. The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* 1999, 18:2690-2702.

31. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Gilkison G, Arends MJ, Graham C, McGoogan E. Persistent high risk HPV infection associated with development of cervical neoplasia in a prospective population study. *J Clin Pathol* 2005, 58:946-50.
32. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, Dillner J, Meijer CJ. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008, 10:K29-41.
33. Daniels PR, Sanders CM, Maitland NJ. Characterization of the interactions of human papillomavirus type 16 E6 with p53 and E6-associated protein in insect and human cells. *J Gen Virol* 1998, 79:489-99.
34. de Geest K, Turyk ME, Hosken MI, Hudson JB, Laimins LA, Wilbanks GD. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 1993, 49:303-10.
35. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007, 7:453-9.
36. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-relates antigen in chemical induced sarcomas and other transformed cells of the Mouse. *Proc Natl Acad Sci* 1979, 76:2420-2424.
37. Denton, A.S, Bond, S.J, Matthews, S., Bentzen, S.M., & Maher, E.J. National audit of the management and outcome of carcinoma of the cervix treated with radiotherapy in 1993. *Clin Oncol (R. Coll. Radiol.)* 2000, 12:347-353.
38. Deshpande A, Wheeler CM, Hunt WC, Peyton CL, White PS, Valdez YE, Nolan JP. Variation in HLA class I antigen-processing genes and susceptibility to human papillomavirus type 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis* 2008,197:371-81.
39. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992, 356:215-221.
40. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC III, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003, 33:357-65.
41. Edelstein ZR, Madeleine MM, Hughes JP, Johnson LG, Schwartz SM, Galloway DA, Carter JJ, Koutsky LA. Age of diagnosis of squamous cell cervical carcinoma and early sexual experience. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009, 18:1070-6.
42. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses *J Virol* 1997, 71:2449-56.
43. Feng L, Hollstein M & Xu, Y. Ser46 phosphorylation regulates p53-dependent apoptosis and replicative senescence. *Cell Cycle* 2006, 5:2812-2819.
44. Fernandez ME, McCurdy SA, Arvey SR, Tyson SK, Morales-Campos D, Flores B, Useche B, Mitchell-Bennett L, Sanderson M. HPV knowledge, attitudes, and cultural beliefs among Hispanic men and women living on the Texas-Mexico border. *Ethn Health* 2009,14:607-24.

45. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989, 57:1083-1093.
46. García-Cao I, García-Cao M, Martín-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, Weill JC, Blasco MA, Serrano M.. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 2002, 21, 6225-35.
47. Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 1999,18:5487-96.
48. Garner-Hamrick, P., and C. Fisher. HPV episomal copy number closely correlates with cell size in keratinocyte monolayers. *Virology* 2002, 301:334-341.
49. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 2001, 75:1565-70.
50. Giuliano AR, Papenfuss M, Abrahamsen M, Denman C, de Zapien JG, Henze JL, Ortega L, Brown de Galaz EM, Stephan J, Feng J, Baldwin S, Garcia F, Hatch K. Human papillomavirus infection at the United States-Mexico border: implications for cervical cancer prevention and control. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, 10:1129-36.
51. Giuliano AR, Papenfuss M, Schneider A, Nour M, Hatch K Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among Mexican-American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999, 8:615-20.
52. Gomes de Souza L, Miranda de Lima J, Dale Cotrim Guerreiro da Silva I, Manoukian Forones N. P53 Arg72Pro polymorphism in gastric cancer patients. *J Gastrointest Cancer* 2009, 40:41-5.
53. Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, Martín-Villa M, Pérez-Blas M, López-Santalla M, Lucas Gramajo P, Silvera C, Lowy E, Arnaiz-Villena A. Origin of Mayans according to HLA genes and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 2003, 61:425-36.
54. Gonzalez KD, Buzin CH, Noltner KA, Gu D, Li W, Malkin D, Sommer SS. High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 2009, 46:689-693.
55. González-Garay ML, Barrera-Saldaña HA, Avilés LB, Alvarez-Salas LM, Gariglio P. Prevalence in two Mexican cities of human papillomavirus DNA sequences in cervical cancer. *Rev Invest Clin* 1992, 44:491-9.
56. González-Losa Mdel R, Rosado-Lopez I, Valdez-González N, Puerto-Solís M. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *J Clin Virol* 2004, 29:202-5.
57. González-Sánchez JL, Chávez-Brambila J, Hernández_Hernández DM, Mrtínez-Sánchez S, García-Carrancá A. Infección por virus del papiloma humano de alto riesgo y bajo riesgo en mujeres con NIC: Características diferenciales. *Ginecol. Obstet Mex* 2002, 70:11-6.
58. Grönroos E, Terentiev AA, Punga T, Ericsson J. YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci* 2004, 101:12165-70.
59. Gross E, Kiechle M, Arnold N. Mutation analysis of p53 in ovarian tumors by DHPLC. *J Biochem Biophys Methods* 2001, 47:73-81.

60. Gu J, Rubin RM, Yuan ZM. A sequence element of p53 that determines its susceptibility to viral oncoprotein-targeted degradation. *Oncogene* 2001, 20:3519-27.
61. Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A, Donehower LA. Spontaneous and carcinogen induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet* 1993, 5:225-229.
62. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO* 1989, 8:3905-3910.
63. Hengstermann A, D'silva MA, Kuballa P, Butz K, Hoppe-Seyler F, Scheffner M. Growth suppression induced by downregulation of E6-AP expression in human papillomavirus-positive cancer cell lines depends on p53. *J Virol* 2005, 79:9296-300.
64. Hernández Hernandez DM, Ornelas-Bernal L, Guido Jimenez M, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, Mohar-Betancourt A, Garcia-Carranca A. Association between high risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer en Mexican women. *Gynecol Oncol* 2003, 90:310-7.
65. Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce EC, Berumen-Campos J, Cruz-Valdéz A, Alonso de Ruíz PP, González-Lira G. Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-control study. *Arch Med Res* 1997, 28:265-71.
66. Hernández-Hernández DM, García-Carrancá A, Guido-Jiménez MC, González-Sánchez JL, Cruz-Talonia F, Apresa-García T, Martínez-Elizondo OA, Ornelas-Bernal L, Alvarado-Cabrera I, Muñoz S. High-risk human papilloma virus and cervical intraepithelial neoplasia in women at 2 hospitals in Mexico City. *Rev Invest Clin* 2002, 54:299-306.
67. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169:235-40.
68. Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, and Iftner T. Comparative Analysis of 19 Genital Human Papillomavirus Types with Regard to p53 Degradation,Immortalization, Phylogeny,and Epidemiologic Risk Classification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, 15:1262-7.
69. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 2009, 384:324-34.
70. <http://www.iarc.fr/p53/>.
71. Huang LW, Chao SL, Hwang JL. Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer* 2004,100:327-34.
72. Huang S, Afonina I, Miller BA, Beckmann AM. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer* 1997, 70:408-11.
73. Hwang SJ, Lozano G, Amos CI, Strong LC. Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. *Am J Hum Genet* 2003, 72: 975-983.

74. Hwang T. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean women. *J Korean Med Sci* 1999, 14:593-9.
75. Illades-Aguiar B, Alarcón-Romero Ldel C, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, Fernández-Tilapa G, Vences-Velázquez A, Muñoz-Valle JF, Leyva-Vázquez MA. Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol* 2010,117:291-6.
76. Illades-Aguiar B, Cortés-Malagón EM, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Alarcón-Romero Ldel C, Fernández-Tilapa G, Hernández-Sotelo D, Terán-Porcayo MA, Flores-Alfaro E, Leyva-Vázquez MA. Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Detect Prev* 2009, 32:300-7.
77. Ivanov GS, Ivanova T, Kurash J, Ivanov A, Chuikov S, Gizatullin F, Herrera-Medina EM, Rauscher F 3rd, Reinberg D, Barlev NA. Methylation-acetylation interplay activates p53 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2007, 27:6756-69.
78. Ivansson EL, Gustavsson IM, Magnusson JJ, Steiner LL, Magnusson PK, Erlich HA, Gyllensten UB. Variants of chemokine receptor 2 and interleukin 4 receptor, but not interleukin 10 or Fas ligand, increase risk of cervical cancer. *Int J Cancer* 2007, 121:2451-7.
79. Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994, 4:1-7.
80. Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004, 85:301-8.
81. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, Jacks T. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 2001, 410:1111–1116.
82. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997, 90:809-19.
83. Kahn JA, Rosenthal SL, Succop PA, Ho GY, Burk RD. The interval between menarche and age of first sexual intercourse as a risk factor for subsequent HPV infection in adolescent and young adult women. *J Pediatr* 2002, 141:718-23.
84. Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler C and Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *Journal of General Virology* 2000, 81:1975-1981.
85. Kang S, Dong SM, Seo SS, Kim JW, Park SY. FAS -1377 G/A polymorphism and the risk of lymph node metastasis in cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2008, 180:1-5.

86. Kang S, Kim JW, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP. Interleukin-1 beta-511 polymorphism and risk of cervical cancer. *J Korean Med Sci* 2007, 22:110-3.
87. Kao WH, Beaudenon SL, Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J Virol* 2000, 74:6408-17.
88. Kato, S. Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc. Natl Acad. Sci* 2003, 100:8424-8429.
89. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA binding protein. *Science* 1991, 252:1708-1711.
90. Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Song HS, Kwon KY, Do YR, Kim MK, Lee KH, Hyun MS, Lee WS, Sohn CH, Jung JS, Kim GC, Chung HY, Yu W. TP53 codon 72 polymorphism associated with prognosis in patients with advanced gastric cancer treated with paclitaxel and cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009, 64:355-60.
91. Klug SJ, Ressing M, Koenig J, Abba MC, Agorastos T, Brenna SM, Ciotti M, Das BR, Del Mistro A, Dybikowska A, Giuliano AR, Gudleviciene Z, Gyllensten U, Haws AL, Helland A, Herrington CS, Hildesheim A, Humbey O, Jee SH, Kim JW, Madeleine MM, Menczer J, Ngan HY, Nishikawa A, Niwa Y, Pegoraro R, Pillai MR, Ranzani G, Rezza G, Rosenthal AN, Roychoudhury S, Saranath D, Schmitt VM, Sengupta S, Settheetham-Ishida W, Shirasawa H, Snijders PJ, Stoler MH, Suárez-Rincón AE, Szarka K, Tachezy R, Ueda M, van der Zee AG, von Knebel Doeberitz M, Wu MT, Yamashita T, Zehbe I, Blettner M. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *Lancet Oncol.* 2009, 10:772-84.
92. Kohaar I, Thakur N, Salhan S, Batra S, Singh V, Sharma A, Sodhani P, Das BC, Sarkar DP, Bharadwaj M. TNFalpha-308G/A polymorphism as a risk factor for HPV associated cervical cancer in Indian population. *Cell Oncol* 2007, 29:249-56.
93. Koushik A, Platt RW, Franco EL. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004, 13:11-22.
94. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997;102:3-8.
95. Kurihara A, Nagoshi H, Yabuki M, Okuyama R, Obinata M, Ikawa S. Ser46 phosphorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanisms of regulation of p53-dependent apoptosis. *Genes Cells* 2007, 12:853-861-
96. Lacey Anson J, Turek L, and Haugen T. Functional Mapping of the Human Papillomavirus Type 16 E1 Cistron. *J Virol.* 2008, 82:10724-10734.
97. Lai HC, Chu CM, Lin YW, Chang CC, Nieh S, Yu MH, Chu TY. Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism as a prognostic predictor of invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2005, 96:314-9.

98. Lai HC, Sun CA, Yu MH, Chen HJ, Liu HS, Chu TY. Favorable clinical outcome of cervical cancers infected with human papillomavirus type 58 and related types. *Int J Cancer* 1999, 84:553-7.
99. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.
100. Lazcano PE, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Leerte VS, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M. Epidemiology of HPV infection among Mexican woman with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001, 91:412-420.
101. Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF, Lim B. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev* 2009, 23:862-76.
102. Lechner M, Mack D, Finicle A, Crook T, Vousden K, Laimins L. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* 1992, 11:3045-3052.
103. Levesque A, Kohn E, Bresnik E, Eastman A. Distinct roles for p53 transactivation and repression in preventing UCN-01-mediated abrogation of DNA damage-induced arrest at S and G2 cell cycle checkpoints. *Oncogene* 2005, 24:3786-3796
104. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and differentiation. *Cell* 1997, 88:323-331.
105. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer* 2010.
106. Li X and Coffino P. High risk papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites with p53, of only one determines degradation. *J Virol* 1996, 70:4509-16.
107. Li YQ, Li YL, Gu QH, Ye AH, Wu TS. p53 gene intron 7 polymorphism and its association with oral neoplasms. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2005, 40:386-9.
108. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* 2001, 183:8-15.
109. Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, Tommasino M, Zehbe I, Sherman L. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology* 2006, 350:216-27.
110. Liu Y, Henry GD, Hegde RS, Baleja JD. Solution structure of the hDIg/SAP97 PDZ2 domain and its mechanism of interaction with HPV-18 papillomavirus E6 protein. *Biochemistry* 2007, 46:10864-74.
111. Lizano M, De la Cruz EH, Carrillo GA, García CA, Ponce de León RS, Dueñas GA, Hernández HD, Mohar A. Distribution of HPV 16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in Mexican population. *Gynecol Oncol* 2006, 102:230-235.
112. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68:362-72.

113. López RR, Martínez CL, Sánchez GM. Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican woman with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infectious Agents and Cancer* 2008, 3:3.
114. Lőrincz A. Screening for cervical cancer in: new alternatives and research. *Salud Pública de México* 2003, 45 sup 3:S376-S387.
115. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994, 266:807-810.
116. Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Méndez-Vidal C, Wiman KG, Farnebo M. Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell* 2009; 33:462-71.
117. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski G. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 2000, 87:528-33.
118. Malkin D, Li FP, Strong L, Fraumeni J, Nelson C, Kim D, Kassel J, Gryka M, Bischoff F, Tainsky M, Friend S. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233-1238.
119. Martin A, Facchiano A, Cuff A, Hernández T, Olivier M, Hainaut P, Thornton J. Integration mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Human Mut* 2002, 19:149-164.
120. Matos A, Moutinho J, Pinto D, Medeiros R. The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a southern European population. *Eur J Cancer Prev.* 2005,14:485-91.
121. Mayrand M, Coutle F, Hankins C, Lapointe N, Forest P, Ladurantaye M and Roger M. Detection of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Consecutive Genital Samples Does Not Always Represent Persistent Infection as Determined by Molecular Variant Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2000, 9:3388–3393.
122. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2008, 9: 425-34.
123. Meijer CJ, Berkhof H, Heideman DA, Hesselink AT, Snijders PJ. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. *J Clin Virol.* 2009, 46 Suppl 3:S1-4.
124. Meijer CJ, Snijders P and van den Brule A. Screening for cervical cancer: Should we test for infection with high-risk HPV? *CMAJ* 2000, 163:535-538.
125. Minaguchi T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y & Nakamura Y. No evidence correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infections. *Cancer research* 1989, 58:4585-86.
126. Min-min H, Ming-rong X, Ze-yi C, Kai-xuan Y, Zhi-lin S. Analysis of p53 codon 72 polymorphism and its association with human papillomavirus 16 and 18 E6 in Chinese cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16:2004-8.

127. Mitra S, C Misra, R K Singh, C K Panda, and S Roychoudhury Association of specific genotype and haplotype of p53 gene with cervical cancer in India *J Clin Pathol* 2005, 58: 26–31.
128. Montoya FH, Suárez RA, Ramírez MM, Arévalo LI, Morán MM, Gallegos AM, Flores MS, Rosales QS, Sánchez CJ. Detección de papilomavirus humano tipos 16, 18, 35 y 58 en cáncer cervicouterino y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado en el occidente de México: correlación clínico molecular. *Ginecología y Obstetricia de México* 2001, 69:137-142.
129. Moodley M, Moodley J, Chetty R & C. S. Herrington. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: A review. *Int J Gynecol Cancer* 2003, 13:103-110.
130. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003, 348:518-27.
131. 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. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case /control study. *Lancet* 2002, 359:1093-101.
132. Mutch DG, Gall J, Gall I. The New FIGO staging system for cancers of vulva, cervix, endometrio and sarcomas. Meeting Report. *Gynecologic Oncology* 2009; 115:325-328.
133. Nasiell K, Roger V, Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecology* 1986, 67:665-9.
134. Niwa Y, Matsuo K, Ito H, Hirose K, Tajima K, Nakanishi T, Nawa A, Kuzuya K, Tamakoshi A, Hamajima N. Association of XRCC1 Arg399Gln and OGG1 Ser326Cys polymorphisms with the risk of cervical cancer in Japanese subjects. *Gynecol Oncol* 2005, 99:43-9.
135. Nogueira de Souza NC, Brenna SM, Campos F, Syrjänen KJ, Baracat EC, Silva ID. Interleukin-6 polymorphisms and the risk of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16:1278-82.
136. Nomine Y, Ristriani T, Laurent C, Lefevre JF, Weiss E, Trave G. Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. *Protein Expr Purif* 2001, 23:22-32.
137. Novick GE, Novick CC, Yunis J, Yunis E, Antunez de Mayolo P, Scheer WD, Deininger PL, Stoneking M, York DS, Batzer MA, Herrera RJ. Polymorphic Alu insertions and the Asian origin of Native American populations. *Hum Biol* 1998, 70:23-39.
138. O'Donnovan M, Oefner P, Roberts S, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer S, and McGuffin P.. Blind analysis of denaturing high performance–liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 1998, 52:44-49.
139. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Research* 2003, 63:6643-6650.

140. Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendáriz-Borunda J, Berumen J. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* 2004, 85(Pt 6):1433-44.
141. Papanicolaou Gn. The cancer-diagnostic potential of uterine exfoliative cytology. *CA Cancer J Clin* 1957, 7:124-35.
142. Parkin MD, Bray F, Pisani F, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55:74-108.
143. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006, 24 Suppl 3:S3/11-25.
144. Parkin MD, Almonte M, Bruni L, Clifford G, Curado MP, Piñeros M. Burden and trends of type-specific Human Papillomavirus infections and related diseases in Latin America and Caribbean region. *Vaccine* 2008, 26SL1-L15.
145. Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi P & Pelicci PG. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 2000, 406: 207-210.
146. Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 2009, 105:107-8.
147. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007, 28:622-9.
148. Perales G, Burguete-García AI, Dimas J, Bahena-Román M, Bermúdez-Morales VH, Moreno J, Madrid-Marina V A polymorphism in the AT-hook motif of the transcriptional regulator AKNA is a risk factor for cervical cancer. *Biomarkers* 2010 May 28.
149. Ponten J, Adami H, Bergstrom R, Dillner J, Friberg L, Gustafsson J, Miller A, Parkin M, Sparen P, Trichopoulos D. Strategies for global control of cervical cancer. *Int J Cancer* 1995, 60:1-26.
150. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD. Science. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. 2000, 289:304-6.
151. Reisman D, Bálint é, Loging WT, Rotter V, Almon E. A novel transcript encoded within the 10-kb first intron of the human p53 tumor suppressor gene (D17S2179E) is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Genomics* 1996, 38:364-70.
152. Resnick MA. Noncanonical sequence motifs as target for transactivation by WT and mutant p53. Third International Workshop on mutant p53 Li-Fraumeni Symposium 2007: Lecture 6.
153. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Ann* 1973; 8:301-328.
154. Robbins & Cotran. Patología estructural y funcionala 6ª edición McGraw Hill Interamericana, 2008, 1475 pp.
155. Rodríguez-Reyes ER, Cerda-Flores RM, Solís Ríos NP, Quiñones Pérez JM, Cortés-Gutiérrez EI. Identification and typification of the human papilloma virus in women using the "Timely Detection of Cancer" program in Durango, Mexico. *Ginecol Obstet Mex* 2003, 71:471-5.

156. Sánchez-Anguiano LF, Alvarado-Esquivel C, Reyes-Romero A, Carrera-Rodríguez M. Human papillomavirus infections in women seeking cervical papanicolaou cytology of Durango, Mexico: Prevalence and genotypes. *BMC infection diseases* 2006, 6:27.
157. Saranath D, Khan Z, Tandle AT, Dedhia P, Sharma B, Contractor R, Shrivastava S, Dinshaw K. HPV16/18 prevalence in cervical lesions/cancers and p53 genotypes in cervical cancer patients from India. *Gynecol Oncol* 2002, 86:157-62.
158. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse MJ, Levine AJ and Howley PM.. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990, 63:1129-1136.
159. Schiffman M, Rodríguez A, Cheng Z, Wacholder S, Herrero R, Hidesheim A, Desalle R, Befano B, Yu K, Safaeian M, Sherman, M, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Solomon D, Castle P, Burk R. A population-based prospective study of carcinogenic Human papilomavirus Variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 2010, 70:3159-69.
160. Schwartz SM, Daling JR, Shera KA, Madeleine MM, McKnight B, Galloway DA, Porter PL, McDougall JK. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. *J Clin Oncol* 2001, 19:1906-15.
161. Scoumanne A, Chen X. Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histol Histopathol* 2008, 23:1143-9.
162. Sedman J and Stenlund A. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* 1998, 72:6893-6897.
163. Shah W, Hongwei C, Jin Z, Lifang D, Jun Y, Yili W The prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese patients with cervical carcinoma and its influence on survival. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2009, 21:768-74
164. Siddique MM, Balram C, Fiszer-Maliszewska L, Aggarwal A, Tan A, Tan P, Soo KC, and Sabapathy K. Evidence for Selective Expression of the p53 Codon 72 Polymorphs: Implications in Cancer Development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14(9).
165. Singh H, Jain M, Mittal B. MMP-7 (-181A>G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008, 110:71-5.
166. Smeenk L, van Heeringen S, Koeppel M, van Driel M, Bartels S, Akkers R, Denissov S, Stunnenberg H, Lohrun M. Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. *Nucleic Acids Res* 2008, 36:3639-54
167. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007, 121:621-32.
168. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006, 208:152-64.
169. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. *JAMA*. 2002, 287:2114-9.
170. Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis: an overview. *Int J Gynecol Pathol* 1991,10:323-5.

171. Soto-Reyes E, Recillas-Targa F. Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene* 2010, 29:2217-27.
172. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med* 2007, 20:731-41.
173. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncology* 2010, 117:S5-S10
174. Storey A, Thomas M, Kalita A, HGardwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh M, Matlashewski G and Banks L. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature* 1998, 393:229-234.
175. Suárez-Rincón AE, Morán-Moguel MC, Montoya-Fuentes H, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Polymorphism in codon 72 of the p53 gene and cervico-uterine cancer risk in Mexico. *Ginecol Obstet Mex* 2002, 70:344-8
176. Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiant G, Attard M, Hiller L, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2004, 23:3328-37.
177. Sun T, Zhou Y, Li H, Han X, Shi Y, Wang L, Miao X, Tan W, Zhao D, Zhang X, Guo Y, Lin D. FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med* 2005, 202:967-74.
178. Thomas M, Massimi P, Jenkins J, Banks L. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* 1995, 10:261-268.
179. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*, 1999 19:1092-100.
180. Thomas M, Pim D and Banks L. The role of the e6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999, 18:7690-7700.
181. Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* 2002, 21:5088–5096.
182. Tirado-Gómez LL, Mohar-Betancourt A, López-Cervantes M, García-Carrancá A, Franco-Marina F, Borges G. Risk factors in invasive cervical cancer among Mexican women. *Salud Pública Mex* 2005, 47:342-50.
183. Tominaga T, Iwahashi M, Takifuji K, Hotta T, Yokoyama S, Matsuda K, Higashiguchi T, Oku Y, Nasu T, Yamaue H. Combination of p53 codon 72 polymorphism and inactive p53 mutation predicts chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010, 126:1691-701.
184. Tommasino M, Accadi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A and Zehbe I. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Human Mutation* 2003, 21:307-312.
185. Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Onco* 1998, 70:115-20.

186. Tungteakkhun S, Duerksen-Huges P. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 2008, 153:397-408.
187. Vannini I, Zoli W, Tesei A, Rosetti M, Sansone P, Storci G, Passardi A, Massa I, Ricci M, Gusolfino D, Fabbri F, Ulivi P, Briigliadori G, Amadori D, Bonafe M. Role of p53 codon 72 arginine allele in cell survival in vitro and in the clinical outcome of patients with advanced breast cancer. *Tumour Biol* 2008, 29:145-51
188. Velázquez-Márquez N, Paredes-Tello MA, Pérez-Terrón H, Santos-López G, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Prevalence of human papillomavirus genotypes in women from a rural region of Puebla Mexico. *Int J Infect Dis.* 2009, 13:690-5.
189. Venkatachalam S, Tyner SD, Pickering CR, Boley S, Recio L, French JE, Donehower LA. Is p53 Haploinsufficient for Tumor Suppression? Implications for the p53^{+/-} Mouse Model in Carcinogenicity Testing. *Toxicologic Pathology* 2001, 29:147–154.
190. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992, 70:523-6
191. Walboomers JM, Jacobs M, Manos M, Bosch FX, Kummer A, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C and Muñoz N. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.
192. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci* 1996, 93:15335-40.
193. Waterman M, Stavridi ES, Waterman JL & Halazonetis TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 1998, 19:175-178.
194. Webley K, Bond JA, Jones CJ, Blaydes JP, Craig A, Hupp T. and Wynford-Thomas D. Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 2000, 20:2803-2808.
195. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990, 248:76-79.
196. Whibley C, Pharoah P, Hollstein M. p53: polymorphisms: cancer implications. *Nature Reviews in Cancer* 2009, 9:95-107.
197. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Mexico. 2007. www.who.int/hpvcentre.
198. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, and Koutsky LA. Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *N Engl J Med* 2006, 354:2645-54.
199. Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* 2002, 18:90-95.
200. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998, 2:305-16.
201. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative

- proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999, 398: 714-718.
202. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D. P73-deficient mice have neurobiological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumors. *Nature* 2000, 404:99-103.
203. Yang W, Wetterskog D, Matsumoto Y, Funa K. Kinetics of repression by modified p53 on the PDGF beta-receptor promoter. *Int J Cancer* 2008, 123:2020-30.
204. Yin Y, Luciani M G, Fahraeus R. p53 stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nature Cell Biol* 2002, 4:462-467.
205. Yoon H, Liyanarachchi S, Wright FA, Davuluri R, Lockman JC, de la Chapelle A, Pellegata N. Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53. *Proc Natl Acad Sci* 2002, 99:15632-7.
206. Yu H, Chen JCV, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 1994 76, 933-945.
207. Zhang T, Xu Y, Qiao L, Wang Y, Wu X, Fan D, Peng Q, Xu X. Trivalent Human Papillomavirus (HPV) VLP vaccine covering HPV type 58 can elicit high level of humoral immunity but also induce immune interference among component types. *Vaccine* 2010, 28:3479-87
208. Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 2000, 14:981-93
209. Zoodsma M, Nolte IM, Te Meerman GJ, De Vries EG, Van der Zee AG. HLA genes and other candidate genes involved in susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Oncol* 2005, 26:769-84.
210. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977, 78:1-30.

ANEXO 1

Artículo publicado en Int J Gynecol Cancer 2006, 16:1041-1047.

Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions

P. PIÑA-SÁNCHEZ*, D.M. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ*, R. LÓPEZ-ROMERO*, G. VÁZQUEZ-ORTÍZ*, C. PÉREZ-PLASENCIA*, M. LIZANO-SOBERÓN†, J.L. GONZÁLEZ-SÁNCHEZ‡, F. CRUZ-TALONIA§ & M. SALCEDO*

*Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México; †Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, México; ‡Clínica de Displasias, Hospital de Gineco-obstetricia No. 4 IMSS, México; and §Centro Nacional de Clínica de Displasias, Hospital General de México, Secretaría de Salud, México, DF

Abstract. Piña-Sánchez P, Hernández-Hernández DM, López-Romero R, Vázquez-Ortiz G, Pérez-Plasencia C, Lizano-Soberón M, González-Sánchez JL, Cruz-Talonia F, Salcedo M. Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1041-1047.

Cervical cancer (CC) is the most common in Mexican female population. The human papillomavirus (HPV) 16 and 18 frequencies in worldwide may be different due to geographical distribution. We analyzed the prevalence of HPV types and determined their association in cervical lesion in a Mexican population. One hundred fifty-nine normal cervical smears, 95 low-grade squamous intraepithelial lesions (LGSIL), 59 high-grade squamous intraepithelial lesions (HGSIL), and 108 CC samples of the patients were collected. HPV types were determined by sequencing. We detected 11 high-risk types, four low-risk types, three not determined, and two probably high risk. HPV were present in 12%, 57%, 88%, and 92% from normal, LGSIL, HGSIL, and CC samples, respectively. HPV 16 was the most common in all cervical lesions (71.6% in CC). HPV 58 was present in 18.6% of HGSIL, and the HPV 18 in 4.6% of CC. The 76% of all detected viruses belong to A9 species branch. Control women showed high percentage of HPV high-risk infection, suggesting that this is a high-risk group. High frequency of HPV 16 compared with a low incidence of HPV 18 was observed. HPV 58 is frequently detected in HGSIL but low frequency is found in CC. These findings might be considered for HPV screening.

KEYWORDS: cervical cancer, HPV, Mexico.

Cervical cancer (CC) is the second most common cancer among women worldwide⁽¹⁾ and the most common in Mexican female cancer patients⁽²⁾, and there has been an increase in incidence and mortality rates during the past two decades⁽³⁾. Molecular evidences indicate that human papillomavirus (HPV) is the main etiologic factor for CC, showing a 99.7% of HPV presence^(1,4). At present, more than 100 HPV genotypes have been fully sequenced⁽⁵⁾.

Genital HPV types have been classified into low-risk group, which are mainly found in genital warts, and high-risk group, which are associated with high-grade squamous intraepithelial lesions (HGSIL) and invasive CC. A new epidemiologic classification indicates that in addition to HPV 16 and 18, the viral types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82 should be considered carcinogenic or high-risk types⁽⁶⁾. Several reports have described that some HPVs associated to similar pathologies are phylogenetically related⁽⁷⁻¹⁰⁾. According to the International Committee on the Taxonomy of Viruses, HPVs could be classified into several species or groups; the A9 species includes HPV 16, 31, 52, 35, 33, 58, and 67, while the HPVs 18, 45, 59, 39, and 68 belong to the A7 species; all these types are the most common in CC⁽¹⁰⁾.

Address correspondence and request reprint to: Dr Mauricio Salcedo, PhD, Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional S XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col Doctores, México, DF 06720, México. Email: maosal89@yahoo.com; pstricia_1307@yahoo.com.mx

Table 1. Frequency association of RF in cervical lesions

RF	Control ^a				LGSIL			HGSIL			CC		
	n ₀	n ₁	ORa	95% CI	n ₂	ORa	95% CI	n ₃	ORa	95% CI			
Age (years)													
<40	108	56	1.0		34	1.0		23	1.0				
≥40	51	39	1.0	0.6–1.8	25	0.9	0.4–1.8	83	4.1	2.0–8.3 ^b			
AFI													
≥18	112	63	1.0		30	1.0		47	1.0				
<18	47	32	1.4	0.8–2.6	29	3.0	1.4–6.5 ^b	61	4.0	2.1–8.2 ^b			
LTNP													
≤2	144	84	1.0		47	1.0		79	1.0				
>2	33	11	1.3	0.5–3.2	12	2.7	1.0–7.5 ^b	29	3.7	1.4–9.5 ^b			
PREG													
0–2	79	45	1.0		18	1.0		13	1.0				
2–4	65	27	0.6	0.3–1.1	21	1.0	0.4–2.4	20	1.0	0.4–2.4			
≥5	15	23	2.2	0.9–5.4	20	5.0	1.7–14.7 ^b	45	14.9	5.2–42.1			

RF, risk factors; AFI, age of first sexual intercourse; LTNP, lifetime number of partners; PREG, pregnancies; ORa, OR adjusted by HPV infection; n₀, control; numbers, n₁, n₂, n₃.

^aThe basal group was women with normal cytology (control).

^bStatistical significance.

women enrolled in this study was 39.9 years (range, 19–95 years). Oldest women presented highest risk for CC (OR = 4.1, 95% CI 2.8–8.3) compared with groups of younger women. First sexual intercourse before 18 years of age was statistically associated with HGSIL (OR = 3.0, 95% CI 1.4–6.5) and CC (OR = 4.0, 95% CI 2.1–8.2). Women with more than two sexual partners in their lifetime showed an association with HGSIL of OR = 2.7 and 95% CI, 1.0–7.5; the OR for CC was 3.7 (95% CI, 1.4–9.5). Association between positive history of more than five pregnancies and HGSIL was OR = 5.0 (95% CI 1.7–14.7) and with CC, OR = 14.9 (95% CI 5.2–42.1) compared with nulliparous women and women who had two pregnancies.

Prevalence and association between HPV types and cervical lesion types

According to Munoz *et al.*⁽⁶⁾, considering all cases, 20 different HPV types were detected: 11 were high-risk types (16, 31, 35, 52, 58, 33, 18, 45, 59, 39, and 56), 4 were low-risk types (70, 11, 6b, and CP8304), three had undetermined risk (67, 73, and 69), and two might be high-risk types (66 and 53). In general, HPV sequences were detected in 12%, 57%, 88%, and 92% in normal cervical samples, LGSIL, HGSIL, and CC samples, respectively. In normal samples, high-risk HPV (hrHPV) positive biopsies were present in 9.4% of patients (15/159), while 1.8% (3/159) was positive for low-risk HPV (lrHPV) and one had a nondetermined risk (HPV 53). With respect to LGSIL, we detected high-risk viral types in 50% of samples studied.

HPV 16 was the most frequently detected viral type in all cervical lesions (3.8%, 25.3%, 42.4%, and 72.2% in normal epithelium, LGSIL, HGSIL, and CC, respectively). The second most common viral type in LGSIL and HGSIL was HPV 58 with 5.3% and 18.6% prevalence, respectively, while in CC this was HPV 18 with 4.6% (Table 2).

Phylogenetic frequency of HPV types

To estimate frequency of phylogenetically related HPV types in cervical lesions, we used the phylogenetic classification according to International Committee on the Taxonomy of Viruses⁽¹⁰⁾. Samples were classified into A9 species (16, 31, 35, 52, 58, 33, and 67), A7 species (18, 45, 59, 70, and 39), A6 species (66, 53, and 56), and A10 species (6 and 11).

We determined that 75.8% (170/224) of all HPV-positive samples were from A9 species, 15.6% (35/224) were from A7 species, and 4.9% (11/224) were from A6 species. A9 HPVs were detected at 5.7% (9/159), 36.9% (35/95), 71.1% (42/59), and 77.77% (84/108) in normal cervical epithelium, LGSIL, HGSIL, and CC, respectively (Table 2).

According to complete sequence of HPV viral types, we subclassified and analyzed OR in cervical lesions. We determined OR from HPV subclassification and cervical lesion adjusted by age (Table 3). An increased trend was observed between the subgroup composed of HPV 16, 31, and 35 and cervical uterine degree of lesion, ie, OR = 16.5, 90, and 210 for LGSIL, HGSIL, and CC, respectively. The subgroup comprising HPV

Table 2. Prevalence of HPV viral types in Mexican women with cervical lesions

Sp	Type	EC	Normal, n (%)	LGSIL, n (%)	HGSIL, n (%)	CC, n (%)	Total, n	
A9	16	HR	6 (3.8)	24 (25.3)	25 (42.2)	78 (72.22)	133	
	31	HR	0 (0)	4 (4.2)	2 (3.4)	2 (1.9)	8	
	35	HR	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	1 (0.9)	2	
	52	HR	2 (1.3)	1 (1.1)	2 (3.4)	0 (0)	5	
	58	HR	1 (0.6)	5 (5.3)	11 (18.6)	2 (1.9)	19	
	33	HR	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)	1 (0.9)	2	
	67	ND	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)	1	
				9 (5.6)	35 (36.8)	42 (71.1)	84 (77.7)	170
	18	HR	1 (0.6)	4 (4.2)	4 (6.7)	5 (4.6)	14	
	45	HR	2 (1.3)	4 (4.2)	1 (1.7)	1 (0.9)	8	
A7	59	HR	3 (1.9)	2 (2.1)	0 (0)	2 (1.9)	7	
	70	LR	2 (1.3)	2 (2.1)	0 (0)	0 (0)	4	
	39	HR	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)	1 (0.9)	2	
			8 (5.0)	12 (12.6)	6 (10.16)	9 (6.5)	38	
	66	PHR	1 (0.6)	1 (1.1)	1 (1.7)	0 (0)	3	
A6	53	PHR	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.9)	2	
	56	HR	0 (0)	4 (4.2)	2 (3.4)	0 (0)	6	
A10	11	LR	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0 (0)	1	
A10	6b	LR	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2.8)	3	
A11	73	ND	1 (0.6)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)	2	
A5	69	ND	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.9)	1	
A3	CP8304	LR	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0 (0)	1	
Other			1 (0)	2 (2.1)	1 (0)	4 (0.9)	8	
Positive			19 (11.9)	54 (56.8)	52 (88.1)	99 (91.6)	224	
Total			159 (100)	95 (100)	59 (100)	108 (100)	421	

Sp, species; EC, epidemiologic classification; HR, high risk; LR, low risk; PHR, probably high risk; ND, not determined.

58, 33, 52, and 67 presented OR of 6.8 and 100 in LGSIL and HGSIL, respectively, while association with CC was 15.5. The subgroup comprising HPV 18, 45, and 59 presented OR of 5.7, 16.7, and 20.7 in LGSIL, HGSIL, and CC, respectively (Table 3).

Discussion

In addition to HPV infection, other environmental factors have been associated with CC development.

Age, parity, number of sexual partners, and number of pregnancies are some of the most frequent risk factors found reported in epidemiologic studies⁽²¹⁾. Consistent with other authors, age was found as an important risk factor for CC. Women >40 years of age must be considered a vulnerable group for developing CC. The International Agency for Research on Cancer multicenter study⁽²¹⁾ reported that women with at least seven full-term pregnancies had a three- to fivefold increased risk for development of CC compared with

Table 3. Association between HPV subgroup and cervical lesion degree

	Control ^a	LGSIL			HGSIL			CC		
	n	n	OR ^b	95% CI	n	OR ^b	95% CI	n	OR ^b	95% CI
Negative HPV ^c	140	41	1.0		7	1.0		9	1.0	
HPV 16, 31, and 35	6	29	16.5	(6.4–42.4) ^d	27	90.0	(28.0–288.7) ^d	81	210.0	(72.1–611.3) ^d
HPV 58, 33, 52, and 67	3	6	6.8	(1.6–28.5) ^d	15	100.0	(23.3–427.8) ^d	3	15.5	(2.7–88.3) ^d
HPV 18, 45, and 59	6	10	5.7	(1.9–16.6) ^d	5	16.7	(4.0–68.1) ^d	8	20.7	(5.9–72.7) ^d
HPV 56, 53, and 66	1	5	7.0	(0.9–150.3)	3	60.0	(5.5–652.9) ^d	2	31.1	(2.5–376.4) ^d
Others HPV ^c	3	4	—		2	—		5	—	
All positive HPV	19	54	9.7	(5.2–18.2) ^d	52	54.7	(21.7–1137.8) ^d	99	81.0	(35.2–186.6) ^d

^aThe basal group was women with normal cytology (control).

^bOR adjusted by age.

^cOther viral types: control subjects, HPV 66, 70, 73; LGSIL, HPV 11, CP8304 and 70; HGSIL, HPV 39 and 73; and CC, HPV 6b, 39, and 69.

^dStatistical significance.

nulliparous women. In this study, we found that women with more than five pregnancies had a 14-fold risk compared with women with two pregnancies or nulliparous women. Significant association between number of deliveries was reported in Mexican patients with HGSIL (OR = 7.2)⁽²²⁾. Differences observed in both studies with regard to association between deliveries and having HGSIL or CC can be explained by sample size and/or a possible selection bias. Our results suggest that pregnancy number is an important factor associated with CC lesions in Mexican female population.

In general, we detected 91.7% of HPV presence in CC; the presence is slightly lower than that in the Walboomer's report⁽⁴⁾. The 8.3% of cases that appear negative for presence of HPV DNA could be explained by disruption of PCR target sequence or by polymorphisms in target sequences, extremely low viral DNA copies, or extremely rare HPV types in this population; in addition, these samples might in fact be negative for viral sequences.

We observed that HPV prevalence in normal women was similar to that in the previous Mexican^(23,24) and worldwide reports⁽⁶⁾; in addition, this prevalence is similar in countries that present high incidence of CC, such as Costa Rica and Colombia⁽²⁵⁾. Detected prevalence in normal samples with hrHPV (9.4%) and lrHPV (1.8%) was similar to that in the previous reports from Mexico and Colombia^(24,25). In contrast, countries with low incidence of CC show 4.6% HPV infection in normal cervical epithelium, with 3% hrHPV and 1% lrHPV types⁽²⁶⁾. These results demonstrated a fourfold presence of hrHPV over lrHPV in samples studied (9.4% vs 1.8%); also, hrHPV presented threefold more presence in studied samples (9.4% vs 3%) than in countries with low incidence of CC. Mexican women with normal cervical epithelium and subclinical hrHPV infection could be candidates for future cervical lesion development. The high rate of CC in Mexico in comparison with other countries could be attributable to high prevalence of hrHPV types and a general lack of available and effective cytologic screening.

However, HPV incidence in Mexican population could be higher than that estimated in this report due to the possible existence of previous Papanicolaou smears in participating controls (a population with access to health services) and lack of access to health services by general population (low socioeconomic status) that might facilitate underestimation of HPV infection.

With respect to LGSIL, HPV infection was similar (56.8%) to a previous report in Latin America, and

the 50% HPV-positive samples were high-risk viral types⁽²⁷⁾. Thus, viral infection in cervical precursor lesions in Latin American population including Mexican population presents similar behavior.

Under the premise that HPV is a necessary cause of CC, we should expect that a high percentage of pre-neoplastic lesions contain HPV DNA. Therefore, the 43.2% HPV-negative LGSIL samples could be clear-ance HPV infection or related with other pathologic conditions⁽²⁸⁾.

HPV 58 prevalence in HGSIL is higher than HPV 18 prevalence (18.3% vs 6.7%, OR = 220.0 vs 80.0). Similar results were reported in Mexican patients with HGSIL from southern and northern Mexico^(29,30). In Colombian patients, HPV 31 and 58 infections are frequent in CC, while in normal cytology samples, HPV 58 infection is the second most frequently infection found in this country^(31,25). HPV 58 has been detected frequently among Latin American female sex workers in Spain, but HPV 58 has rarely been detected in Spanish population⁽³²⁾. In Chinese women with CC, HPV 58 type is frequently detected (17%)^(14,15,33), and Japanese studies also show that HPV 58 is the second most common viral type in CC⁽³⁴⁾. In our study, we detected high prevalence of HPV 58 (18.3%) in HGSIL; nevertheless, low frequency is found in CC (1.8%) and extremely low presence of this HPV type is found in normal subjects. It is probable that different HPV 58 variants could be present in HGSIL or CC, and another possibility is that genetic background might be favorable for development of a specific cervical lesion.

Our data showed the following: 1) HPV 58 infection might be common in Mexican population; 2) HPV 58 could present delimited geographic distribution; and 3) LGSIL and HGSIL HPV 58-infected women have low probability for progression to invasive lesions due to low presence in CC. This result could be considered a determinant for a prognostic factor in Mexican patients. We consider that additional studies should be performed to explain the probable differential biologic behavior between HPV 58 and HPV 16 in the progression of cervical lesions.

HPV 16 is the most frequent infection in CC worldwide and is followed by HPV 18; epidemiologic studies have shown differences in geographic distribution for other viral types⁽¹²⁾. Studies in Mexico have demonstrated differences in HPV 16 prevalence in CC ranging from 49% to 52%^(23,35,36). In the present work, 72.22% of CC samples were HPV 16 infected, and this significant difference might be explained by the sensitivity of the technology employed (more than two primer sets and DNA sequencing). In general, HPV

16 is the main viral type present in CC of Mexican patients. These results might be considered for earlier HPV screening in Mexican women and the subsequent clinical course, especially in women with equivocal Papanicolaou test result as atypical squamous cells of undetermined significance. Meijer *et al.*⁽¹⁶⁾ proposed screening for hrHPV in 35-year-old women to reduce presence of CC in developing countries. Due to the fact that the group of Mexican sexually active women presented LGSIL and HGSIL at a young age and that CC is the first cause of death in Mexican women, we suggest that screening for hrHPV, and mainly for HPV 16, in Mexican female population might be performed before the age of 35 years. Thus, detection and elimination of this viral type could lead to significant reduction in CC incidence in this population.

Worldwide reports include HPV 16 (OR = 150) and HPV 18 (OR = 182) for CC⁽¹³⁾, and in this study, we found OR of 202 and 77 for HPV 16 and HPV 18, respectively, in CC samples. These results suggest that risk for CC-associated HPV 16 infection in Mexican female population is higher than that in worldwide reports and lower than that in reports on concerning HPV 18 infection. In Mexico, the incidence of CC could be associated with HPV 16 and specific variants of this viral type⁽³⁶⁾.

Worldwide reports demonstrate 16.2% presence of HPV 18 in squamous CC⁽¹²⁾. In contrast, in our study, we detected low frequency of HPV 18 (4.6%), and this prevalence is comparable with other populations such as in Spain (3.7%) and Colombia (4.4%)⁽³⁶⁾. It is important to note that HPV 18 prevalence is low in Mexican population, and this datum suggests that this viral type distribution might vary depending on geographic region. Another possible explanation of low HPV 18 detection could be short-time progression and unfavorable survival rate of women infected with this viral type. Presence of HPV 6 in CC could be due to coinfection with another high-risk viral type, which was not detected for this method.

With respect to classification, HPVs belonging to the A9 species were the most common HPV viral types present in all cervical lesions (75%), while viral types 58, 33, 52, and 67 (subgroup A) were associated in mean with HGSIL and HPV 16, 31, and 35 (subgroup A9) were associated with CC (Table 3). These results suggest that viral types present in Mexican population are phylogenetically related and associated with a particular cervical lesion.

In summary, results of this study showed the following: 1) high sensitivity for viral DNA sequence determination using more than two primer sets; 2) hrHPV sequences detected in normal tissue samples

suggested that the studied population might present a potential risk for development of cervical lesions; and 3) the A9 species (represented by HPV 16 and 58) was commonly associated with a Mexican patient population that presents cervical lesions. These results could be considered for development of new tools for viral detection, prognosis, and HPV vaccine design.

Acknowledgments

This work was partially supported by grants from CONACyT (34686 and 7114) and FOFOI (Fondo de Fomento a la Investigación)-IMSS. During this work, P.P.-S. was recipient of fellowship from CONACyT and DGEF (Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM) and G.V.-O., R.L.-R., C.P.-P. were recipients of fellowships from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) and IMSS. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the DSc degree in for P.P.-S. at Doctorado En Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma De México.

References

- Bosch X, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res* 2002;89:183-90.
- Registro histopatológico de neoplasias en México. Compendio de Cáncer: Morbilidad-Mortalidad México, DF, México: Secretaría de Salud, 2001.
- Secretaría de Salud. Programa de Prevención de Cáncer Cervicouterino. 1998-2000. México: Secretaría de Salud, D.F. 1998.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- Munoz N, Bosch FX, de San José S *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
- De Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. In: zur Hausen H, ed. *Human papillomaviruses*. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 1994:1-12.
- Chan SY, Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hoffman B, Delius H. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 sub-types and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* 1992;66:5714-25.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM *et al.* Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170:1077-85.
- Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005; 32(Suppl 1):S1-6.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus type 5 in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;88:63-73.
- Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;19:1-5.
- Huang S, Alonina I, Miller BA, Beckmann AM. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer* 1997;70:408-11.

- 15 Wong YC, Cheung TH, Chan MK, Poon CS, Cheng TK. Prevalence and genotype of human papillomavirus in cervical carcinoma: a nationwide perspective in China. Proceedings of the 18th International papillomavirus Conference. Barcelona; Institut Català d'Oncologia; Abstract +084. 2000.
- 16 Meijer CJ, Snijders PJ, van den Brule AJ. Screening for cervical cancer: should we test for infection with high-risk HPV? *CMAJ* 2000;163:535-8.
- 17 Terris MK, Paol DM. Human papillomavirus detection by polymerase chain reaction in benign and malignant prostate tissue is dependent on the primer set utilized. *Urology* 1997;50:150-6.
- 18 Manos M, Ting Y, Wright D, Lewis A, Broker R, Wolinsky S. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In: Forth M, Groves M, eds. *Cancer Cell 77/molecular diagnostics of human cancer*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988:209-14.
- 19 De Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76:1057-62.
- 20 Norusis MJ. *SPSS/PC advanced statistics V12.0*. Chicago, IL, USA, SPSS Inc. (2003).
- 21 Castellsague X, Bosch FX, Manos N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002;89:191-9.
- 22 Hernandez-Herrandez DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jimenez M et al. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol* 2003;90:310-9.
- 23 Torroella-Kouri M, Monsberger S, Carrillo A et al. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998;70:113-20.
- 24 Lazzano Ponce E, Herrero R, Munoz N et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91:412-20.
- 25 Molano M, Posso H, Weiderpass E et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* 2002;87:324-33.
- 26 Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer* 2000;87:221-7.
- 27 Molano M, van den Brule AJ, Posso H et al. Low grade squamous intraepithelial lesions and human papillomavirus infection in Colombian women. *Br J Cancer* 2002;87:1417-21.
- 28 Al-Nafisi A, Rebello G, Al-Yusif R, McGoogan E. The borderline cervical smear: colposcopic and biopsy outcome. *J Clin Pathol* 2000;53:439-44.
- 29 Giuliano AR, Papenfuss M, Abrahamson M et al. Human papillomavirus infection at the United States-Mexico border: implications for cervical cancer prevention and control. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1129-36.
- 30 Gonzalez-Loza M del R, Rosado-Lopez I, Valdez-Gonzalez N, Puerto-Solis M. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *J Clin Virol* 2004;29:202-5.
- 31 Combita AL, Bravo MM, Touze A, Orozco O, Coursaget P. Serologic response to human oncogenic papillomavirus types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 virus-like particles in Colombian women with invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2002;97:796-803.
- 32 Touze A, de San Jose S, Coursaget P et al. Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31, and 38 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4344-8.
- 33 Liaw KL, Hsing AW, Schiffman MH et al. Human papillomavirus types 52 and 38 are prevalent in cervical cancer from Chinese women [Letter to the editor]. *Int J Cancer* 1997;73:775-6.
- 34 Matsukura T, Sugase M. Human papillomavirus genomes in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Virology* 2004;324:439-49.
- 35 Hernandez-Avila M, Lazzano-Ponce EC, Berumen-Campos J, Cruz-Valdez A, Alonso de Ruiz PP, Gonzalez-Lira G. Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-control study. *Arch Med Res* 1997;28:265-71.
- 36 Berumen J, Ordoñez RM, Lazzano E et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1325-30.

Accepted for publication June 30, 2005

ANEXO 2

Artículo aceptado en Medical Oncology, 2010.

**POLYMORPHISM IN EXON 4 OF *TP53* GENE ASSOCIATED TO HPV 16 AND 18
IN MEXICAN WOMEN WITH CERVICAL CANCER.**

Patricia Piña-Sánchez¹, Dulce María Hernández-Hernández², Lucia Taja-Chayeb⁴, Ricardo M. Cerda-Flores⁶, Ana Lilia Herrera-González¹, Carlos Rodea-Avila³, Teresa Apresa-García¹, Patricia Ostrosky-Wegman⁵, Guelaguetza Vázquez-Ortíz¹, Patricia Mendoza-Lorenzo¹, Alfonso Dueñas-González⁵, Mauricio Salcedo¹✉.

Laboratory of Genomic Oncology of Unit Medical Research in Oncology Disease¹, Epidemiology Division² and Radiotherapy Service³ Oncology Hospital Medical Center National 21th Century, IMSS Mexico D.F. 06720. Division of Research National Cancer Institute, México D.F. 14080⁴ Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Biomedical Research Institute, UNAM, D.F, Mexico⁵. Faculty of Nursing and Center of Research and Development of Health Sciences, UANL, Monterrey, Mexico 64720⁶.

Keywords: Cervical cancer, codon 72, polymorphisms, DHPLC, Mexican women, HPV.

✉ maosal89@yahoo.com AV. Cuauhtemoc 330 Colonia Doctores 06720 Delegación Cuauhtemoc, México D.F. (55) 56276900 ext 22706.

ABSTRACT

Background: Cervical cancer (CC) is the second most common cancer in Mexican women. Human Papillomavirus (HPV) infection is necessary but not sufficient for CC development. Furthermore, genetic factors as polymorphisms could be important susceptibility factors. Controversial results regarding *TP53* polymorphisms specifically in codon 72 of CC have been reported. In the present work, the exon 4 sequence of *TP53* gene in CC and healthy Mexican-mestizo women were analyzed.

Material and Methods: A group of 111 women with CC and 126 healthy women (control) were included. Peripheral blood cells for polymorphism analysis and cervical scrape for HPV detection were used. PCR of exon 4 of *TP53* were subjected to denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) analysis and sequencing. HPV detection was subjected to PCR and sequencing. The statistical analysis was carried out using the Arlequin software.

Results: Codon 72 Arg/Arg was the most common SNP detected, and Hardy-Weinberg analysis showed equilibrium in control and CC samples ($p>0.05$). Wild type sequence of *TP53* exon 4 was detected in 66% and 57% in control and CC samples, respectively. For codon 72 Arg/Arg, differences between control and CC women were found ($p=0.043$). An association between HPV 16/18 infection and 72 Arg/Arg in woman with CC was found ($p=0.026$). Haplotype GC (codon 36 and 72) was statistically significantly associated with CC ($p=0.011$). HPV 16 was the most common viral type.

Conclusion: Codon 72 Arg/Arg is the most common polymorphism in the Mexican population and could be associated to HPV16 and/or HPV18 infection in CC.

INTRODUCTION

Cervical cancer (CC) is the second type of cancer in Mexican females [1]. Molecular evidences point to the high risk human papillomavirus (HPV) as the main etiological factor for CC development, because up to 99.7% of CC samples present HPV DNA. However, HPV infection is not enough to develop CC [2]. Epidemiological studies have shown only a small fraction of infected women with oncogenic HPV types that eventually could progress to high-grade intraepithelial lesions (HSIL) or CC. Additional to HPV; other gynaecological risk factors are associated to CC development [3].

It has been demonstrated that polymorphisms such as Single Nucleotide Polymorphism (SNP), are important genetic factors involved in the risk of the development of complex diseases such as cancer [4].

SNP 72 Arg/Arg has been associated with a higher risk of developing CC [5]. In addition, *in vitro* studies have shown that HPV16 and 18 E6 oncoprotein are more effective at degrading p53 Arg72 than at degrading p53 Pro72 [6]; this is important because *TP53* inactivation by the E6 oncoprotein is one of the main events on cervical carcinogenesis.

At present, several epidemiological studies on polymorphisms have shown controversial results, probably due to ethnical differences, inadequate selection of cases and controls, technical sensitivity and inter-laboratory variations [7]. Makni *et al* [8] reported that after the exclusion of discordant *TP53* genotypes between laboratories, there was an increased association of the 72Arg/Arg genotype with CC, and suggested that the misclassification consequent to inter-laboratory variation may affect the ability to detect the association.

The specificity of the method used to detect changes in DNA sequence is critical. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) is a technique with high degree of sensitivity and specificity for the analysis of mutations and polymorphism, which allows screening for SNPs in a large number of samples in short time [9].

At present, the frequency of *TP53* polymorphisms is not known for the Mexican population, and the detection of polymorphism in *TP53* specifically codon 72 in

patients with CC has not are done. In the present work we studied the polymorphisms in exon 4 of *TP53* gene through DHPLC analysis in a group of Mexican-mestizo women affected by CC.

MATERIAL AND METHODS

Biological samples

All the samples were collected from the Oncology Hospital, CMN S XXI-IMSS in Mexico City. Total samples of 237 women were enrolled from the central region of Mexico and ethnically all of them were Mexican-mestizos. A sample of peripheral blood cells in EDTA (PBC) obtained for polymorphism analysis and another sample taken from endocervix using a rotary motion with a Cytobrush (Digene Cervical Sampler) for HPV detection were obtained from each woman. The samples were taken after informed consent along with a short questionnaire about gynaecological risk factors. Bioethics and research committees approved the present study. One hundred eleven women were diagnosed with cervical carcinomas; two different pathologists confirmed the histological analysis. All the patients with CC were treated with radiotherapy and/or brachytherapy at the hospital's Radiotherapy Service. Samples of 126 healthy women were enrolled with Papanicolaou and colposcopic negative studies.

DNA extraction

Isolation of genomic DNA from PBC and cytological scrapes were performed with the Wizard™ genomic DNA Purification kit (Promega, CA, USA). DNA was resolved in agarose gel electrophoresis and quantified by using a Nanodrop Spectrophotometer (Delaware, USA). All extracted DNAs were stored at 4° C.

PCR conditions

Each DNA specimen was screened for exon 4 of *TP53* gene using the primers reported by Gross *et al.* [10]. The sequences of the primers used were: exon 4 sense: 5'-acctggtcctctgactgctc-3' and antisense: 5'-gccaggcattgaagtctcat-3'. Briefly, PCR was performed in a final volume 50 µl amplifying 50-100 ng DNA, with 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 10pmol each primer, and 1U discoverase enzyme (Invitrogen, CA,

USA). Amplification was performed in a PCR Sprint Thermo Hybaid using the following conditions: 95°C for 4 min, 30 cycles of 95°C for 45 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and a final extension of 4 min at 72 °C. The PCR products were resolved in agarose-gel electrophoresis. HPV typing was done using specific primers for E6 HPV16 [11] and the general primers GP+5/GP+6 [12].

DHPLC assay

PCR product harbouring exon 4 sequence of *TP53* gene from each DNA PBC sample was mixed with equal quantity of a WT (taken as wild type sequence) amplicon, obtained from MCF-7 cell line as reference sequence. Both PCR products were then denatured at 95°C for 5 min, cooled down to 65°C with a temperature ramp of 1°C/min, and finally 1 min at 65°C. Five µl of each mix PCR were injected to a preheated C18 reversed-phase column in DHPLC Wave system (Transgenomic, Omaha, USA). The DNA samples were eluted at a flow rate 0.9 ml/min with acetonitrile gradient consisting of buffer A (0.1 M triethylammonium acetate, TEAA) and buffer B (0.1 M TEAA, 25% acetonitrile). Temperature selection for heteroduplex elution of variants of TP53 fragments was carried out according to the DNA melting software (<http://insertion.stanford.edu/cgi-bin/melt.pl>). Samples were additionally run at 1°C above and below the predicted temperatures to ensure the detection of all possible sequence variations.

DNA sequencing

Products with DHPLC heteroduplex patterns for exon 4 and primer GP+5/GP+6 positive were purified by isopropanol precipitation. Sequencing reaction was performed on ABI3100 genetic analyzer using BigDye Terminator kit v3.1 (ABI, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. For exon 4, the sequences obtained were compared with the reference *TP53* sequence (Genbank X54156). Meanwhile HPV sequences were compared in BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, NCBI GenBank) to determine the viral type.

Statistical analysis

The Hardy-Weinberg test equilibrium and the maximized algorithm of expectation for

haplotypes were calculated using Arlequin v3.01 software. The expectation-maximization algorithm was done to determine haplotype frequency assignment with *cis* configuration and unknown phase. To compare the polymorphic features of *TP53* exon 4 between control and CC women, an X^2 exact test and odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (IC) were estimated employing <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm> ($p < 0.05$). Kaplan-Meier survival analysis was done to observe clinical prognostic features in CC using SPSS V17.0.

RESULTS

DNA from 111 patients and 126 healthy women were included in the present study. The mean age was 43 years (SD=13.42) and 53.54 (SD=11.66) for control and cases respectively; the age range was 31 to 79 years. The clinical risk factors data are summarized in **Table 1**. Those that were statistically significant were: age of the patients, age of first sexual intercourse before 18 years, pregnancy number (≥ 7) and HPV infection. A 363 bp PCR amplicon (11984-12346 nt reference sequence GenBank X54156) was obtained for exon 4 of *TP53*, the correct amplification was verified in an agarose gel electrophoresis (**Figure 1A**). Overall, we found 56.8% WT sequences and 43.2% polymorphic sequences in CC patients, while in control samples the frequency was 66% and 34%, respectively (**Table 2**). Some samples presenting a chromatographic homoduplex pattern by DHPLC assay were sequenced; as expected, they showed a WT sequence, which contain the codon 72 homozygote for Arg. All the samples with heteroduplex patterns were sequenced and analysed. We found two main polymorphisms at exon 4: G>A at codon 36 (rs1800370) resulting in Pro>Pro; and G>C at codon 72 (rs1042522) resulting in Arg>Pro change. The codon 36 was polymorphic in 7% of control samples and 3.6% in CC. A distinctive chromatogram was observed for each genotype found: WT sequence (**Figure 1B**); heterozygote at codon 72 and homozygote (WT) in codon 36 (**Figure 1C**); heterozygote codon 36 and WT in codon 72 (**Figure 1D**), and finally double heterozygote at codons 36 and 72 (**Figure 1E**). In this study, the clinical features of CC patients regarding WT and polymorphic sequence did not show statistical differences. From CC patients harbouring HPV16 or HPV18 infection,

65.6% have WT sequence, the remaining 34.4% polymorphic sequence; meanwhile 38.2% and 61.8% CC patients with other viral types infection presented WT and polymorphic sequence respectively; these differences were statistically significant ($p=0.009$) (**Table 2**). Codon 72 Arg/Arg was the most common SNP detected, and Hardy-Weinberg analysis showed equilibrium in control and CC samples ($p>0.05$), and χ^2 test was statistically significant ($p=0.043$) (**Table 3**). The clinical features in CC for codon 72 did not show differences, only for HPV 16/18 regarding other viral types ($p= 0.026$) (**Table 3**). A statistically significant association between haplotype GC (codon 36 and 72; Pro/Pro) and CC ($p=0.011$) was found (**Table 4**).

Regarding survival rate, a slightly increased survival rate for Arg/Pro patients compared to Arg/Arg patients was found. In fact, the data indicated that median survival was higher for the Arg/Pro patients (26.05 months) than the homozygote cases (24.13 months), nevertheless, the statistical analysis did not show differences (data not shown).

Additional nucleotide changes in the sequence analyses were detected in 3.6% of CC samples. These changes were: two intronic mutations (at nucleotide 11993 and 12302), one missense mutation (Ser116Phe).

HPV was detected in 24.4% of control samples and 93% of CC samples. The most common viral type was HPV16 present in 10.6% of control samples and 53.3 % for CC; while HPV 18 was only detected in 7.6% for cases. Other viral types (52, 58, 31, and 45) were detected in 13.8% in control and 32.4% in CC samples.

DISCUSSION

One of the main oncogenic mechanisms to develop CC is the inactivation of *TP53* by the high-risk HPV/E6 oncoprotein. It has been demonstrated, that TP53 72Arg is more susceptible to degradation by E6 of high-risk HPV [6]. However, epidemiological reports are not conclusive to this respect. The meta-analyses performed by Jee [7], Sousa [13]. Koushik [14], and Klug [15] about the association of codon 72 and CC did not show a relationship between polymorphisms and CC risk. The authors agree that heterogeneity from studies, and ethnical, bias, and methodological errors could determine misinterpretation of data. These characteristics could be responsible for the great variability of the frequencies reported, even within the same population [16].

In this sense, Makni [8] demonstrated a great inter-laboratory variation, however after the exclusion of discordant genotypes an increasing association was found.

DHPLC is a highly sensitive technique that detects sequence variations. In the present work, the DHPLC technique was performed to detect changes in the sequence of the exon 4 of *TP53* gene in Mexican patients. To date, only one report without Hardy-Weinberg equilibrium has been reported in the Mexican population, [17, 15]. It is suggested that Arg/Arg genotype is related to increased risk for CC development [5]; however, in the present work this genotype was overrepresented in controls (73% vs. 27%) but not in the CC cases (59% vs. 41%). Our finding indicates that codon 72 Arg/Arg, is the most common genotype in our control population (Mexican-mestizo group). In contrast, haplotype GC for codon 36 and 72, (Pro/Pro) could represent a risk factor for CC development. However, in CC samples we found an association between HPV16 or 18 and Arg72Arg, while other viral types were present in presence of Pro allele supporting previous reports [18, 19, 20]. Some other reports refer a better prognosis of viral types different to HPV 16 and 18 (21-23) and the capacity to degradation of p53 by E6 of HPV 56, 58 and 88 is less than E6 of HPV18 (24).

These findings could suggest that Arg72Arg might be related to persistent HPV16 or 18 infection and probably to CC progression, and concomitant to efficient degradation by E6 [6]. In this sense, the survival analyses showed to be slightly better in heterozygous patients than in homozygote Arg patients, nevertheless, the analysis did not show significant statistical differences. For instance, in Head and Neck cancer patients harboring homozygosis for 72Arg, a worse response is also observed with mutation [26] which suggests potential implications of polymorphism in the *TP53* gene in the outcome of cancer patients. Thus, we hypothesized that a worse survival rate in CC patients could be related to Arg homozygote cases harboring HPV 16 or HPV18 infection. Further, E6 gene nucleotide variations could contribute to the efficient degradation of p53 [5, 6, 25]. A good approach to explore this possibility could be to analyse the survival rate in a group of patients with the same clinical stage and know *TP53* polymorphisms.

Regarding the age effect, Bojesen [27] reported recently an increased longevity for Arg72Pro carriers, suggesting a generally increased healthiness caused by a decreased apoptotic activity and increased cell cycling arrest abilities of the Pro vs. Arg version of *TP53*. Chemotherapy or radiotherapy affect p53 activity in CC cell lines [28], as well as codon 72 influence on the ability of certain conformational p53 mutants to form stable complexes with p73, inactivating the p73-dependent apoptosis, in this case cancer cells expressing the 72Arg allele had lower response rates than those expressing the 72Pro mutants [26].

To date, the role of the germinal mutations of the *TP53* gene in CC patients is poorly studied. The IARC database R14 (<http://www-p53.iarc.fr/Mutations.html>) have reported seven germinal mutations in coding region, one of them related to Li Fraumeni Syndrome into exon 4, while another four mutations, non-related to this syndrome contained in other exons. Varley [29] (2001) characterized some germinal mutations of *TP53* and proposed that mutations affecting the splice sites are underrepresented. In the present study two germ line changes in intron region and one in exon region studied (11984-12346 nt) were found. It should be interesting to analyse the germinal mutations in relation with the presence of SNPs, treatment response and survival.

Using a good screening approach that detects any variation of the DNA with high sensibility, we were able to identify additional polymorphisms and mutations, some of them previously reported and other unknown. One of them was the synonymous change for codon 36. This SNP (rs1800370) was only found in <10% of the samples, representing little relevance for this disease. Our results support previous reports about genotype in healthy population [30-34].

Finally, it is difficult to prove the significance of only one SNP as a risk factor in complex diseases such as CC; however, our data suggest that probably the persistent HPV infection with HPV16 or 18 could be related to Arg72 homozygote in CC patients, and additional to increase number of pregnancies could be a risk factors to develop of CC in Mexican population.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CONACyT 7114, and partially by SALUD-2006-COI-44633. During this work, P. Piña-Sánchez was recipient of fellowship from CONACyT and DGEP (Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM). This work was submitted in partial fulfilment of the requirements for the DSc degree in for P. Piña-Sánchez at Doctorado En Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma De Mexico. We are grateful to Psicofarma S.A. de C.V. for DHPLC equipment facilities.

REFERENCES

- 1) <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf>
- 2) Walboomers JM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189:12-9.
- 3) Castellsague X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89:191.
- 4) Kirk B, Feinsod M, Favis R, Kliman RM, Barany F. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:3295-3311.
- 5) Storey A, *et al.* Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393:229-34.
- 6) Thomas M, *et al.* Two Polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999; 19:1092-1100.
- 7) Jee SH *et al.* Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; 85 301-308.
- 8) Makni H, *et al.* P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 2000; 87:528-33.
- 9) Cohen V, *et al.* Evaluation of denaturing high-performance liquid chromatography as a rapid detection method for identification of epidermal growth factor receptor mutations in nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2006; 107:2858-65.
- 10) Gross E, Kiechle M, Arnold N. Mutation analysis of p53 in ovarian tumors by DHPLC. *J Biochem Biophys Methods* 2001; 47:73-81.
- 11) Terris MK, Peehl DM. Human papillomavirus detection by polymerase chain reaction in benign and malignant prostate tissue is dependent on the primer set utilized. *Urology* 1997; 50:150-6.
- 12) Manos M, *et al.* Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In: Forth M, Greaves M, eds. *Cancer Cell 7^o molecular diagnostics of human cancer*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988. pp209–14.
- 13) Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a

- key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med* 2007; 20:731-41.
- 14) Koushik A, Platt RW, Franco EL: p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:11-22.
 - 15) Klug SJ, *et al.* TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *Lancet Oncol* 2009; 10:772-84.
 - 16) Zheng XZ, *et al.* Ethnicity determines association of p53Arg72Pro alleles with cervical cancer in China. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17:460-6.
 - 17) Suarez-Rincon AE, Moran-Moguel MC, Montoya-Fuentes H, Gallegos MP, Sánchez-Corona JL. Polymorphism in codon 72 of the p53 gene and cervico-uterine cancer risk in Mexico. *Ginecol Obstet Mex* 2002; 70:344-48.
 - 18) Min-Min H, Ming-Rong X, Ze-yi C, Kai-xuan Y, Zhi-lin S. Analysis of p53 codon 72 polymorphism and its association with human papillomavirus 16 and 18 E6 in Chinese cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:2004-8.
 - 19) Saranath D, *et al.* HPV16/18 prevalence in cervical lesions/cancers and p53 genotypes in cervical cancer patients from India. *Gynecol Oncol* 2002; 86:157-62.
 - 20) Brenna SM, *et al.* Prognostic value of P53 codon 72 polymorphism in invasive cervical cancer in Brazil. *Gynecol Oncol*, 2004 ;93(2):374-8.
 - 21) Schwartz SM, *et al.* Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. *J Clin Oncol*. 2001; 19:1906-15.
 - 22) Huang LW, Chao SL, Hwang JL. Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer*. 2004;100:327-34.
 - 23) Shah W, *et al.* The prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese patients with cervical carcinoma and its influence on survival. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2009; 21:768-74
 - 24) Hiller T, Poppelreuther S, Stubenrauch F, Iftner T. Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1262-7.
 - 25) van Duin M, *et al.* Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000; 81:317-25.
 - 26) Bergamaschi D, *et al.* p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003; 3:387-402.
 - 27) Bojesen SE, Nordestgaard BG. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle* 2008; 7:158-63.
 - 28) Koivusalo R, Hietanen S. The cytotoxicity of chemotherapy drugs varies in cervical cancer cells depending on the p53 status. *Cancer Biol Ther* 2004; 3:1177-83.
 - 29) Varley JM, *et al.* Characterization of germline TP53 splicing mutations and their genetic and functional analysis. *Oncogene* 2001; 20:2647-54.
 - 30) Tenti P, *et al.* p53 codon 72 polymorphism does not affect the risk of cervical cancer in patients from northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:435-438.

- 31) Rosenthal AN, *et al.* p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet* 1998; 352: 871-872.
- 32) Tong D, *et al.* Detection of p53 polymorphism at codon 72 by PCR and allele-specific oligonucleotide hybridization on microtiter plates. *Clin Chem* 2000; 46: 124-126.
- 33) Klug SJ, *et al.* TP53 Polymorphism, HPV Infection, and Risk of Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1009 -1012.
- 34) Fernandes TA, Lima GL, De Souza FC, Fernandez JV, Meissner RV. Evaluation of the polymorphisms in the exons 2 to 4 of the TP53 in cervical carcinoma patients from a Brazilian population. *Mol Biol* 2008; 54 Suppl:OL1025-31.

TABLE 1. Clinical characteristics of gynecological cancer patients and controls

VARIABLE	CC		CONTROL		p
	N	(%)	n	(%)	
AGE					
< 50	47	(42.3)	78	(61.9)	0.003*
≥ 50	64	(57.7)	48	(38.1)	
AFI					
< 18	59	(53.2)	45	(35.7)	0.007*
≥ 18	52	(46.8)	81	(64.3)	
LTNP					
0-1	61	(55.0)	78	(61.9)	0.278
≥ 2	50	(45.0)	48	(38.1)	
PREGNANCIES					
0-2	15	(13.5)	49	(38.9)	0.000*
3-6	50	(45.0)	57	(45.2)	
≥ 7	46	(41.4)	20	(15.9)	
TOBACCO					
YES	36	(34.0)	32	(26.2)	0.203
NO	70	(66.0)	90	(73.8)	
ORAL CONTRACEPTIVES					
YES	32	(30.5)	21	(27.3)	0.382
NO	73	(69.5)	56	(72.7)	
HPV					
HPV 16	56	(53.3)	13	(10.6)	0.000*
HPV18	8	(7.6)	0	(0)	
OTHER	34	(32.4)	17	(13.8)	
NEGATIVE	7	(6.7)	93	(75.6)	
IS	6	-	3	-	
STAGE (FIGO)					
IB	8	(7.2)	-	-	
IIA	3	(2.7)	-	-	
IIB	58	(52.3)	-	-	
IIIB	38	(34.2)	-	-	
IVA	3	(2.7)	-	-	
IVB	1	(0.9)	-	-	
HISTOLOGY					
Squamous	87	(82.1)	-	-	
Adenocarcinoma	14	(13.2)	-	-	
Ademosquamous	5	(4.7)	-	-	
Not informed	5	-	-	-	
THERAPY					
Radiotherapy & BCT	94	(89.5)	-	-	
Radiotherapy and CT	12	(11.4)	-	-	
Not informed	5	-	-	-	

AFI:age of first sexual intercourse; LTNP: lifetime number of partners; PREG:

pregnancies; BCT: brachytherapy; CT: chemotherapy; IS: inadequate sample.
*Statistical significant.

TABLE 2. Frequency of wild type and polymorphic TP53 sequences and clinical features from cervical cancer patients.

	N	WT ¹	(%)	POLYM (%)	p
CONTROL	126	83	(65.9)	43 (34.1)	0.114
CASES	111	63	(56.8)	48 (43.2)	
FIGO STAGING					
IB-IIA	11	7	(63.6)	4 (36.4)	0.172
IIB-IIIB	96	52	(54.2)	44 (45.8)	0.420 ³
IVA-IVB	4	4	(100)	0	
VIRAL TYPE					
16	56	36	(64.3)	20 (35.7)	
18	8	6	(75.0)	2 (25.0)	
OTHER	34	13	(38.2)	21 (61.8)	0.135 ³
NEGATIVE	7	4	(57.1)	3 (42.9)	
IS	6	4	-	2 -	
HPV 16 AND 18 ²	64	42	(65.6)	22 (34.4)	0.009*
OTHER	34	13	(38.2)	21 (61.8)	
STATUS					
LIVE	69	39	(56.5)	30 (43.5)	0.554
DEATH	42	24	(57.1)	18 (42.9)	
AGE					
<50	47	27	(57.4)	20 (42.6)	0.90
>=50	64	36	(56.3)	28 (43.8)	

¹WT sequence correspond to codon 72 Arg/Arg. ²HPV 18 and 16 vs. other viral types. IS inadequate sample. *Statistical significant. ³Yates' correction.

TABLE 3. Polymorphism at codon 72 and clinical features in cases and controls

	N	ARG/ARG (%)	ARG/PRO (%)	PRO/PRO (%)	p
CONTROL	126	92 (73.0)	30 (23.8)	4 (3.2)	0.043*
CASES	111	66 (59.5)	35 (31.5)	10 (9.0)	
CONTROL HPV					
16	13	11 (84.6)	2 (15.4)	0	0.955 ²
18	0	0	0 (0)	0	
OTHERS	17	14 (82.4)	3 (17.6)	0	
NEGATIVE	93	65 (69.9)	24 (25.8)	4 (4.3)	
IS	3	2 -	1 -	0 -	
CONTROL HPV					
16/18	13	11 (84.6)	2 (15.4)	0	0.109
OTHER	17	14 (82.4)	3 (17.6)	0	
CASES HPV					
16	56	37 (66.1)	14 (25.0)	5 (8.9)	0.727 ²
18	8	6 (75.0)	2 (25.0)	0	
OTHERS	34	15 (44.1)	15 (44.1)	4 (11.8)	
NEGATIVE	7	4 (57.1)	3 (42.9)	0	
IS	6	4 -	4 -	1 -	
CASES					
HPV 16/18 ¹	64	43 (67.2)	16 (25.0)	5 (7.8)	0.026 ^{3*}
OTHER	34	15 (44.1)	15 (44.1)	4 (11.8)	
FIGO STAGING					
IB-IIA	11	8 (72.7)	1 (9.1)	2 (18.2)	0.553 ²
IIB-IIIB	96	54 (56.3)	34 (35.4)	8 (8.3)	
IIIA-IVB	4	4 (100)	0	0	
STATUS					
LIVE	69	41 (59.4)	22 (31.9)	6 (8.7)	0.987
DEATH	42	25 (59.5)	13 (31.0)	4 (9.5)	
AGE					
<50	47	28 (59.6)	16 (34.0)	3 (6.4)	0.675
>=50	64	38 (59.4)	19 (29.7)	7 (10.9)	

¹ HPV 18 and 16 vs. other viral types in CC. IS inadequate sample * Statistically significant. ²Yates' correction. ³ Arg/Arg v.s. Arg/Pro and Pro/Pro.

TABLE 4. Odds ratio for haplotypes codon 36 and 72 of *TP53*.

Haplotype	CASES	CONTROLS	χ^2	p	OR
GG	163	205	3.826	0.050	0.633(0.401-1.000)
AG	4	9	0.802	0.371	0.495(0.126-1.789)
GC	55	38	6.434	0.011*	1.855 (1.142-3.017)

*Statistically significant.

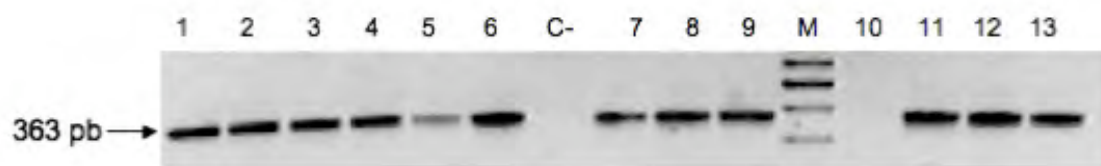


Figure 1. PCR amplification of exon 4 resolved in an agarose gel stained with ethidium bromide, showing a 363 pb product.

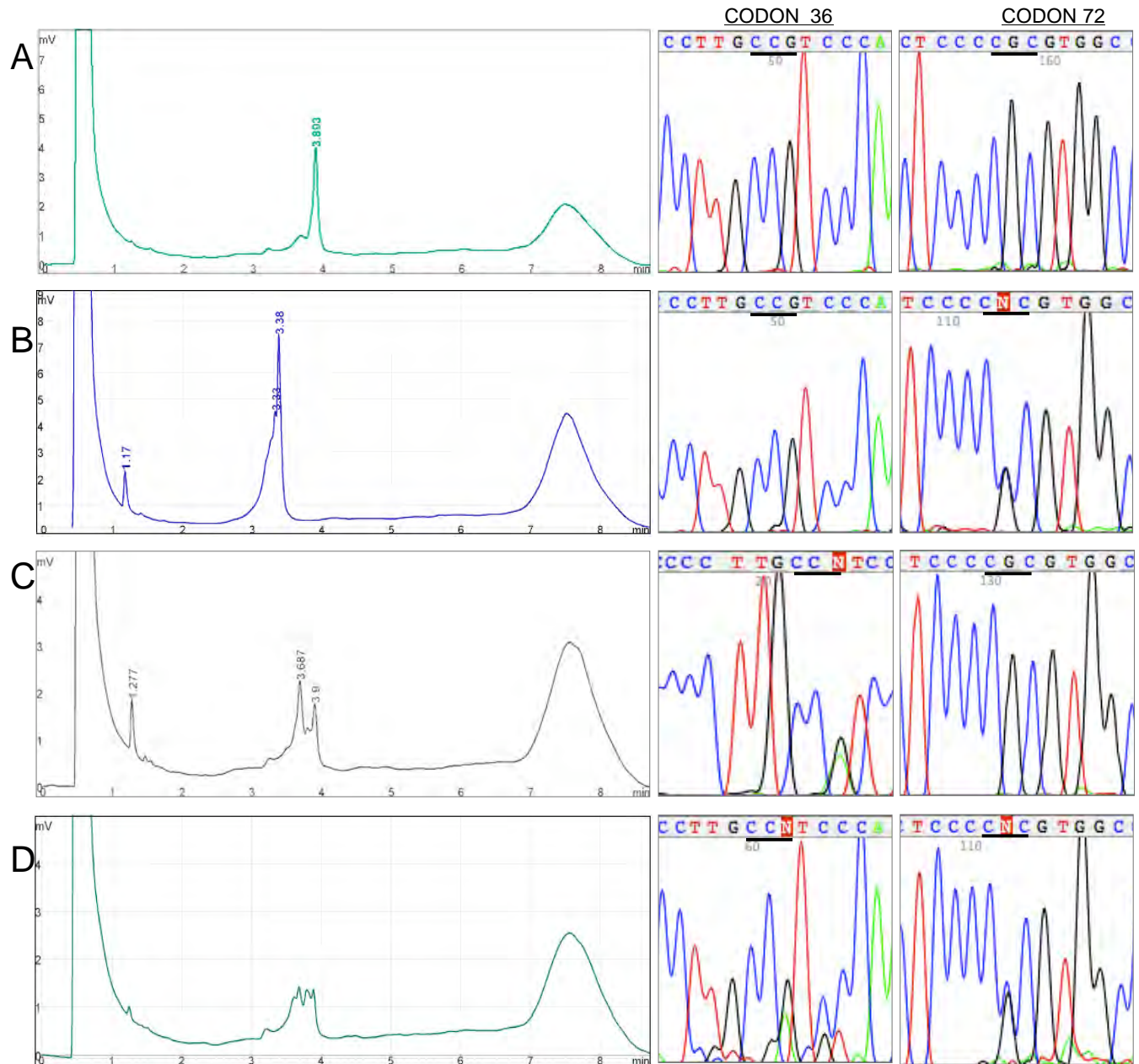


Figure 2. DHPLC profile patterns and sequence of exon 4 of *TP53* suppressor gene in CC patients. A) DHPLC chromatogram corresponding to WT sample, Arg/Arg; B) sample heterozygote in codon 72 Arg/Pro and WT in codon 36; C) heterozygote in codon 36 and WT in codon 72; and finally D) double heterozygotes. The profiles of the polymorphism show extra peaks or a “shoulder” and are easily distinguished from WT profiles which show a single peak.