

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Identificación de mutaciones en la región D-loop del  
DNA mitocondrial en lesiones del cérvix**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A**

**QFB. VANESSA VILLEGAS RUÍZ**

**Director:  
Dr. Mauricio Salcedo Vargas**

**MÉXICO, D.F**

**JUNIO, 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme las herramientas para ampliar mi capacidad académica en beneficio de mi formación de estudiante de posgrado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por seguir siendo mi casa de estudio y sentir el orgullo de ser de sangre azul y piel dorada.

A CONACYT por el apoyo económico recibido durante el tiempo de estudiante de maestría.

A los integrantes del Comité tutorial por sus valiosos comentarios para el satisfactorio trabajo del proyecto de investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al todos los integrantes del Laboratorio de Oncología Genómica de la UIMEO de CMNS-XXI que en cada momento me han brindado su ayuda para crecer como persona y como estudiante de posgrado. Gracias por ser mis compañeros de trabajo y también mis amigos. Gracias.

Al Dr. Mauricio Salcedo por abrirme las puertas y ser parte de su laboratorio, confiar en mi y por sus enseñanzas otorgadas. Gracias.

A la Dra. Paty Piña y la Dra. Lucy Taja por su apoyo en la realización de este proyecto. Gracias.

A mis verdaderos amigos con los que he compartido momentos felices, difíciles y por su apoyo incondicional. Gracias.

A mi familia por ser mi columna vertebral de la que he crecido como ser humano, por su apoyo lo largo de toda a la vida y sobrevivir a las tormentas. Gracias.

<b>ÍNDICE</b>	<i>Pág.</i>
<i>INDÍCE DE FIGURAS</i> .....	I
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i> .....	I
<i>ABREVIATURAS</i> .....	II
<i>RESUMEN</i> .....	V
<i>ABSTRACT</i> .....	VI
<b><i>I. INTRODUCCIÓN</i></b> .....	<b>1</b>
<i>I.1. La mitocondria</i> .....	1
<i>I.1.1. Estructura y componentes principales</i> .....	1
<i>I.1.2. Fosforilación oxidativa y apoptosis</i> .....	2
<i>I.2. DNA mitocondrial y genética mitocondrial</i> .....	3
<i>I.2.1. Genoma mitocondrial</i> .....	3
<i>I.2.2. Replicación mitocondrial</i> .....	6
<i>I.2.3. Transcripción mitocondrial</i> .....	6
<i>I.2.4. Herencia materna</i> .....	8
<i>I.2.5. Heteroplasmia y homoplasmia</i> .....	8
<i>I.3. Alteraciones del DNA mitocondrial y el cáncer</i> .....	9
<i>I.3.1. Factores de daño</i> .....	9
<i>I.3.2. Mutaciones en el DNAm</i> .....	9
<i>I.4. Cáncer cervicouterino</i> .....	12
<b><i>II. JUSTIFICACIÓN</i></b> .....	<b>15</b>
<b><i>III. HIPÓTESIS</i></b> .....	<b>15</b>
<b><i>IV. OBJETIVOS</i></b> .....	<b>16</b>
<i>IV.1. Objetivo general</i> .....	16
<i>IV.2. Objetivos particulares</i> .....	16
<b><i>V. MATERIALES Y MÉTODOS</i></b> .....	<b>17</b>
<i>V.1. Adquisición de muestras</i> .....	18
<i>V.2. Preparación de muestras</i> .....	18
<i>V.3. Identificación de la lesión</i> .....	19
<i>V.4. Extracción de DNA</i> .....	19
<i>V.5. Detección de HPV 16</i> .....	20
<i>V.6. Estandarización de PCR para amplificados mitocondriales</i> .....	20
<i>V.7. Purificación de productos mitocondriales de PCR</i> .....	21

V.8. Secuenciación.....	22
V.9. Construcción de Base de datos de DNA mitocondrial.....	22
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	24
VI.1. Adquisición/Preparación/identificación de lesión de muestras.....	24
VI. 2. Extracción de DNA.....	25
VI.3. Detección de HPV 16.....	25
VI.4. Amplificación de la región HVS-I y HVS-II .....	26
VI.5. Secuenciación de la región HVS-I y HVS-II del DNAm.....	27
VI.6. Construcción de base de datos del DNAm.....	44
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	54
<b>IX. REFERENCIAS</b> .....	55
<b>X. ANEXO</b> .....	63
X.1. Reactivos y equipo.....	63
X.2. Preparación de soluciones.....	65
X.3. Lista de secuencias de iniciadores.....	66
X.4. Tablas de cambios nucleotídicos en el DNAm en mujeres mexicanas.....	67
X.5. Tablas de cambios nucleotídicos en el DNAm en líneas celulares de CaCu..	75
X.6. Análisis estadístico de los cambios nucleotídicos del DNAm.....	76
X.7. Agrupación de Haplotipos del DNAm.....	77
X.8. Asociación estadística de la infección de HPV y haplotipos mitocondriales	79

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
<i>Figura 1. Representación esquemática de la mitocondria y los componentes de la cadena de transporte de electrones.....</i>	2
<i>Figura 2. Esquema de la distribución de los genes del DNAm.....</i>	4
<i>Figura 3. Esquema de la región control del DNAm.....</i>	5
<i>Figura 4. Esquema de la replicación del DNAm.....</i>	7
<i>Figura 5. Esquema del DNA linearizado.....</i>	10
<i>Figura 6. Alteraciones que puede tener el DNAm en una célula normal.....</i>	11
<i>Figura 7. Mutaciones en la región D-loop del DNAm en diferentes tipos de cáncer.....</i>	12
<i>Figura 8. Incidencia de Cáncer de Cérvix a nivel mundial.....</i>	13
<i>Figura 9. Muestra histológica de cáncer invasor de cérvix.....</i>	24
<i>Figura 10. Electroferesis de DNAs de muestras de pacientes con CaCu.....</i>	25
<i>Figura 11. Electroforesis del amplificado de PCR de HPV 16.....</i>	25
<i>Figura 12. Electroforesis del amplificado de PCR de la HVS-I del DNAm.....</i>	26
<i>Figura 13. Electroforesis del amplificado de PCR de la HVS-II del DNAm.....</i>	26
<i>Figura 14. Electroferogramas parciales de la secuenciación de la región HVS-II del DNAm.....</i>	29
<i>Figura 15. Gráfica de frecuencia de cambios nucleotídicos de la región HVS-II en mujeres sanas y pacientes con CaCu con respecto a la rCRS.....</i>	32
<i>Figura 16. Agrupación de cambios nucleotídicos en HVS-II de pacientes con CaCu.....</i>	32
<i>Figura 17. Agrupación de cambios nucleotídicos en HVS-II de la secuencia consenso y tejido tumoral.....</i>	33
<i>Figura 18. Gráfica de frecuencias de cambios nucleotídicos de HVS-II presentes en tejido de cérvix con lesión invasora respecto a la secuencia consenso.....</i>	33
<i>Figura 19. Electroferogramas parciales de la secuenciación de la región HVS-I del DNAm.....</i>	36
<i>Figura 20. Gráfica de frecuencias de cambios nucleotídicos de la región HVS-I en mujeres sanas y pacientes con CaCu con respecto a la rCRS.....</i>	37
<i>Figura 21. Agrupación de cambios nucleotídicos en HVS-I y HVS-II de pacientes con CaCu.....</i>	39
<i>Figura 22. Agrupación de cambios nucleotídicos en HVS-I de la secuencia consenso y tejido tumoral.....</i>	39
<i>Figura 23. Gráfica de frecuencias de cambios nucleotídicos presentes en tejidos de cérvix con lesión invasora respecto a la secuencia consenso.....</i>	40
<i>Figura 24. Porcentaje de cambios nucleotídicos detectados por tres métodos bioinformáticas.....</i>	45

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<i>Pág.</i>
<i>Tabla 1. Cambios nucleotídicos de la región HVS-II en pacientes con CaCu.....</i>	28
<i>Tabla 2. Cambios nucleotídicos de la región HVS-II en el DNAm.....</i>	29
<i>Tabla 3. Secuencia de la región HVS-II.....</i>	31
<i>Tabla 4. Cambios nucleotídicos de la región HVS-I en pacientes con CaCu.....</i>	34
<i>Tabla 5. Cambios nucleotídicos de la región HVS-I en el DNAm.....</i>	35
<i>Tabla 6. Secuencias de la región HVS-I.....</i>	38
<i>Tabla 7. Presencia de infección de HPV y haplotipos mitocondriales en pacientes con CaCu.....</i>	41
<i>Tabla 8. Asociación de haplotipos de la región HVS-II e infección por HPV.....</i>	42
<i>Tabla 9. Asociación de haplotipos de la región HVS-I e infección por HPV.....</i>	42
<i>Tabla 10. Características clínicas de las pacientes en el estudio.....</i>	43

## **ABREVIATURAS**

**ANT:** Translocador de nucleósido de adenina

**Apaf-1:** Factor 1 de activación de proteínas apoptóticas

**ATPasa6 :** ATP sintetasa 6

**ATPasa8:** ATP sintetasa 8

**CaCu:** Cáncer cérvico uterino

**CEO:** Citología exfoliativa oral

**CO:** Citocromo oxidasa

**CoQ:** Coenzima Q

**CSB I:** Bloque de secuencia conservada I

**CSB II:** Bloque de secuencia conservada II

**CSB III:** Bloque de secuencia conservada III

**Cyt b:** Citocromo b

**Cyt c:** Citocromo c

**D-loop:** Displacement loop

**DHPLC:** Cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento

**DNA<sub>n</sub>:** DNA nuclear

**DNA<sub>mt</sub>:** DNA mitocondrial

**DNA<sub>pol</sub>  $\gamma$  mt:** DNA polimerasa  $\gamma$  mitocondrial

**DNTPs:** Nucleósidos triposfato y monofosfato

**EIM:** Espacio intermembranal mitocondrial

**Hete:** Heteroplasmia

**Homo:** Homoplasmia

**HPV:** Virus del Papiloma Humano

**HVS-I:** Región hipervariable I

**HVS-II:** Región hipervariable II

**HVS-III:** Región hipervariable III

**IAP's:** Proteínas inhibidoras de apoptosis

**mTERF:** Proteína de terminación de la transcripción mitocondrial

**Tfam:** Factor A de transcripción mitocondrial

**MM:** Matriz Mitocondrial

**MME:** Membrana Mitocondrial Externa

**MMI:** Membrana Mitocondrial Interna

**mtMSI:** Microsatélite de inestabilidad mitocondrial

**ND:** NADH deshidrogenasa

**O<sub>H</sub>:** Origen de replicación de la cadena H

**O<sub>L</sub>:** Origen de replicación de la cadena L

**P<sub>H</sub>:** Promotor de la cadena H

**P<sub>L</sub>:** Promotor de la cadena L

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PT:** Poro de transición de permeabilidad

**RM:** Razón de momios

**RNAr:** RNA ribosomal

**RNAt:** RNA transferencia

**ROS:** Especies oxidantes reactivas

**Taq pol :** Polimerasa termus aquaticus

**TAS:** Secuencia de asociación de terminación

**VDAC:** Canales aniónicos dependientes de voltaje

## RESUMEN

El Cáncer de Cérvix (CaCu) es la segunda causa de muerte en mujeres por cáncer ginecológico en México. Existen diferentes factores asociados a esta neoplasia como la infección de HPV de alto riesgo, sin embargo no es suficiente para el desarrollo del carcinoma, por lo que es de gran importancia identificar otros factores involucrados en el desarrollo de esta neoplasia. Se ha demostrado en diferentes tipos de cáncer alteraciones como mutaciones y polimorfismos en la región D-loop del DNAMt, región control en la que se inicia la replicación y transcripción, abriendo las puertas a la búsqueda de nuevos marcadores en esta neoplasia. En este estudio se analizaron 25 tejidos tumorales y citologías exfoliativas orales (CEOs) de pacientes con CaCu y 10 muestras de linfocitos y CEOs de mujeres sanas. El DNA de las muestras fue sujeta a PCR con dos juegos de iniciadores para amplificar una región de HVS-I y otros para la región HVS-II y posteriormente se secuenciaron. Se estableció la secuencia consenso de DNAMt de la HVS-I y HVS-II a partir de las secuencias de mujeres sanas. Se identificó que la región HVS-II es más polimórfica que la región HVS-I, en ambas regiones domina la condición de homoplasma y todas las pacientes con CaCu presentaron cambios nucleotídicos, en promedio  $5.6 \pm 1.65$  cambios/paciente. En la región HVS-II se observó que el 60% de los cambios encontrados fueron polimorfismos anotados, de los cuales G499A fue estadísticamente significativo en el tejido tumoral. El 40% restante fueron polimorfismos nuevos y mutaciones no reportadas. En la región HVS-I se identificó que el más del 78% de los cambios nucleotídicos fueron polimorfismos ya reportados, presentándose en su mayoría en el tracto homopolimérico C de la posición 16 183-16 193, donde la sustitución T16 189C fue el cambio más frecuente en las pacientes con CaCu que en las sanas y que además, el cambio A16 182C y A16 183C solo se presentaron en las pacientes con CaCu. Por otro lado, no se encontró relación entre los cambios nucleotídicos presentes en las regiones hipervariables del D-loop con la infección HPV. De esta manera, en las pacientes con CaCu, las mutaciones en las zonas HVS-I y HVS-II de la región D-loop del DNAMt son un evento poco frecuente.

## ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the second most common female cancer in Mexican women. There are different etiologic factors associated to this neoplasia and one of the most important is the Human Papillomavirus (HPV). However, this is not enough for the development of cervical carcinoma. Several studies have showed molecular alterations as mutations and polymorphisms in mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop region in a variety of human tumors. This region is the replication and transcription sites of mtDNA. In the present study 10 tumor tissues and oral exfoliative scraps (OES) of women with CC, and 10 sample of lymphocytes and OES of healthy women were analyzed. DNAs were subjected to amplifications in two regions, HVS-I and HVS-II using two set of primers and then they were sequenced. Consensus sequence was established by sequences of healthy women. HVS-II region was the most polymorphic region. Both regions had high frequency of homoplasmic pattern and all patients with CC had nucleotides changes in an average  $5.6 \pm 1.65$  changes/patient. HVS-I presented in 60% polymorphisms already published as the G499A statistically significant in CC tumoral tissues. HVS-I presented 78% of polymorphisms located at homopolimeric C tract from 16 183 to 16 193. The T16 189C polymorphism was highly frequent in CC patient and also in healthy women. The change A16 182C and A16 183C was only observed in CC patients. On the other hand, we did not observed any correlation between mtDNA change in nucleotides and HPV infection. Finally, mutations in HVS-I and HVS-II regions are a rare event in CC.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1. La mitocondria**

### **I.1.1. Estructura y componentes principales**

La mitocondria desde hace más de cuatro décadas ha capturado la atención de los investigadores cuando fue descubierta en los años 60's y fue el despunte que permitió conocer su estructura, contenido genético y modo de expresión. Esto ha abierto las puertas a la investigación sobre la mitocondria en diferentes áreas como biología evolutiva, forense, medicina molecular, etc [1,2].

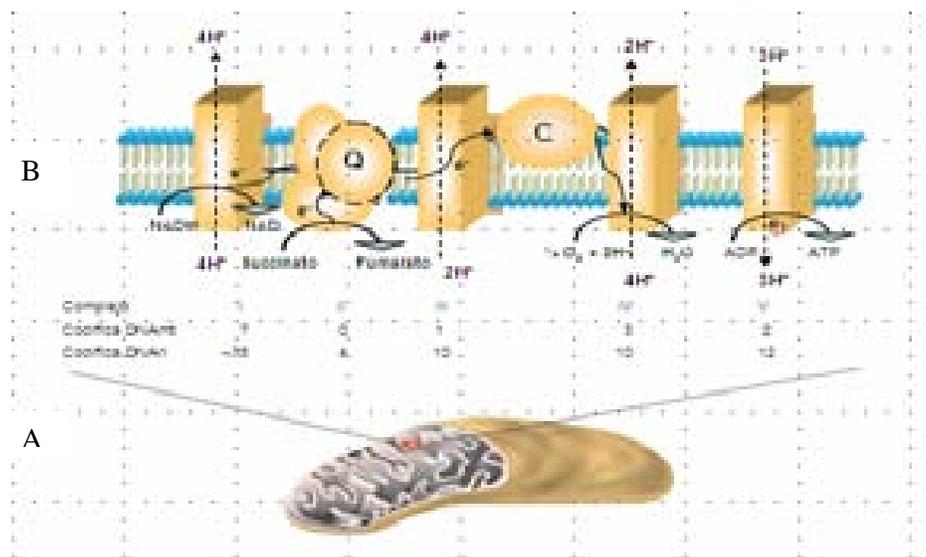
Este organelo esta presente en las células eucariotas, y su tamaño refleja su origen evolutivo, que actualmente es aceptada como la teoría endosimbiótica. Ésta plantea que las mitocondrias son resultados de la relación de una  $\alpha$ -proteobacteria que fue internada por una arquea [3,4].

La mitocondria miden aproximadamente 0.5-1  $\mu$ m de diámetro, por lo general su forma y su número dentro de una célula varia dependiendo de los requerimientos energéticos de la célula, regularmente hay 10 a 1 000 mitocondrias por célula [1,5]. Este organelo esta dividido en dos compartimentos diferente en morfología y función, la Membrana Mitocondrial Externa (MME) y Membrana Mitocondrial Interna (MMI). La MME es la membrana más externa de la mitocondria y esta constituida por una bicapa lipídica con inserción de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC). Los VDAC o porinas son permeables a solutos de hasta 5 kDa y sus cambios de conformación dependen de la familia de las Bcl-2, como Bim, Bak, Bax, las cuales se asocian a Bid, causando la permeabilidad de la membrana y en consecuencia la liberación del citocromo c (cyt c). Mientras que la MMI es la membrana que separa el espacio intermembranal (EIM) y la matriz mitocondria (MM). Esta capa es permeable a moléculas de agua, oxígeno y dióxido de carbono y es altamente plegable, por lo tanto tiene una amplia superficie que permite que en ella se realicen diferentes actividades metabólicas. Aquí se encuentran diferentes proteínas apoptóticas como el cyt c y las IAPs (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis). En esta región también se localiza el Translocador de Nucleósido de Adenina (ANT). Ahora bien, en el EIM se localizan el 10 % del cyt c, el resto se encuentra asociado a la MMI. Se ha determinado que existen proteínas transportadoras en el EIM [6-8]. Un reciente estudio ha identificado secuencias proteicas blanco que

permiten la localización de proteínas apoptóticas como Smac/DIABLO [9,10]. Por último la MM es el lugar donde se alojan gran cantidad de enzimas involucradas en diferentes procesos metabólicos, como el Ciclo de Krebs, así como el DNA mitocondrial (DNAm), la maquinaria necesaria para la expresión de genes mitocondriales, ribosomas y la mayoría de las proteínas apoptóticas [6-9].

### 1.1.2. Fosforilación oxidativa y apoptosis

El aporte energético que requieren las células eucariotas lo obtienen gracias a la oxidación aerobia de sustratos dentro de la mitocondria que genera un potencial reductor en forma de NADH y FADH<sub>2</sub>. Los electrones generados pasan a través de cuatro complejos proteicos localizados en la MMI que en conjunto forman la cadena de transporte de electrones que finalmente reducen el O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (Figura1). Durante este proceso, se forma un gradiente de protones, el cual es aprovechado por la ATPasa en MM para generar ATP [11-13].



**Figura 1.** Representación esquemática de la mitocondria y los componentes de la cadena de transporte de electrones. A) La mitocondria esta formada por una MME y MMI, en la que se encuentra los complejos proteicos de la cadena de transporte de electrones, y en la MM se localiza el DNA mitocondrial (DNAm). B) Componentes de la cadena de transporte de electrones, Complejo I, NADH deshidrogenasa; Complejo II, Succinato deshidrogenasa; Complejo III, Citocromo reductasa; Complejo IV, citocromo oxidasa; Complejo V, Fo-F1-ATP sintetasa (Modificado de Saconne C, 2005).

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la mitocondria tiene un papel central en la transmisión y amplificación de señales de muerte en la apoptosis. Este organelo participa en la vía extrínseca y en los eventos más importantes durante la

apoptosis como el remodelamiento estructural y funcional del mismo y la subsiguiente liberación de proteínas apoptóticas al citosol. El proceso está altamente regulado por factores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1) y pro-apoptóticos (Bik, Bad, Bim, Noxa, Puma, Bax, Bak) de la familia Bcl-2, gracias a la apertura del poro de transición de permeabilidad (PT) que se localizan tanto en la MME como en la MMI. Esto permite la liberación de diferentes complejos proteicos como Smac/DIABLO y citocromo c (cyt c). En el citosol, cyt c se une a la molécula Apaf -1 y posteriormente a la caspasa 9 para formar el apoptosoma y conducir a la muerte celular [14-17].

Se sabe que el daño en la regulación de la apoptosis está ampliamente involucrada en diferentes patologías como en enfermedades neurodegenerativas y en el desarrollo del cáncer. Se ha visto que un daño en la regulación de las proteínas apoptóticas es un punto crítico en el desarrollo de cáncer así como en la efectividad del tratamiento. De hecho, los avances de la biología molecular y la tecnología de alto rendimiento han permitido identificar en diferentes tipos de cáncer la expresión de genes involucrados en la apoptosis [10,18,19].

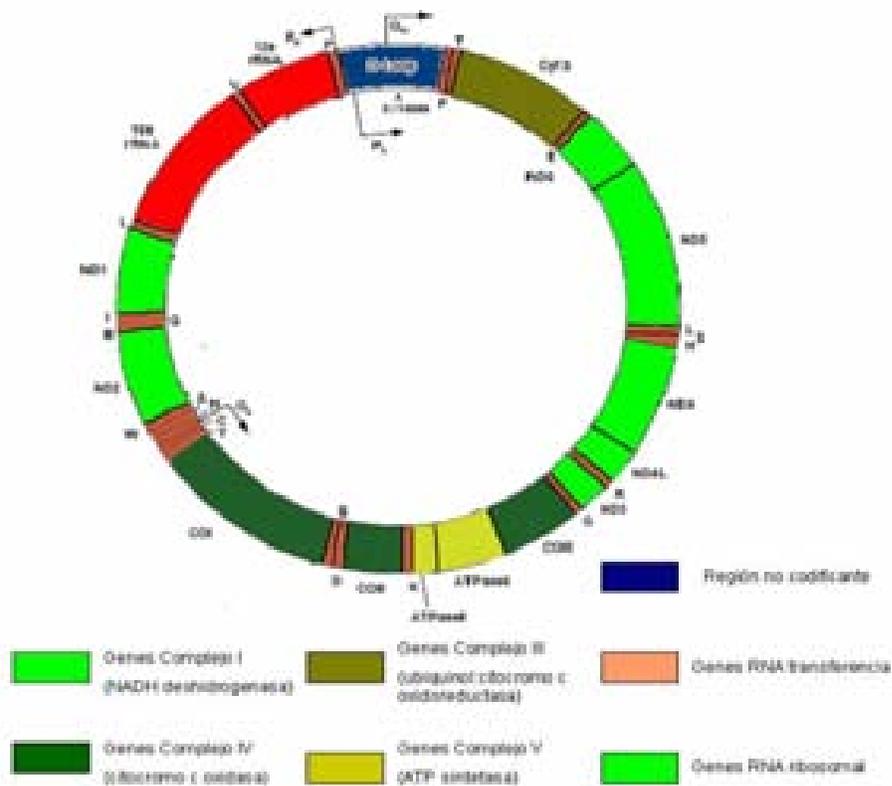
## I.2. DNA mitocondrial y genética mitocondrial

### 1.2.1. Genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial humano que fue completamente secuenciado por Anderson en 1981 y posteriormente revisado y asignado con el nombre de Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS), consiste en una molécula circular de DNA de doble cadena con 16 569 pb [20,21]. El número de moléculas de DNAm<sub>t</sub> por célula varía dependiendo de tipo de células pero aproximadamente hay 2-10 copias de DNAm<sub>t</sub> por mitocondria [20-22]. Esta molécula codifica 37 genes (Figura 2). De ellos, 13 son componentes peptídicos de las 81 proteínas requeridas para la fosforilación oxidativa. De éstos, siete genes codifican subunidades del Complejo I y son ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6; un gen del componente del Complejo III, cyb b; tres genes que codifican parte del Complejo IV, COI, COII y COIII; y dos genes que codifican subunidades del Complejo V, ATPasa6 y ATPasa8. El resto de los genes codifican para 2RNAr y 22RNAt que son esenciales para las síntesis de las proteínas mitocondriales. También dentro del DNAm<sub>t</sub> hay una región no codificante de 1 100 pb llamada D-loop

(Displacement-loop), el cual contiene elementos de la transcripción y la replicación, que son puntos críticos en el control genético [23, 24].

El DNAm es una macromolécula de doble cadena que esta formada por una cadena externa llamada cadena pesada (H), por su alto contenido de bases púricas (por lo general, mayor cantidad de G), en la cual se encuentran 28 de los 37 genes mitocondriales. Mientras que la cadena interna es conocida como cadena ligera (L) por que es rica en bases pirimídicas y en ella solo se encuentran 9 de los 37 genes mitocondriales.



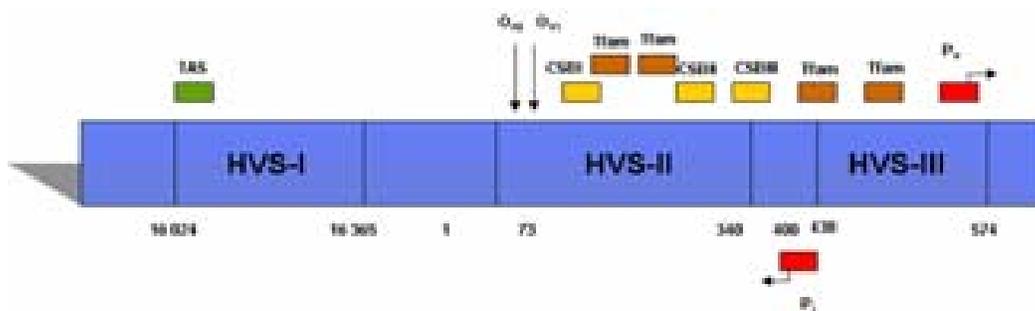
**Figura 2.** Esquema de la distribución de los genes del DNAm. La circunferencia interior representa la cadena L y en ella los genes que se encuentran. Mientras que la circunferencia externa es la cadena H y los genes que en ella se encuentran. Las flechas indican el origen de replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ) y el origen de la cadena pesada ( $O_H$ ). (Tomado de <http://mitomap.org/MITOMAP/mitomapgenome.pdf>).

Entre unas de las características del DNAm y el DNAn es que este genoma es totalmente codificante, a excepción de una región que se localiza entre los nucleótidos 16 024-576 conocida como D-loop (Displacement-loop).

La región no codificante que consiste en 1 100 pb, se sitúa entre el gen del RNAt de prolina y de fenilalanina. Esta región contiene elementos de regulación como el origen de replicación de la cadena pesada ( $O_H$ ), dos promotores para ambas cadenas ( $P_L$ ,  $P_H$ ), tres bloques de secuencias conservadas (CSBI, CSBII y CSBIII), dos sitios de unión del factor de transcripción A (Tfam) y secuencias asociadas a terminación de cadena (TAS) (Figura 3)[ 25,26].

Anteriormente, se sabía que el D-loop estaba formado por dos regiones hipervariables, pero hoy se conoce que esta formado por tres regiones hipervariables. La región hipervariable I (HVS I, posición 16 024-16 365), región hipervariable II (HVS-II, posición 73-340) y región hipervariable III (HVS-III, 438-574) [27, 28]. Estas regiones destacan por ser altamente polimórficas y aunque en especial la región HVS-I y HVS-II tienen un proceso de evolución similar, su tasa de sustitución de nucleótidos es diferente. Esto ha permitido que la región HVS-I sea utilizada ampliamente para el estudio de patrones de origen y migración de poblaciones, a diferencia de la región HVS-II. Se ha estimado que la tasa de sustitución de nucleótidos de HVS-I es de 0.6, mientras que de HVS-II es de 0.54 y de HVS-III se desconoce la tasa exacta [29-32].

La existencia de varios análisis del DNAmT ha permitido identificar que aunque se desconozca el origen de estas regiones hipervariables, reflejan mutaciones antiguas. De modo que si estos sitios son los principales puntos calientes, llamados “hotspot” de mutaciones; entonces, si ocurre una nueva mutación en la región control del DNAmT, ésta ocurrirá de preferencia en una región hipervariable [33-34].



**Figura 3.** Esquema de la región control del DNAmT. Las proteínas de unión a las diferentes regiones de D-loop son indicadas en cajas de colores.

### I.2.2. Replicación mitocondrial

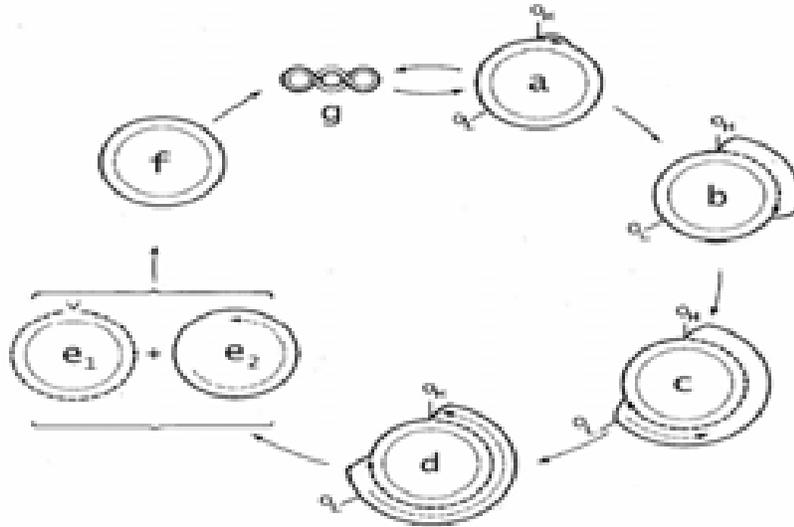
El proceso de replicación es un evento altamente regulado por un complejo multienzimático llamado Replisoma DNAm<sub>t</sub>, que se encuentra en la MM y es independiente del ciclo celular. El componente principal de este complejo es la DNA polimerasa  $\gamma$  mitocondrial, responsable de la replicación y la reparación de DNAm<sub>t</sub>. Esta enzima se encuentra como un  $\alpha$ ,  $\beta$  heterodímero, y como un  $\alpha$  monómero que se asocia con otras cuatro proteínas más. De hecho, esta subunidad es la que contiene la acción catalítica y la actividad de exonucleasa 3' a 5' de corrección de errores, además de tener la actividad de transcriptasa reversa. Se ha determinado que una deficiencia en la actividad de una de las proteínas que forman el replisoma del DNAm<sub>t</sub>, como la disminución de la actividad de la DNAPol mitocondrial, esta asociada con una disminución de moléculas de DNAm<sub>t</sub> [35]. Además, se ha identificado la oxidación de la DNAPol mitocondrial por acción de los agentes ROS, provocado la disminución de la replicación del DNAm<sub>t</sub> [36-37].

La replicación inicia con la síntesis de forma unidireccional de la cadena pesada (H) en el sitio ( $O_H$ ), que se localiza en el D-loop y río abajo del inicio de transcripción. Para ello, se requiere de un iniciador de RNA que es sintetizado por la DNAPol mitocondrial. Este iniciador se alinea con la región río arriba del  $O_H$  que corresponde a las secuencias conservadas (CSBs), formando de esta forma un loop de tres hebras (dos de DNA y una de RNA). La síntesis inicia cuando llega la RNAsa mitocondrial y procesa al iniciador, generando un iniciador maduro. Entonces, la DNAPol mitocondrial empieza a sintetizar la cadena H y cuando la cadena H alcanza el sitio de inicio de la replicación de la cadena ligera ( $O_L$ ), la cadena H se desplaza y se inicia la replicación de la cadena L en sentido contrario a la cadena H. Cuando la síntesis de ambas cadenas se ha completado, se separan las cuatro cadenas con la ayuda de una topoisomera mitocondrial, el iniciador de RNA es removido, se complementa el espacio y es ligado con la ayuda de una ligasa mitocondrial (Figura 4) [38-41].

### I.2.3. Transcripción mitocondrial

Los genes mitocondriales son sintetizados en dos transcritos policistrónicos, uno originado de la cadena H y otro de la cadena L. De estos genes, los RNAt que se

encuentran dispersos en el genoma se cree que actúan como secuencias para el procesamiento de los policistrones y a los RNAm que darán origen a las polipéptidos mitocondriales.



**Figura 4.** Esquema de la replicación del DNAm. a) La síntesis empieza en  $O_H$ . b) Continúa la síntesis de la cadena H. c) La cadena H llega al  $O_L$ . d) Continúa la replicación de ambas cadenas en sentido contrario. e) Termina la replicación de las cadenas hijas. F) Cada molécula queda covalentemente cerrada. G) La molécula de DNAm se superenrolla (Tomada de Clayton, 1992).

El proceso de transcripción inicia con la unión de la RNAPol mitocondrial y el factor de transcripción A (Tfam, o mtTFA) a las secuencias promotoras dentro del DNAm. Existen tres promotores, dos de la cadena H ( $H_1$  y  $H_2$ ).  $H_1$  se localiza río arriba de  $RNA^{Phe}$  y transcribe el  $RNA^{Phe}$ , 12SRNAr,  $RNA^{Val}$  y 16SRNAr. Mientras que el  $H_2$  se sitúa en el inicio del gen 12SRNAr y transcribe los genes que se localizan en la cadena H. Mientras que el promotor de la cadena L se encuentra dentro del D-loop, del cual derivan los 8 transcritos de RNAt y el RNAm de ND6. En ambos casos, la RNAPol mitocondrial inicia la transcripción. Para regular los niveles de RNAm/RNAt, la proteína de terminación de la transcripción mitocondrial (mtTERF) se une al  $RNA^{Leu UUR}$ , con la finalidad de bloquear la transcripción y permitir que sea sintetizado 25 veces más RNAr [ 26, 41-43].

#### I.2.4. Herencia materna

Una de las características del DNAm<sub>t</sub> es que se transmite de forma no mendeliana por línea materna. Aunque hombre y mujer tenga mitocondrias, durante la fertilización, las mitocondrias del padre que entran al óvulo no sobreviven a la primera división celular. Así que la cantidad de mitocondrias que contenga el cigoto son procedentes de la madre, además de presentarse el fenómeno de cuello de botella, en el cual las moléculas de DNAm<sub>t</sub> transmitidas al hijo son pocas [41, 44].

En los últimos años, se ha cuestionada otra de las características del DNAm<sub>t</sub> de la no recombinación y por tanto la herencia materna. En un inicio existía la controversia de la posibilidad de la existencia de la recombinación basada en la observación de polimorfismo, pero en el 2005 se demostró la recombinación por herencia paterna en músculo esquelético humana mediante el análisis de la combinación de la distribución de alelos. Sin embargo, este evento sigue teniendo una gran controversia por su implicación evolutiva, tal es así que si efectivamente existe la recombinación, tendrían que reconsiderarse muchos aspectos de la evolución humana [45-46].

#### I.2.5. Homoplasmia y Heteroplasmia

Cuando las células se encuentran en una situación donde todas sus copias de DNAm<sub>t</sub> son idénticas (DNAm<sub>t</sub> silvestre), se le conoce como condición de Homoplasmia. Pero si el DNAm<sub>t</sub> presenta mutaciones (DNAm<sub>t</sub> mutado), entonces el DNAm<sub>t</sub> se amplifica y coexisten tanto el DNAm<sub>t</sub> silvestre y el DNAm<sub>t</sub> mutado, y a esta condición se le llama Heteroplasmia. Cuando la proporción de DNAm<sub>t</sub> mutado excede el umbral, se presentan defectos en la fosforilación oxidativa, por lo que la producción de ATP es menor a la demanda de energía. Esta heteroplasmia puede producirse por errores en la replicación o daño causado por ROS producidos del metabolismo oxidativo [41, 47].

La heteroplasmia es el primer nivel de manifestación del polimorfismo, pues sí surge una mutación en el DNAm<sub>t</sub> silvestre, el individuo pasará a sus descendientes la mezcla de DNAm<sub>t</sub> silvestre y mutado. Para que el polimorfismo se establezca, es necesario que ese cambio lo pase a los descendientes, se adquiera la homoplasmia y finalmente se fije

en la población. Sin embargo, el estado de heteroplasmia se presenta en enfermedades neurodegenerativas y la homoplasmia de DNAm<sub>t</sub> mutado es frecuente en tumores [47-48].

### 1.3 Alteraciones de DNA mitocondrial y el cáncer

#### I.3.1. Factores de daño

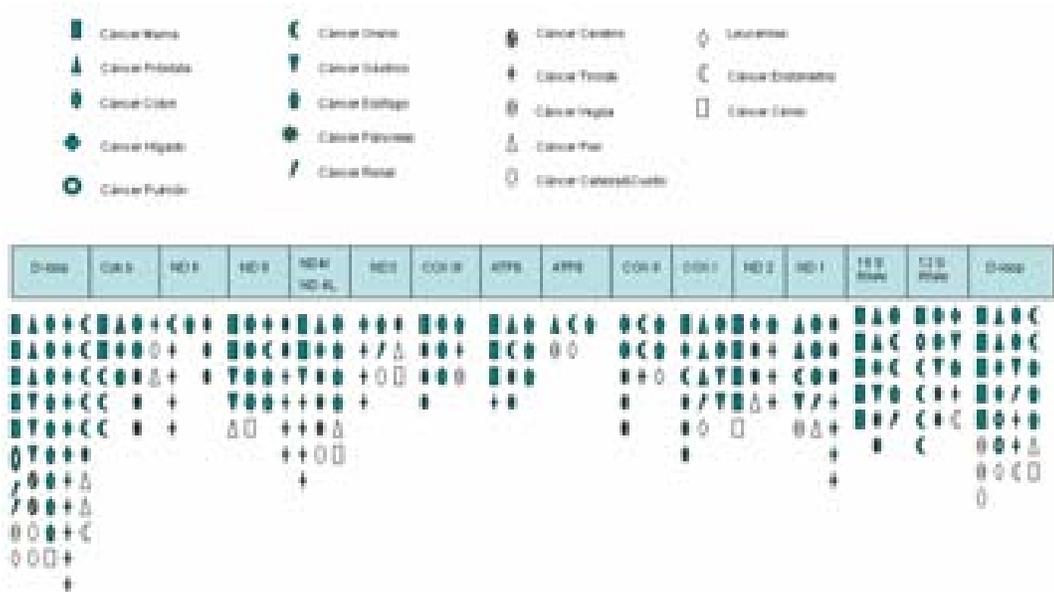
Se ha determinado que el DNAm<sub>t</sub> a diferencia del DNAn es más susceptible a daños y en consecuencia a adquirir mutaciones, de hecho la tasa de mutaciones en el DNAm<sub>t</sub> humano es 10 veces mayor que en el DNAn. Los posibles factores que pueden provocar cambios nucleotídicos en el DNAm<sub>t</sub> son la proximidad subcelular del DNAm<sub>t</sub> a las especies oxidante reactiva (ROS), la limitada capacidad para reparar el DNAm<sub>t</sub> y la falta de histonas para la protección del DNAm<sub>t</sub> [48-50]. En el primer caso, el DNAm<sub>t</sub> es un blanco vulnerable de ROS (radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo) porque se encuentra muy próximo a la generación de éstos por la fosforilación oxidativa. En el segundo caso, se ha determinado que la eficiencia de la replicación y la corrección de errores de la DNAPol mitocondrial compromete al DNAm<sub>t</sub> a tener mutaciones, lo que genera daños en las proteínas mitocondriales y en consecuencia produce mayor cantidad de ROS que atacan al DNAm<sub>t</sub>, creando un ciclo de daño [50-54]. Finalmente, no hay histonas que protejan al DNAm<sub>t</sub>, sin embargo, estudios han permitido elucidar que la proteína Tfam además de ser importante en la transcripción también tiene un papel en la organización y empaquetamiento del DNAm<sub>t</sub> para la formación coordinada de nucleoides, los cuales son asociaciones de 2 a 8 moléculas de DNAm<sub>t</sub> con esta proteína [55-56].

#### I.3.2 Mutaciones en el DNAm<sub>t</sub>

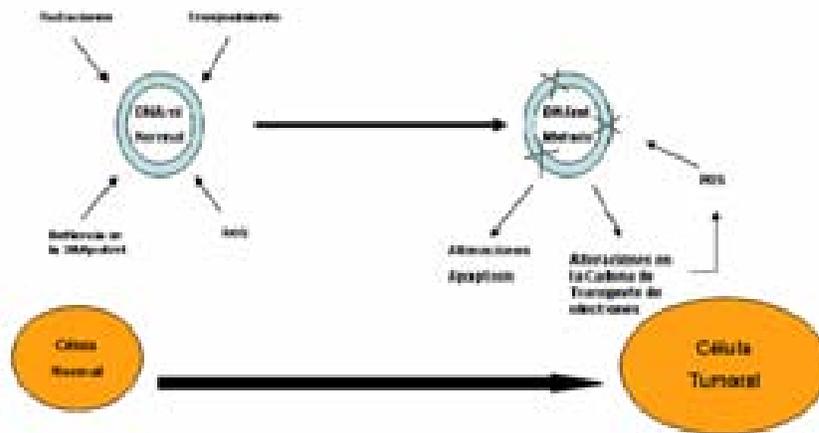
Se sabe que las mutaciones en el DNAm<sub>t</sub> han sido ligadas a enfermedades neurodegenerativas que afectan: sistema nervioso central, corazón, músculo, sistema endocrino y renal; y que la mayor parte de estas mutaciones germinales son puntuales e involucran a los RNAt y péptidos, comprometiendo a la fosforilación oxidativa y por ende, la función de la mitocondria [57-58]. Sin embargo, estudio recientes ha demostrado a través de las tecnologías de alto rendimiento como MitoChip (v2),

DHPLC y espectrometría de masas, la existencia de mutaciones somáticas en el DNAm en diferentes tipos de cáncer. Se han documentado mutaciones en diferentes regiones del DNAm en cáncer de pulmón, colon, mama, esófago, vejiga, próstata, ovario, cabeza y cuello, cerebro, endometrio, riñón, hígado y piel (Figura 5). Además, se ha reportado mutaciones mitocondriales en lesiones premalignas, lo que sugiere que estas mutaciones pueden ocurrir en etapas tempranas de la progresión del tumor y servir como una herramienta de diagnóstico y pronóstico de los diferentes tipos de cáncer y ofrecer una oportunidad de tratamiento y de sobrevivida al paciente con cáncer [57-61].

Los requerimientos energéticos de una célula tumoral a diferencia de una célula normal, son mayores, esta energía la obtiene a través de la fosforilación oxidativa, pero ello además de generar ATP, también produce altos niveles de ROS. Estos factores internos, como factores externos (fármacos, radiaciones, etc.) provocan mutaciones en el DNAm. Si estas mutaciones le dan una desventaja a la célula en crecimiento, pronto se eliminarán. Por el contrario, si le da ventajas al DNAm para facilitar la replicación, estas emergen y por expansión clonal permanecen (Figura 6)[4, 62-66].



**Figura 5.** Esquema del DNAm linealizado. Cada figura corresponde a mutaciones en un tipo de tumor y su frecuencia en diferentes publicaciones [4, 64-85]



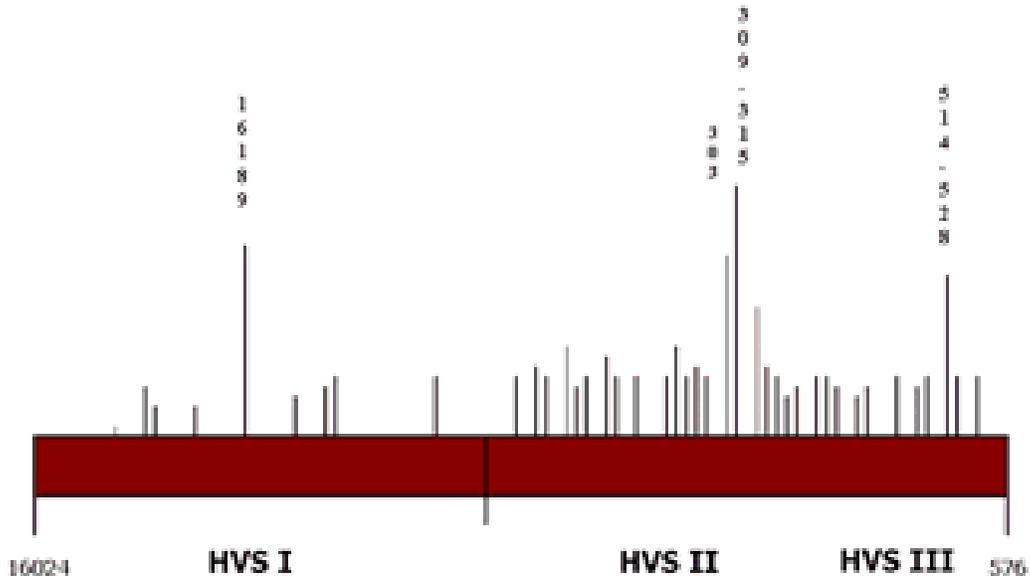
**Figura 6.** Alteraciones que puede tener el DNAm en una célula normal El DNAm de una célula normal esta expuesta a diferentes factores de daño, que pueden originar una alteración en la funcionalidad de la mitocondria, que están presentes en una célula tumoral.

Actualmente, la base de datos MITOMAP registra 1 710 y 734 polimorfismos en la región codificante y en la región control, respectivamente. Además tiene 233 y 156 mutaciones en las regiones correspondientes. Algunas de estas mutaciones que ocurren en regiones codificantes producen un cambio en aminoácido y en consecuencias en la funcionalidad del polipéptido. Sin embargo, existen otras mutaciones que son silenciosas y no afectan las secuencias de las proteínas mitocondriales. Tal es el caso de la región no codificante (D-loop) que corresponde a una región silenciosa en la que se ha reportado un número considerable de mutaciones en diferentes tipos de cáncer [86-87].

A la fecha, existe evidencia de acumulación de mutaciones en la región no codificante D-loop de este DNAm, las cuales se han asociado a diversos tipos de cáncer, como: hígado, pulmón, riñón, colon, estómago, mama, ovario, vejiga y piel. Se han descrito con mayor frecuencia (más del 50% de los casos) mutaciones en las posiciones 303, 309-315, región conocida como D310 (tracto-C, que abarca de la posición 303 a la 315), 514-518 y 16,189 dentro de la región D-loop en los tipos de cáncer antes mencionados, presentándose como una heteroplasmia o homoplasmia (Figura 7).

En este contexto, el conocimiento de las mutaciones en D-loop, abre la posibilidad a la investigación para explorar acerca de otros de los factores implicados en el proceso

multietapas del cáncer, así como la búsqueda de un marcador pronóstico en este tipo de paciente, como lo es cáncer de cérvix. Es probable tal como sucede en otras neoplasias, que mutaciones en el DNAm<sub>t</sub> tenga un papel importante en las lesiones tumorales de cérvix y así pueda ser considerado, como otra de las alteraciones moleculares involucradas en el proceso neoplásico.



**Figura 7.** Mutaciones en la región D-loop del DNAm<sub>t</sub> en diferentes tipos de cáncer. Cada línea representa una mutación y su longitud la frecuencia en la que se presenta.

#### I.4. Cancer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer más común en mujeres a nivel mundial y en América central, México ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad en la población femenina, según reportes del GLOBOCAN, 2002 [88]. Según datos de esta fuente, en México la tasa de incidencia de cáncer de cérvix es de 33.4 casos por cada 100,000 habitantes (Figura 8). Además, de acuerdo con los datos de defunción del 2005 del Sistema Nacional de Información en Salud, el Estado de México, seguido por Veracruz, son los dos estados con mayor índice de mortalidad por cáncer cervicouterino en México [89].

Este cáncer se encuentra estrechamente asociado a la infección persistente del Virus del Papiloma Humano (HPV), que es una de las enfermedades de transmisión sexual más

comunes a nivel mundial; aunque también están asociados otros factores de riesgo como la edad (mujeres mayores de 40 años), el tabaquismo, el número de parejas sexuales, el número de embarazos, el número de partos, el inicio de la vida sexual [90-91]. Se calcula que alrededor del 60-75% de la población sexualmente activa está infectada por algún tipo de HPV genital. En México, el tipo viral más común es el HPV 16, seguido del tipo viral HPV 18 y 58 [92].

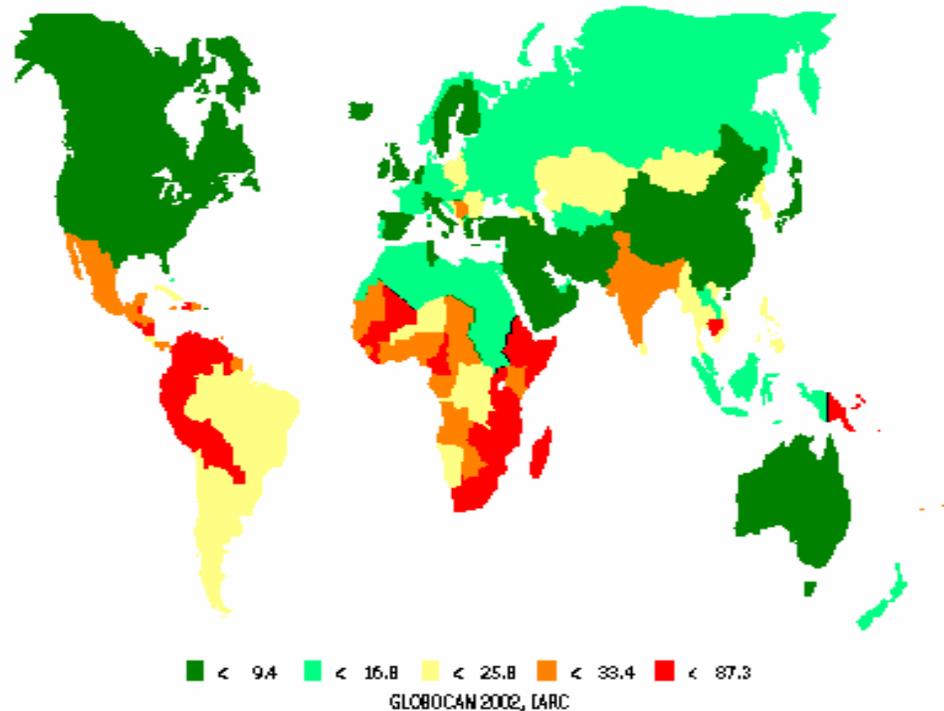


Figura 8. Incidencia de Cáncer de Cérvix a nivel mundial. En este planisferio se muestra la tasa de incidencia por cada 100,000 habitantes coloreados los diversos países del mismo color según los datos de los recuadros inferiores; GLOBOCAN, 2002.

Desde hace varios años, nuestro grupo de investigación ha venido trabajando la Oncogenómica del cérvix, analizando sus alteraciones cromosómicas, génicas y de expresión, contribuyendo al conocimiento de las bases genéticas presentes en esta neoplasia (15-19). A pesar de que se sabe que el cáncer de cérvix esta asociado con la infección de HPV, no es el único factor etiológico en esta neoplasia. Por otro lado, la relación entre mutaciones en el DNAm<sub>t</sub>, lesiones del cérvix y HPV no es todavía muy clara. Por lo que es probable, tal como sucede en otras neoplasias, que mutaciones en el DNAm<sub>t</sub> tengan un papel importante en las lesiones tumorales del cérvix y así pueda ser considerado como otra de las alteraciones moleculares involucradas en el proceso

neoplásico. De ahí que surja el interés por conocer los cambios nucleotídicos (polimorfismo/mutaciones) que están presentes en la región D-loop en lesiones tumorales del cérvix y abrir la posibilidad de que el DNAm pueda ser considerado un posible marcador de esta neoplasia.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de cérvix representa la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas, muriendo 12 mujeres al día, lo que lo hace un problema de salud en nuestro país y a nivel mundial.

Por otra parte, el interés para determinar otros factores asociados a esta neoplasia es de gran importancia para identificar potenciales marcadores moleculares para el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Recientes estudios han demostrado en diferentes tipos de cáncer que la región más susceptible a tener una alta acumulación de mutaciones en el DNAm<sup>t</sup> es la región control (D-loop). Esta región a pesar de no ser codificante, es la región control de la replicación y transcripción del genoma mitocondrial, puntos críticos en el control genético.

En este contexto, el conocimiento de los cambios nucleotídicos en el D-loop del DNAm<sup>t</sup> en pacientes mexicanas con cáncer de cérvix, abre la posibilidad para explorar otro de los factores implicados en esta neoplasia, así como la búsqueda de un potencial marcador molecular.

## **III. HIPÓTESIS**

Dada la evidencia de cambios nucleotídicos en las regiones HVS-I y HVS-II en el D-loop del DNAm<sup>t</sup> en pacientes oncológicos, se espera que las pacientes con cáncer de cérvix presenten también cambios nucleotídicos en esta región.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1. Objetivo General**

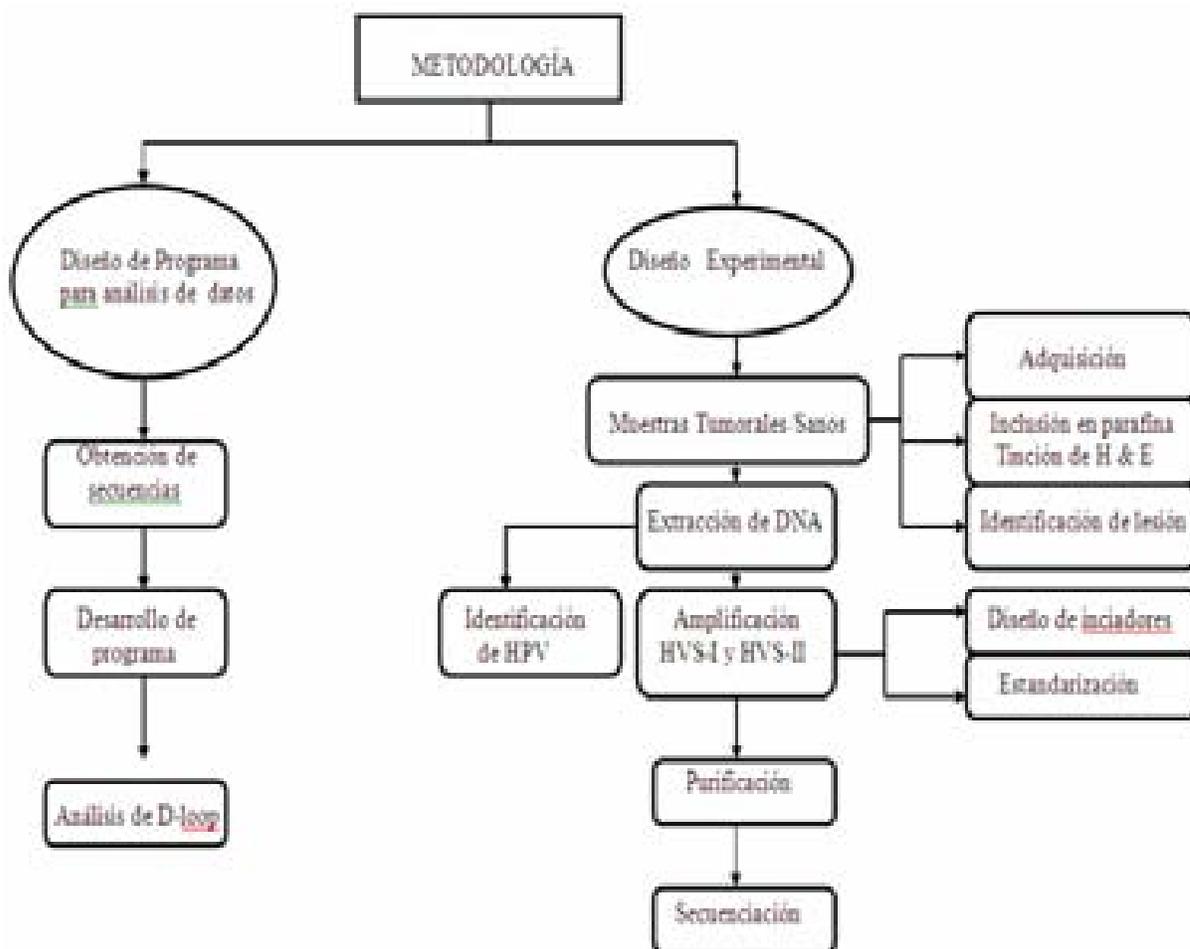
Determinar los cambios nucleotídicos más frecuentes dentro de las regiones más representativas de HVS-I y HVS-II del D-loop del DNAm en tejido del cérvix con lesión invasora.

### **IV.2. Objetivos Particulares**

- Determinar los cambios nucleotídicos de las regiones más representativas de HVS-I y HVS-II del D-loop en mujeres sin lesión en el cérvix.
- Obtener la secuencia consenso de las regiones analizadas de HVS-I y HVS-II del D-loop en mujeres sin lesión en el cérvix.
- Determinar los cambios nucleotídicos de las regiones más representativas de HVS-I y HVS-II del D-loop en tejidos del cérvix con lesión invasora.
- Identificar los cambios nucleotídicos más representativos de HVS-I y HVS-II en tejido del cérvix con lesión invasora.
- Construir la base de datos de DNAm y desarrollar un programa ejecutable para el análisis de las secuencias experimentales.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describe la estrategia que se realizó para lograr los objetivos de este trabajo. La metodología se dividió en dos fases: fase experimental y la fase de análisis. Dentro de la primera, se realizó la selección de muestras, obtención de DNA, amplificación de las dos regiones más representativas de HVS-I y HVS-II del D-loop y finalmente la secuenciación de los fragmentos amplificados. Mientras que en la fase de análisis, se construyó la base de datos de DNAmT y se analizaron de las secuencias experimentales (ver Diagrama de Flujo).



## **V.1. Adquisición de muestras**

Se utilizaron 25 tejidos de cérvix de pacientes con cáncer cervicouterino (CaCu) y 25 citologías exfoliativas orales (CEOs) de las mismas pacientes. Además, se usaron 10 muestras de linfocitos y CEOs de mujeres sanas. La toma de muestra fue confirmada por un estudio de colposcopia de la Clínica de Displasias, Hospital General de México y por el análisis histopatológico del mismo hospital. El criterio de inclusión fue el siguiente: sin antecedentes previos de cáncer y sin tratamientos previos como asa diatérmica, radioterapia o quimioterapia. Las muestras utilizadas en este estudio fueron obtenidas bajo el consentimiento informado del paciente, aprobado por el Hospital General de México, SS. Además, se trabajó con líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino, como CasKi, SiHa, HeLa, Inbl y CaLo.

## **V.2. Preparación de muestras**

Los tejidos con lesión invasora fueron colocados en solución fijadora para su posterior inclusión en parafina [93]. Para ello, el tejido se transfirió en un tren de disolventes: EtOH 70%, 1h; EtOH 96%, 1h; EtOH 100%, 1h; EtOH 100%, 1hr; EtOH-Xilol, 1h; Xilol, 1h; Xilol, 1h; y finalmente en parafina a 60°C.

Por otro lado, las citologías exfoliativas orales fueron obtenidas mediante el uso de un cepillo cervical estéril, que se transfirió en EtOH absoluto hasta su procesamiento. Se centrifugó la muestra a 14 000 rpm para obtener las células del epitelio bucal y se decantó el sobrenadante.

En cuanto a las muestras de sangre periférica, se obtuvieron los linfocitos y se lavaron con solución de lisis de glóbulos rojo, hasta tener un botón de células libres de glóbulos rojos.

### **V.3. Identificación de la lesión**

De los bloques de parafina se realizaron cortes histológicos de 5µm y se tiñeron con la tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E). Para ello, el tejido se colocó en una laminilla a 60°C, por 20 min, posteriormente se transfirió en el tren de tinción que consistió en el paso por diferentes disolventes y colorantes: xilol 100%, EtOH 100%, EtOH 96%, EtOH 70%, EtOH 30%, H<sub>2</sub>O destilada, Hematoxilina, H<sub>2</sub>O destilada, Agua amoniacal, H<sub>2</sub>O destilada, Eosina, EtOH 70%, EtOH 96%, EtOH 100% y Xilol 100%. La laminilla fue examinada por la Dra. Minerva Lazo, de la Unidad de Patología, Hospital General de México, para identificar la zona de células tumorales.

### **V.4. Extracción de DNA**

Se extrajo el DNA total (nuclear y mitocondrial) como se describe a continuación. Del bloque de parafina se tomó una porción del área seleccionada por la patóloga, mediante una aguja de médula ósea de 5mm de diámetro. El cilindro de tejido se desparafinó y se colocó en solución de lisis nuclear (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS), proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó a 65°C toda la noche. De igual manera, el botón de células del epitelio bucal y de linfocitos se les agregó solución de lisis nuclear y proteinasa K. Después de la incubación, se realizó la extracción de DNA con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Para ello, se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó por inversión durante 15 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo estéril y se le añadió 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó de nuevo por inversión y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. De nuevo la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo estéril y se le agregó 2.5 volúmenes de isopropanol frío, se agitó gentilmente para precipitar el DNA, y se centrifugó a 14 000 rpm por 20 min. El botón de DNA se lavó dos veces con EtOH 96% y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min. El DNA fue resuspendido en agua estéril. La calidad e integridad del DNA fue determinada en un gel de agarosa al 1%. La concentración de DNA fue cuantificada por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (Spectrophotometer ND-100, NadoDrop). La pureza fue identificada por el cociente de Abs<sub>260</sub>/Abs<sub>280</sub>. Se consideró que la muestra estaba libre de proteínas cuando el coeficiente se encontró entre 1.7 y 2.0.

## V.5. Detección de HPV 16

Se identificó la presencia de secuencias virales de HPV 16 en ambos tipos de muestras, utilizando iniciadores específicos E6F/E6R (secuencias en apéndice X.2), en el termociclador *Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480*, bajo las condiciones ya estandarizadas por Terris, 1997, que fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	30 min	} x 35 ciclos
Alineamiento	55 °C	1 min	
Elongación	72 °C	1 min	
Elongación Final	72 °C	5 min	

El producto amplificado de 126 pb fue observado en un gel de agarosa al 2%. Utilizando como control positivo la línea celular Caski, derivada de cáncer de cérvix y como control negativo se usó la mezcla de reacción sin DNA.

## V.6. Estandarización de PCR para amplificados mitocondriales

Para la amplificación de la región HVS-I (166 pb) y HVS-II (446 pb) se diseñaron los iniciadores en el programa [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) de las dos regiones de interés dentro del D-loop (secuencias de iniciadores en apéndice X.2).

Las amplificaciones de los productos de PCR se realizaron con 100 ng de DNA purificado de los diferentes tipos de muestras en el termociclador *Thermo Hybaid*. Como control negativo se usó la mezcla de reacción sin DNA. El volumen final de la reacción fue de 50 µL y las concentraciones finales de la mezcla de reacción fueron las siguientes:

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración Madre</i>	<i>Concentración Final</i>
<i>Amortiguador de Taq pol</i>	10X	0.2X
<i>dNTPs</i>	10 mM	0.2 mM
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	25 mM	0.5 mM
<i>Iniciadores</i>	12.5 pmol	0.25 pmol
<i>Taq polimerasa</i>	5 U/μL	0.1 U
<i>DNA</i>	100 ng	2 ng

Las condiciones de temperatura de la PCR para la amplificación de la región HVS-I y HVS-II fueron estandarizadas y para ambas fueron:

Desnaturalización inicial	94 °C	4 min	} x 33 ciclos
Desnaturalización	94 °C	35 min	
Alineamiento	63 °C	21 min	
Elongación	72 °C	1 min	
Elongación Final	72 °C	4 min	

Para comprobar el producto amplificado se corrió en un gel de agarosa al 2%. La electroforesis se realizó en amortiguador de TBE al 0.5X, aplicando un voltaje de 80 V durante 1.5 h.

### **V.7. Purificación de productos mitocondriales de PCR**

Una vez que se comprobó que el producto amplificado de la PCR tenía el tamaño esperado se procedió a purificar. En las muestras que se encontró solo la banda deseada, se utilizó el sistema comercial de purificación Wizard SV PCR Clean-up System (Promega). Pero cuando en las muestras se observó más de una banda, el producto de PCR se corrió en un gel al 2%, se cortó la banda de interés y se purificó con el sistema comercial de purificación QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Se comprobó efectivamente que se obtuviera el amplificado puro en un gel de agarosa al 2%, es decir, que se observara una sola banda.

## V.8. Secuenciación

Cuando se obtuvieron los amplificadores purificados, se realizó la reacción de secuenciación en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , compuesta de lo siguiente:

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</i>
<i>Big Dye Terminator Kit</i>	0.5-0.7
<i>Amortiguador de Big Dye</i>	2
<i>Iniciadores (3.2 pM)</i>	1
<i>Productos de PCR*</i>	0.5-1.5
<i>Agua</i>	Cbp 20

\*La cantidad de productos de PCR fue variable dependiendo de la cantidad de amplificado puro obtenido.

Las condiciones de la secuenciación fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	94 °C	2 min	} x 25 ciclos
Desnaturalización	94 °C	30 seg	
Alineamiento	50 °C	15 min	
Elongación	60 °C	40 seg	
Elongación final	72°C	1 min	

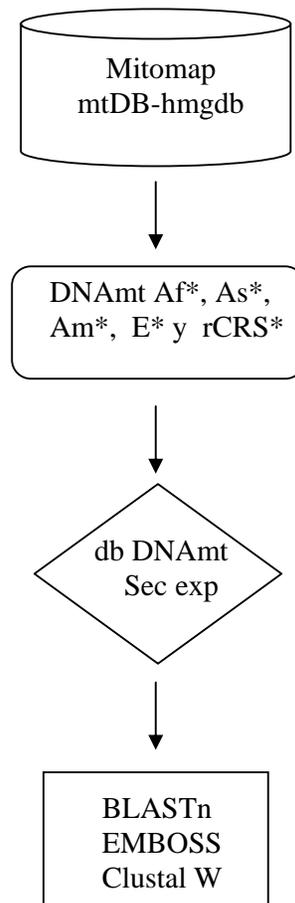
Los productos de reacción de secuenciación fueron purificados utilizando el sistema comercial de purificación DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen). El DNA marcado fue liofilizado, resuspendido en formamida y desnaturalizado a 95°C por 5 min para su posterior análisis en el secuenciador *3100 Genetic Analyzer ABI PRISMA*.

## V.9. Construcción de Base de datos de DNA mitocondrial

Se seleccionaron 93 secuencias de DNAm<sub>t</sub> obtenida de dos base de datos, la secuencia de referencia, rCRS (MITOMAP, [www.mitomap.com](http://www.mitomap.com)) y 92 secuencias de la base de datos mtDB (Human Mitochondrial Genome Database, <http://genpast.uu.se/mtDB>) actualizada hasta el 1 Enero del 2007 por la Universidad de Uppsala, Suecia y mantenida por Max Ingman. Estas secuencias son originarias de diferentes poblaciones del mundo: África, Asia, América del Norte, América del Sur, Europa y Asia.

Se realizó un programa ejecutable en Perl que permitiera delimitar dentro de la secuencia completa del DNAmT a la región D-loop, incluyendo a la rCRS. Posteriormente se hizo un BLASTn de cada secuencia experimental comparada con la nueva base de datos recién formada. Se realizó alineamientos pareados con EMBOSS y alineamientos múltiples con Clustal W. El procedimiento bioinformático de forma general fue el siguiente:

### PROCEDIMIENTO BIOINFORMÁTICO



\*Af:Africa; As:Asia; Am:América; E:Europa; rCRS:Revised Cambridge Reference Sequence; Sec exp:secuencias experimentales.

## VI. RESULTADOS

### VI. 1. Adquisición/Preparación/identificación de lesión de muestras

Se obtuvo un total de 70 muestras, de las cuales 25 fueron biopsias de tejido de cérvix con lesión invasora, 25 citologías exfoliativas orales de pacientes con CaCu, 10 muestras de sangre periférica y 10 citologías exfoliativas orales de mujeres sanas. Para obtener la secuencia consenso de las dos regiones analizadas de HVS-I y HVS-II, fue necesario utilizar las muestras de sangre periférica y citologías exfoliativas (CEOs) de mujeres sanas. A partir de esta secuencia consenso se identificó los cambios nucleotídicos presentes en el tejido de cérvix con lesión invasora.

Los tejidos de cérvix con lesión invasora fueron incluidos en parafina, cortados, teñidos y revisados histológicamente para corroborar su diagnóstico de CaCu y seleccionar el área de interés. En la Figura 9 se muestra una imagen histológica de tejido tumoral de cérvix, en la que se observa invasión de las células transformadas en el estroma y ruptura de la membrana basal.

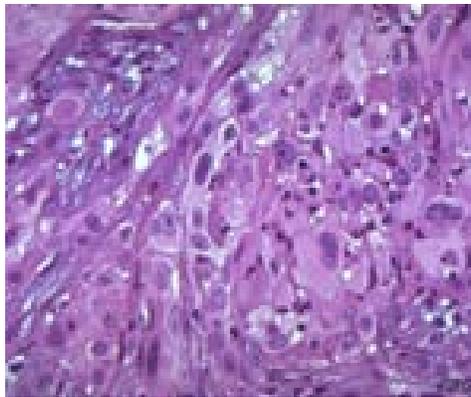
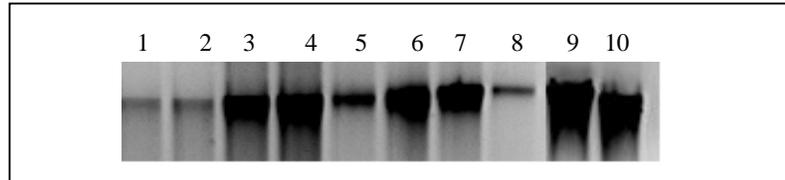


Figura 9. Muestra histológica de cáncer invasor de cérvix. Observación histológica de la pérdida de la arquitectura celular, células pignóticas e incluso binucleadas, con una desproporción en la relación núcleo:citoplasma e invasión a el estroma.

Una vez localizadas histológicamente la zona de células neoplásicas en el tejido incluido en el bloque, se obtuvo el cilindro de parafina con una aguja de médula ósea para su extracción de DNA.

## VI. 2. Extracción de DNA

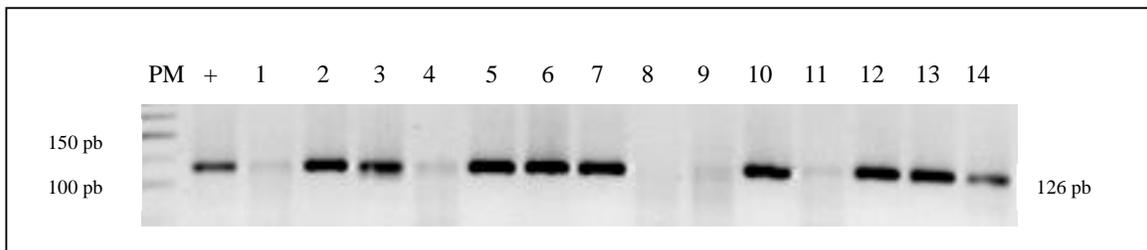
La extracción de DNA de todas las muestras se realizó conforme al protocolo antes descrito. En la figura 10 se observan la calidad de los DNAs de algunas de las muestras. De todas ellas se determinó su calidad e integridad en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría.



**Figura 10.** Electroforesis de DNA de muestras de pacientes con CaCu. Se observa en un gel de agarosa al 1% el corrimiento del DNA total (DNA nuclear + DNAmitocondrial) con un voltaje de 80mV por 1.5h

## VI. 3. Detección de HPV 16

La detección de la presencia de secuencias de HPV16 se realizó en muestras de tejido tumoral de cérvix y en CEOs de las mismas pacientes. El amplificado obtenido fue de 126 pb y como control positivo se utilizó la línea celular Caski. En la figura 11 se muestra la banda de amplificación de la PCR para la detección de la presencia de secuencias de HPV 16.

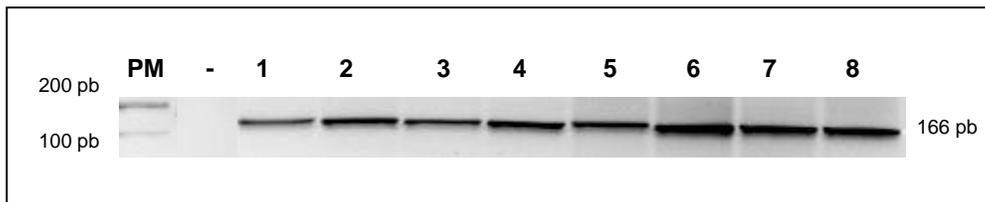


**Figura 11.** Electroforesis del amplificado de PCR de HPV16. En el carril 1, Marcador de peso molecular de 100 pb; carril 2, control positivo para HPV16; carril 3-16, productos de PCR de 14 muestras para HPV16.

Para la PCR realizada con los iniciadores específicos para HPV16, se encontró que 19 de 25 muestras de tejido tumoral presentaron amplificación (76%, HPV16+). Mientras que para las citologías exfoliativas orales de las pacientes con CaCu, se detectaron secuencias de HPV 16 en 9 de 25 muestras (36%, HPV16+).

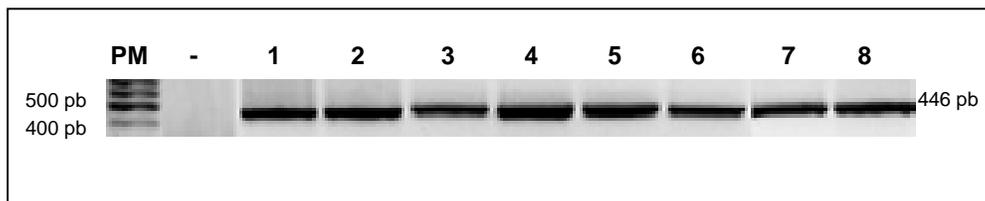
#### VI. 4. Amplificación de HVS-I y HVS-II

Se amplificó por PCR una región de la HVS-I y HVS-II de las 70 muestras. Para ello, se estandarizaron las condiciones óptimas para amplificar las regiones de interés de la HVS-I y HVS-II. En la Figura 12, se muestra la banda que corresponde al amplificado de 166pb de una región de la HVS-I. En todas las muestras amplificó el producto de PCR y fue específico al presentar una sola banda.



**Figura 12.** Electroforesis de amplificado de PCR de la HVS-I del DNAm. En el carril 1, Marcador de Peso Molecular; Carril 2, control negativo; carril 3-10, amplificados de PCR de muestras de tejido tumoral de cérvix.

En la Figura 13, se observa la banda correspondiente al amplificado de 466pb de una región de HVS-II. En todas las muestras amplificó el producto esperado y en la mayoría fue específico. En las muestras que se observó un amplificado inespecífico, se realizó la purificación por gel como se mencionó en la metodología.



**Figura 13.** Electroforesis de amplificado de PCR de HVS-II del DNAm. En el carril 1, Marcador de Peso Molecular; carril 2, control negativo; carril 3-10, amplificado de PCR de muestras de tejido tumoral de cérvix.

## **VI. 5. Secuenciación de la región HVS-I y HVS-II del DNAm**

Se realizó la secuenciación de los amplificadores de la región HVS-I y HVS-II de 10 mujeres sanas (Linfocitos y CEOs) y 25 pacientes con CaCu (CEOs y tejido de cérvix con lesión invasora). Los cambios obtenidos en cada muestra se encuentran en el Anexo (X.4).

En un inicio se secuenciaron 16 CEOs de pacientes con CaCu para obtener una secuencia interna de la región HVS-II de las mujeres mexicanas. Sin embargo, al observar los cambios nucleotídicos de las CEOs con respecto al tejido tumoral de la misma paciente presentaba una gran variabilidad. Por lo tanto, fue necesario obtener la secuencia consenso de la región estudiada de HVS-I y HVS-II, utilizando las secuencias de los amplificadores HVS-I y HVS-II de linfocitos y CEOs de mujeres sanas.

Para determinar la diferencia significativa de los cambios nucleotídicos presentes en la HVS-I y HVS-II en el tejido de cérvix con lesión invasora y en mujeres sanas se utilizó la prueba de  $X^2$ . De igual forma, se empleó esta prueba para determinar la correlación de la infección por HVP 16 y los haplotipos formados en este estudio. Considerando una relación estadísticamente significativa si el valor de  $p$  era  $< 0.05$ . En el caso que de serlo, se determinó la RM (Razón de Momios) para identificar el riesgo por la presencia del cambio nucleotídico en estudio.

En la Tabla 1 se muestra que las CEOs de pacientes con CaCu y los tejidos de cérvix con lesión invasora presentaron un total de 11 cambios en la HVS-II, compartiendo 7 de ellos y siendo en ambos casos, la inserción de una C en el tracto homopolimérico 303-315 (conocido como D310) el cambio más frecuente, seguido de la delección AC en la posición 523-524. Además, el cambio ausente en el tejido tumoral y estadísticamente significativo fue T489C.

Tabla 1. Cambios nucleotídicos de la región HVS-II en pacientes con CaCu

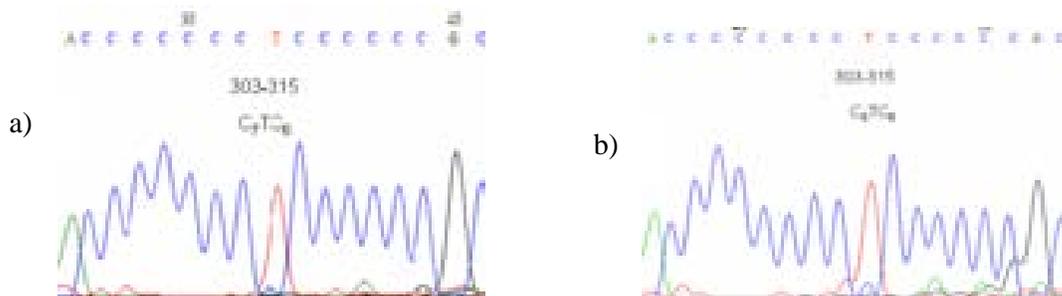
<i>Posición</i>	<i>Base (rCRS)</i>	<i>Cambio de Base</i>	<i>Tejido tumoral (n=25)</i>	<i>CEO (n=16)</i>	<i>P</i>
<b>303-315</b>	C <sub>7</sub> TC <sub>5</sub>	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>	3	2	0.666
		C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	18	12	0.832
		C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub>	3	2	0.961
<b>325</b>	C	T	1	0	0.418
<b>342</b>	T	A	0	1	0.206
<b>373</b>	A	del	1	0	0.418
<b>411</b>	C	G	4	4	0.478
<b>414</b>	T	C	0	1	0.206
<b>418</b>	G	C	1	0	0.418
<b>480</b>	T	C	0	1	0.206
<b>482</b>	T	C	1	0	0.418
<b>489</b>	T	C	0	6	0.001
<b>493</b>	A	G	1	1	0.744
<b>499</b>	G	A	6	6	0.354
<b>523-524</b>	AC	del	15	6	0.159

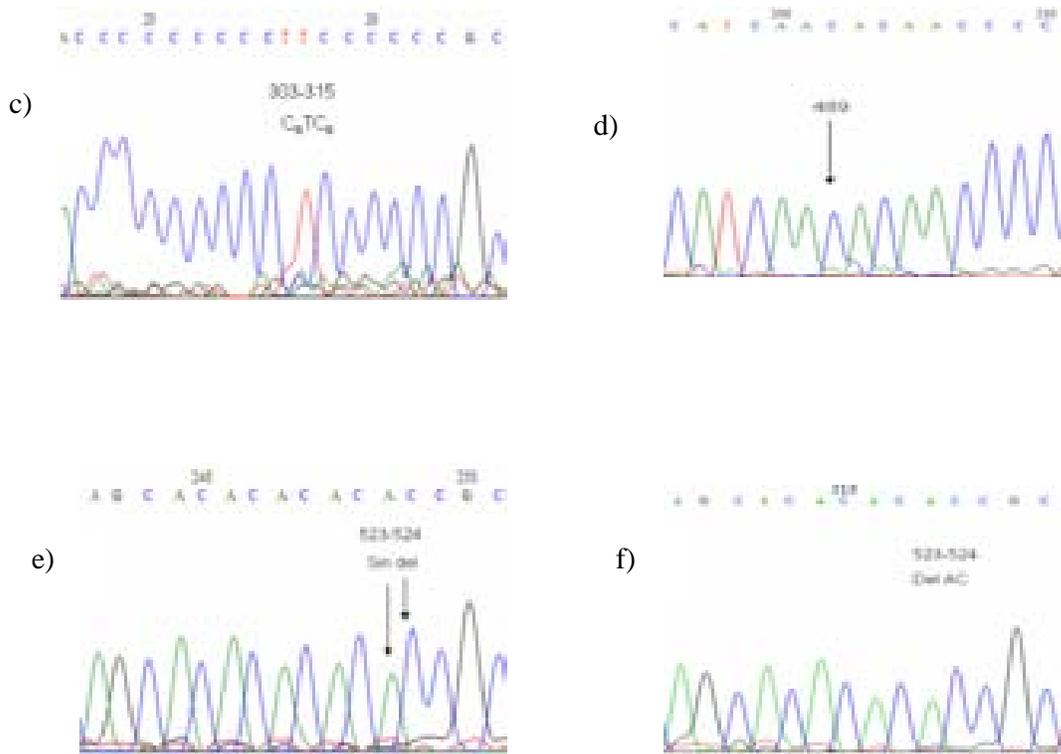
Mientras que en la Tabla 2 se observa que los cambios nucleotídicos de todas las mujeres sanas (consenso) fueron 7 cambios y los más frecuentes fueron la inserción de C en la posición 309 y la delección de AC en la posición 523-524. Además, se identificó que los cambios estadísticamente significativos presentes solo en las pacientes sanas fueron C500T, C527T y T489C. Mientras que el cambio estadísticamente significativo y exclusivo en el tejido tumoral fue el G499A, aunque su RM (ver X.6) nos indicó que no era suficiente para determinar que su presencia aumente el riesgo en CaCu.

Tabla 2. Cambios nucleotídicos de la región HVS-II en el DNAm

<i>Posición</i>	<i>Base (rCRS)</i>	<i>Cambio de Base</i>	<i>Consenso (n=20)</i>	<i>Tejido tumoral (n=25)</i>	<i>P</i>
<b>303-315</b>	C <sub>7</sub> TC <sub>5</sub>	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>	2	3	0.832
		C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	18	18	0.134
		C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub>	0	3	0.109
<b>325</b>	C	T	0	1	0.336
<b>373</b>	A	del	0	1	0.336
<b>411</b>	C	G	1	4	0.240
<b>418</b>	G	C	0	1	0.336
<b>482</b>	T	C	0	1	0.336
<b>489</b>	T	C	3	0	0.045
<b>493</b>	A	G	0	1	0.336
<b>499</b>	G	A	0	6	0.019
<b>500</b>	C	T	4	0	0.019
<b>523-524</b>	AC	del	16	15	0.150
<b>527</b>	C	T	3	0	0.045

A continuación se presentan los electroferogramas parciales de las secuencias que tienen los cambios más representativos tanto en mujeres sanas como en pacientes con CaCu. Entre ellos, a y b muestran las diferentes alternativas que se encontraron en el tracto D310 (C<sub>7</sub>TC<sub>6</sub> y C<sub>8</sub>TC<sub>6</sub>) en pacientes sanas; mientras que en pacientes con CaCu además de estar esas alternativas también estaba c (C<sub>9</sub>TC<sub>6</sub>). Además en d se observa el cambio de una T-C en estado homocigoto. Por último, e y f muestra la delección AC más frecuente encontrada tanto en mujeres sanas como pacientes con CaCu.





**Figura 14.** Electroferogramas parciales de la secuenciación de la región HVS-II del DNAm. a) Secuencia con inserción de C en la posición 315; b) y c) Secuencia con inserción de C<sub>1-2</sub> en el tracto homopolimérico, en la posición 309, acompañado de una inserción de C en la 315; d) Homoplasmia en la posición T489C; e) Secuencia sin delección de AC en la posición 523-524; f) Secuencia con delección AC en posición 523-524.

De esta forma, con las secuencias de mujeres sanas (linfocitos y CEOs) se estableció la secuencia consenso de la región HVS-II en mujeres mexicanas que permitiera a partir de ella identificar los cambios nucleotídicos en el tejido tumoral de cérvix (Tabla3).

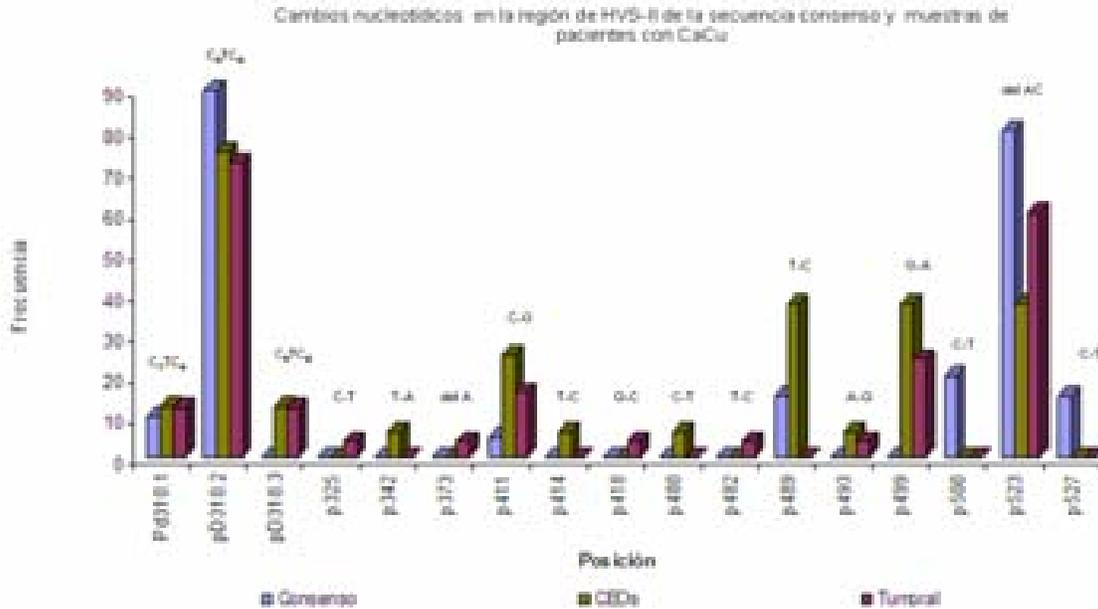
Posteriormente, se graficaron los cambios nucleotídicos encontrados en la secuencia consenso y en pacientes con CaCu (CEOs y tejido tumoral) con respecto a la secuencia de referencia, rCRS (Figura 15). Se observa que la secuencia consenso presentó un total de 7 cambios nucleotídicos, de los cuales 4 de ellos estaban presentes en ambas muestras de pacientes con CaCu (C<sub>7</sub>TC<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>TC<sub>6</sub>, C411G, y del AC en 523-524), de éstos, el cambio C<sub>8</sub>TC<sub>6</sub> y la delección AC en posición 523-524 fueron los más frecuentes. Dichos cambios han sido reportados previamente como polimorfismos, a excepción del cambio C411G. Además se puede ver que los cambios C500T y C527T estuvieron

Tabla 3. Secuencia de la región HVS-II

	Posición	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5				
		0	0	0	1	1	1	2	2	3	4	5	7	7	1	1	1	5	8	8	8	9	9	0	2	2	2	5		
	rCRS	3	7	9	0	2	5	0	5	1	2	0	3	5	1	4	8	0	0	2	9	3	9	0	3	4	7	6		
	Consenso	C	C	C	T	C	C	C	C	A	T	A	A	C	C	T	G	A	T	T	T	A	G	C	A	C	C	C		
		.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	del	del	T	.		
M	1	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.		
	2	.	.	.	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	del	del	.	.	.	
	3	.	.	.	.	.	ins C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.	
	4	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	5	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
U	6	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
	7	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
E	8	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
	9	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
S	10	.	.	ins CC	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
	11	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
T	12	.	.	ins CC	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	13	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
R	14	.	.	.	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
	15	.	.	ins CC	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	del	del	.	.	.
A	16	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	17	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
S	18	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	del	del	.	.	.
	19	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
	20	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
	21	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	22	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.
	23	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	del	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	24	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	25	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	del	del	.	.	.
Líneas	Caski	.	.	.	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	SiHa	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	
	HeLa	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	
	CaLo	.	.	.	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	
	Inbl	.	.	ins C	.	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del	del	.	.	.	

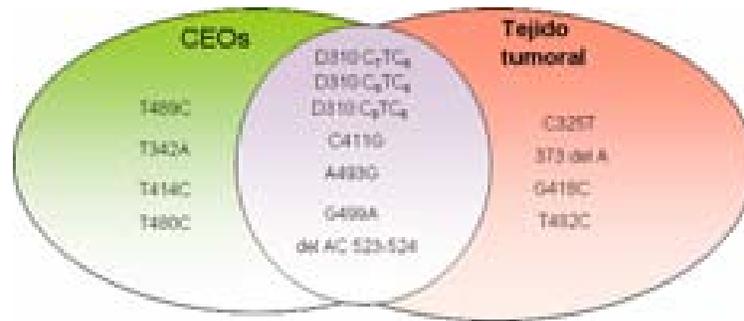
La presencia del punto (.) indica la existencia del mismo nucleótido que en la secuencia de referencia (rCRS). Se muestran la secuencia de rCRSs en color azul

presentes solo en la secuencia consenso, los cuales no han sido descritos ni como polimorfismos ni como mutaciones. Por último, es posible identificar que el cambio T489C no estaba presente en tejido de cérvix con lesión invasora.



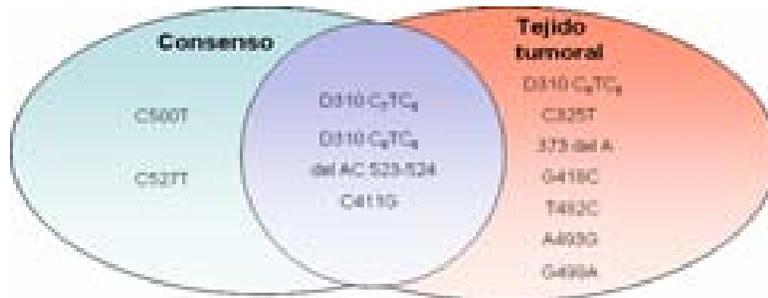
**Figura 15.** Gráfica de frecuencias de cambios nucleotídicos de la región HVS-II en mujeres sanas (consenso) y pacientes con CaCu (CEOs y tejido de cérvix con lesión invasora) con respecto a la rCRS.

A partir de los datos obtenidos fue posible agrupar por un lado los cambios nucleotídicos presentes en las CEOs y tejido tumoral del cérvix de las pacientes con CaCu, y por otro, los cambios entre la secuencia consenso y el tejido tumoral (Figura 16 y 17). En la Figura 16 se observa en el círculo central un total de 7 cambios compartidos en ambos tipos de muestras, de los cuales los más frecuentes en forma descendente fueron en la posición D310, 523-524 y 499. Mientras que los cambios propios de cada tipo de muestra, solo el T489C presente en las CEOs fue estadísticamente significativo.



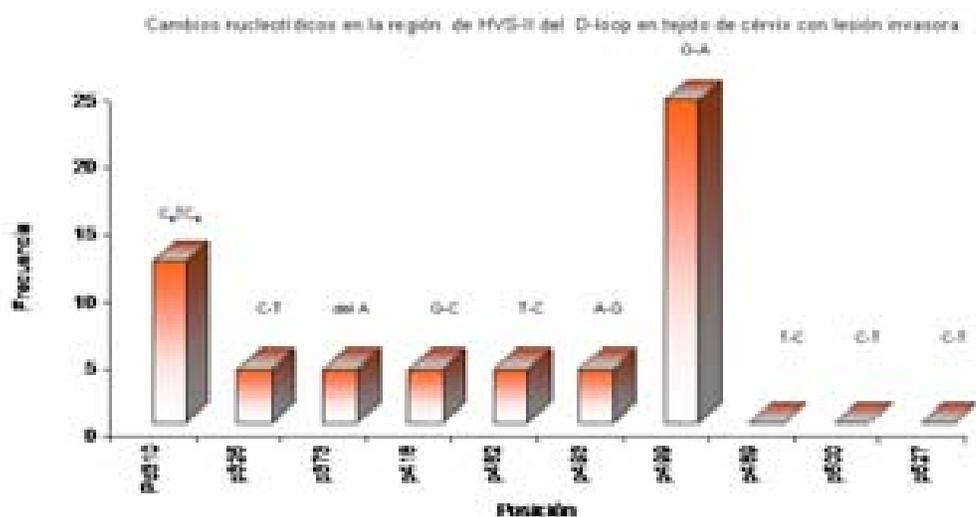
**Figura 16.** Agrupación de cambios nucleotídicos en HVS-II de pacientes con CaCu

De manera similar, en la agrupación de la Figura 16 en el círculo central se encuentran los cambios compartidos en mujeres sana y en tejido tumoral del cérvix, que representan los polimorfismos propios de la población mexicana, de los cuales solo el C411G no ha sido reportado. Además, el único cambio representativo dentro del grupo de tejido tumoral fue el G499A.



**Figura 17.** Agrupación de cambios nucleotídicos en HVS-II de la secuencia consenso y tejido tumoral

Finalmente, se realizó la comparación de frecuencias de los cambios en tejido de cérvix con lesión invasora con respecto a la secuencia consenso (Figura 18), donde se observa claramente que el cambio estadísticamente significativo fue el G499A y que la ausencia de los cambios en posición 489, 500 y 527 pudieran ser cambios nucleotídicos asociados a protección.



**Figura 18.** Gráfica de frecuencias de cambios nucleotídicos de HVS-II presentes en tejido de cérvix con lesión invasora respecto a la secuencia consenso.

En cuanto al análisis de la región HVS-I se identificaron 12 cambios en las CEOs y 13 cambios en tejidos tumorales del cérvix, compartiendo 7 cambios nucleotídicos (Tabla 4). En las CEOs, el cambio más frecuente con un 85% fue C16 223T, seguido de un 40% en A16 183C, 35% en la posición T16 189C, y finalmente con un 20% en A16 182C. Mientras que en los tejidos tumorales fueron los mismos cambios pero con una frecuencia diferente, en un 80% en C16 223T, 40% en T16 189C, 36% en A16 183C y 24% A16 182C.

Tabla 4. Cambios nucleotídicos de la región HVS-I en pacientes con CaCu

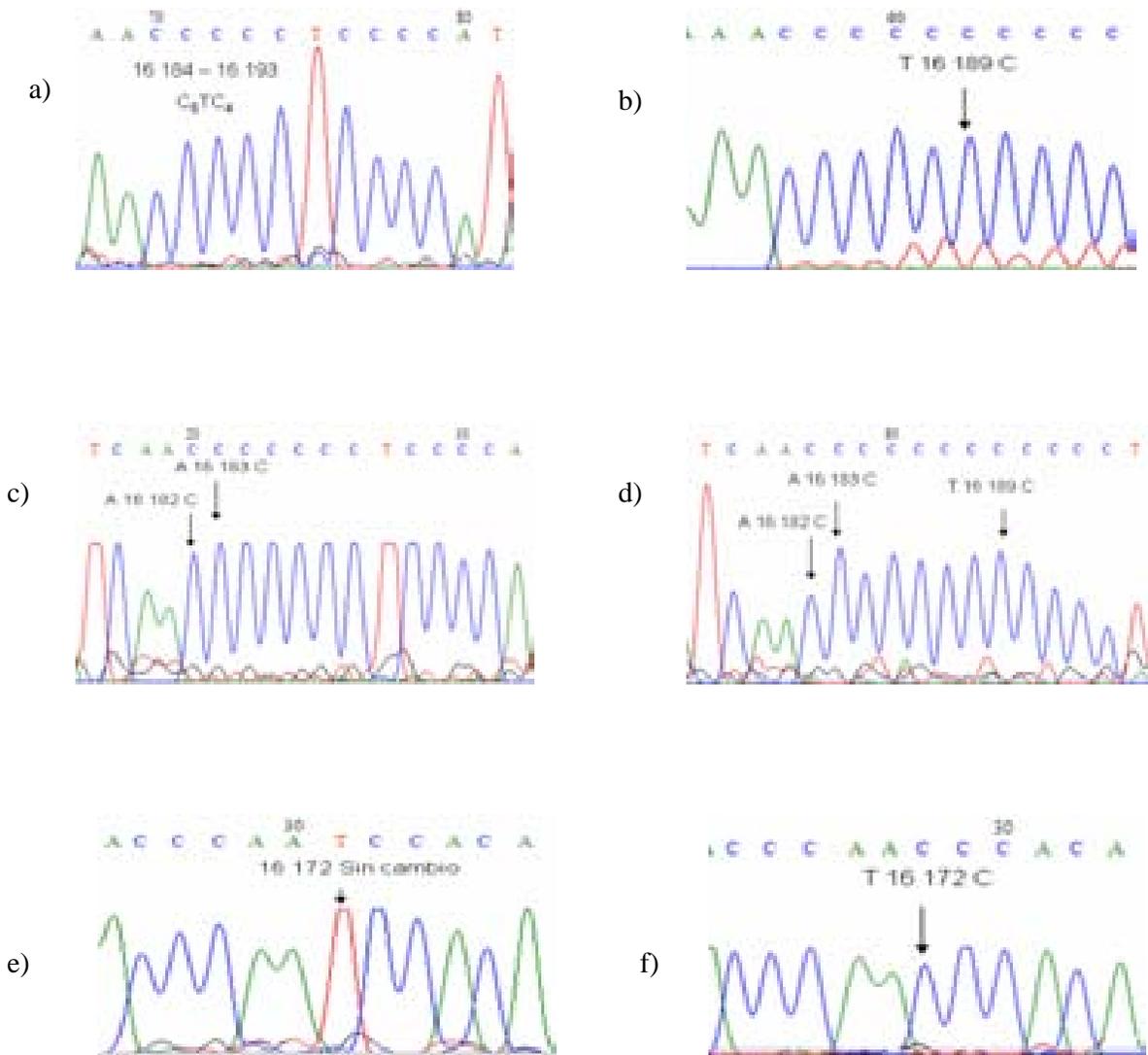
<i>Posición</i>	<i>Base (rCRS)</i>	<i>Cambio de Base</i>	<i>Tejido tumoral (n=25)</i>	<i>Citología Exf. Oral (n=20)</i>	<i>P</i>
<i>16 182</i>	A	C	6	4	0.932
<i>16 183</i>	A	C	9	8	0.785
<i>16 184</i>	C	T	1	1	0.872
<i>16 187</i>	C	T	1	1	0.872
<i>16 188</i>	C	T	0	1	0.258
<i>16 189</i>	T	C	10	7	0.731
<i>16 193</i>	C	ins C	2	0	0.196
<i>16 194</i>	A	C	1	1	0.872
<i>16 204</i>	G	A	0	1	0.258
<i>16 209</i>	T	C	1	0	0.366
<i>16 213</i>	G	A	0	1	0.258
<i>16 217</i>	T	C	0	1	0.258
<i>16 223</i>	C	T	20	17	0.662
<i>16 228</i>	C	T	1	0	0.366
<i>16 231</i>	T	C	1	0	0.366
<i>16 234</i>	C	G	0	1	0.258
<i>16 240</i>	A	del	1	0	0.366
<i>16 241</i>	A	del	1	0	0.366

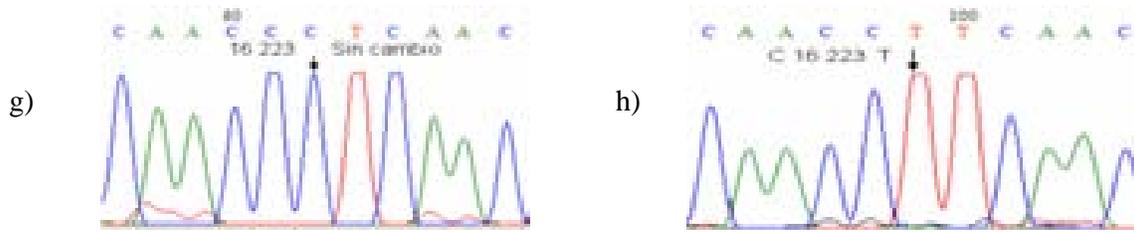
En la tabla 5 se muestran los cambios nucleotídicos entre mujeres sanas (consenso) y pacientes con CaCu (tejido tumoral). De forma general, se encontró que el cambio más frecuente en la región HVS-I fue en la posición 16 223. Además, se identificó que el cambio en la posición T16 172C fue estadísticamente significativo en mujeres sana; mientras que el cambio T16 189C se presentó mayoritariamente en el tejido tumoral (ver X.6).

Tabla 5. Cambios nucleotídicos de la región HVS-I en el DNAm

<i>Posición</i>	<i>Base (rCRS)</i>	<i>Cambio de Base</i>	<i>Consenso (n=16)</i>	<i>Tejido tumoral (n=25)</i>	<i>P</i>
<i>16 172</i>	T	C	4	0	0.019
<i>16 182</i>	A	C	0	6	0.092
<i>16 183</i>	A	C	0	9	0.051
<i>16 184</i>	C	T	0	1	0.418
<i>16 187</i>	C	T	2	1	0.422
<i>16 188</i>	C	G	2	0	0.070
<i>16 189</i>	T	C	2	10	0.051
<i>16 193</i>	C	ins C	0	2	0.246
<i>16 194</i>	A	C	0	1	0.418
<i>16 207</i>	A	G	2	0	0.070
<i>16 209</i>	T	C	0	1	0.418
<i>16 219</i>	A	G	2	0	0.070
<i>16 223</i>	C	T	14	20	0.437
<i>16 230</i>	A	G	2	0	0.070
<i>16 231</i>	T	C	0	1	0.418
<i>16 235</i>	A	G	2	0	0.070
<i>16 240</i>	A	del	0	1	0.418
<i>16 241</i>	A	del	0	1	0.418

A continuación se presentan los electroferogramas parciales de los cambios más frecuentes en la región HVS-I, donde se observa que la mayoría de las sustituciones nucleotídicas en pacientes con CaCu caen dentro de una región rica en C interrumpida por una T (a, b c y d), la cual también presentó sustitución por una C. De tal forma que este tracto homopolimérico de C llega ser hasta de C<sub>12</sub>. En cuanto los cambios T16 172C y C16 223T ambos se encontraron en forma homocigotas.

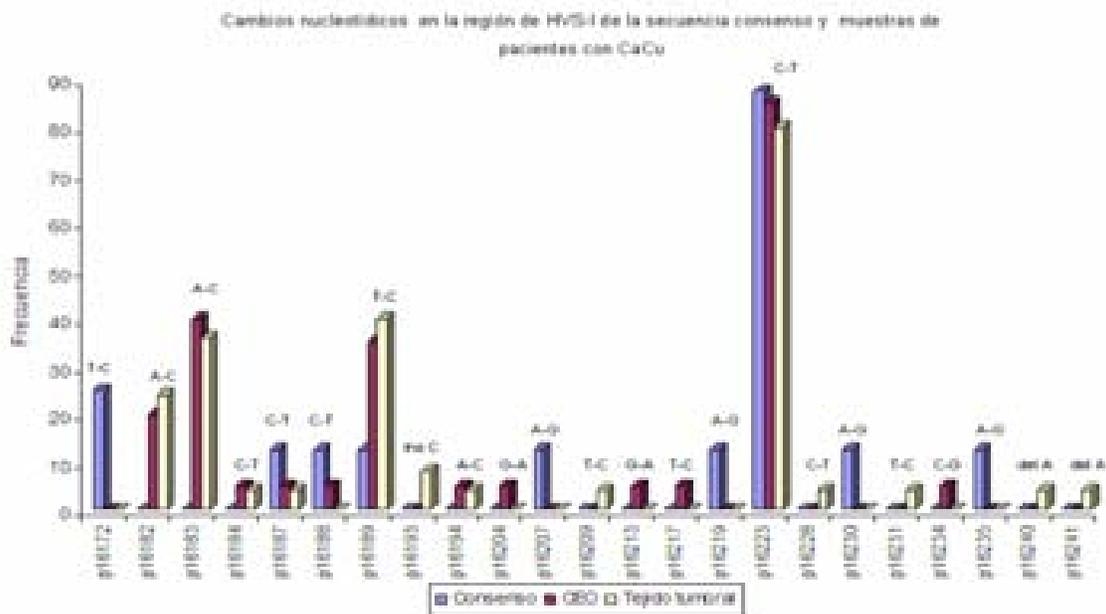




**Figura 19.** Electroferogramas parciales de la secuenciación de la región HVS-I del DNAMt. a) Secuencia de mujeres sanas del tracto C<sub>5</sub>TC<sub>4</sub>, posición 16 184-16 193; b) Cambio en la posición T 16 189 C, con un tracto de C<sub>10</sub>; c) Homoplasmia en posición 16 182 y 16 183, con tracto C<sub>7</sub>TC<sub>4</sub>; d) Homoplasmia en 16 182, 16 183, 16 189, con tracto C<sub>12</sub>; e) Secuencia sin cambio en posición 16 172; f) Homoplasmia en la posición T 16 172 C; g) Secuencia sin cambio en la posición 16 223; h) Homoplasmia más frecuente en mujeres sanas y pacientes con CaCu de C 16 223 T.

De manera similar a la región HVS-II, también se estableció la secuencia consenso de la región HVS-I en mujeres mexicanas a partir del análisis de las secuencias de mujeres sanas (linfocitos y CEOs).

Además se graficaron los cambios nucleotídicos presentes en mujeres sanas (consenso) y pacientes con CaCu (CEOs y tejido tumoral) con respecto a la secuencia de referencia, rCRS (Figura 20). Se observa que las mujeres sanas tuvieron un total de 9 cambios, de los cuales 3 de estos son compartido con pacientes con CaCu (C16 187T, T16 189C y C16 223T); éste ultimo se encontró en más del 80% en ambas mujeres. Además se identificaron 5 cambios exclusivos en mujeres sanas, pero solo el T16 172C fue estadísticamente significativo.



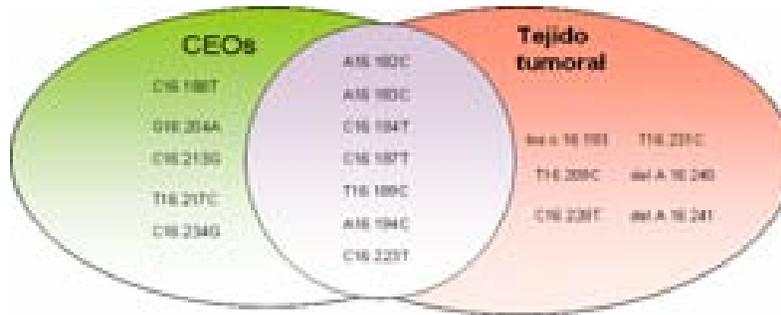
**Figura 20.** Gráfica de frecuencias de cambios nucleotídicos de la región HVS-I en mujeres sanas (consenso) y pacientes con CaCu (CEOs y tejido de cérvix con lesión invasora) con respecto a la rCRS.

Tabla 6. Secuencia de la región HVS-I

	Posición	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		7	7	8	8	8	8	8	8	9	9	9	0	0	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4	5
		1	2	2	3	4	7	8	9	0	3	4	1	7	9	0	9	3	8	0	1	5	0	1	0
	rCRS	A	T	A	A	C	C	C	T	C	C	A	C	A	T	A	A	C	C	A	T	A	A	A	C
	Sana	.	C	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
M U E S T R A S	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	del	del	.
	2	.	.	C	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
	3	.	.	C	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
	4	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
	5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	8	.	.	C	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.
	9	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	10	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	11	.	.	.	C	.	.	.	C	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	12	.	.	.	.	.	.	.	C	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	15	.	.	C	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	17	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	19	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.
	22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	23	.	.	C	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	24	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
Líneas	Caski	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	
	SiHa	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	
	HeLa	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	
	CaLo	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	
	Inbl	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	

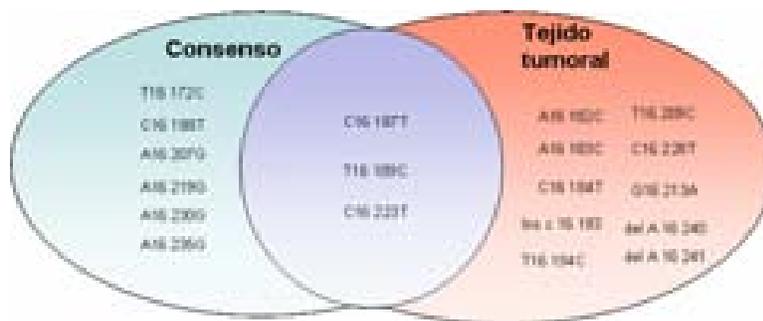
La presencia del punto (.) indica la existencia del mismo nucleótido que en la secuencia de referencia (rCRS). Se muestran la secuencia de rCRSs en color azul.

Mediante la agrupación de cambios nucleotídicos presentes en las CEOs y tejidos tumorales de paciente con CaCu se identificó que ambas muestras comparten 7 cambios, donde los más frecuentes fueron se localizaron en la posición 16 182, 16 183 y 16 187 (Figura 21). Mientras que en los extremos de cada agrupación se localizaron los cambios característicos de cada tipo de muestra, los cuales se presentaron en una baja frecuencia.



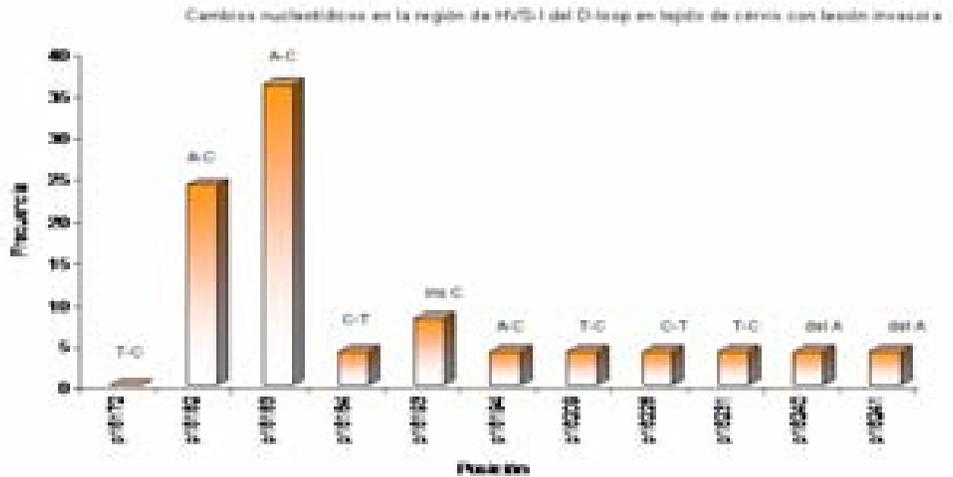
**Figura 21** Agrupación de cambios nucleotídicos en HVS-I de pacientes con CaCu

Posteriormente, se agruparon los cambios nucleotídicos de la región HVS-I presentes en la secuencia consenso y del tejido tumoral (Figura 22). En el círculo central se encontraron los cambios presentes tanto en mujeres sanas como el tejido tumoral de cérvix, lo que corresponde a los polimorfismos presentes en la población mexicana, siendo el C16 223T el más frecuente y el T16 187C el más recurrente y el estadísticamente significativo en tejido con lesión invasora del cérvix.



**Figura 22.** Agrupación de cambios nucleotídicos en HVS-I de la secuencia consenso y tejido tumoral

Consecutivamente, se comparó la frecuencia de los cambios nucleotídicos presentes en el tejido de cérvix con lesión invasora respecto a la secuencia consenso. En la Figura 23 se observa que el cambio en la posición 16 182 y 16 183 fueron los más frecuentes. Mientras que la ausencia del cambio 16 172 en los tejidos tumorales fue estadísticamente significativo, lo que tal vez pueda representar un cambio nucleotídico asociado a protección.



**Figura 23.** Gráfica de frecuencias de cambios nucleotídicos presentes en tejido de cérvix con lesión invasora respecto a la secuencia consenso.

Por otra parte, las secuencias se agruparon en haplotipos de acuerdo a los cambios nucleotídicos que presentaban (ver X.7). De esta manera, se obtuvieron 19 haplotipos para la región HVS-II y 16 haplotipos para la región HSV-I. En base a estos haplotipos se buscó estadísticamente su relación con la infección de HPV (Tabla 7).

El haplotipo más frecuente de la región HVS-II fue el HapII-7, en un 32% en las pacientes con CaCu y en un 40% en mujeres sanas. Este haplotipo se caracterizó por la inserción de una citosina en la posición 303 y 315 (C<sub>8</sub>TC<sub>6</sub>) y acompañado de la delección AC en la posición 523-524.

En cuanto a la región HVS-I, el cambio de la posición C16 223T en forma homocigota, que corresponde al haplotipo HapI-1 fue el más frecuente, con una frecuencia de 40% en las pacientes con CaCu y un 62 % en mujeres sanas. Además, en esta región se encontró que el 44% del tejido de cérvix con lesión invasora y 40% de las CEOs de las

pacientes con CaCu se ve modificado su tracto homopolimérico de C, en la posición 16 184-16 193 de C<sub>5</sub>TC<sub>4</sub> a C<sub>7</sub>TC<sub>4</sub>, C<sub>10</sub> o C<sub>12</sub>, el cual se conserva sin ninguna modificación en el 100% de las mujeres sanas.

Tabla 7. Presencia de infección y haplotipos mitocondriales en pacientes con CaCu

<i>Muestra</i>	<i>HPV 16 CaCu (n=25)</i>	<i>Haplotipos HVS-II</i>	<i>Haplotipos HVS-I</i>
<i>1</i>	+	HapII-7	HapI-13
<i>2</i>	+	HapII-4	HapI-3
<i>3</i>	+	HapII-5	HapI-3
<i>4</i>	-	HapII-6	HapI-8
<i>5</i>	+	HapII-7	HapI-1
<i>6</i>	+	HapII-7	HapI-1
<i>7</i>	+	HapII-12	HapI-1
<i>8</i>	-	HapII-7	HapI-4
<i>9</i>	+	HapII-10	HapI-10
<i>10</i>	+	HapII-18	HapI-2
<i>11</i>	+	HapII-11	HapI-8
<i>12</i>	+	HapII-17	HapI-6
<i>13</i>	+	HapII-6	HapI-1
<i>14</i>	-	HapII-2	HapI-1
<i>15</i>	+	HapII-19	HapI-3
<i>16</i>	+	HapII-6	HapI-1
<i>17</i>	+	HapII-7	HapI-5
<i>18</i>	+	HapII-15	HapI-1
<i>19</i>	+	HapII-11	HapI-7
<i>20</i>	-	HapII-7	HapI-1
<i>21</i>	+	HapII-13	HapI-15
<i>22</i>	+	HapII-7	HapI-1
<i>23</i>	+	HapII-8	HapI-3
<i>24</i>	-	HapII-9	HapI-5
<i>25</i>	-	HapII-4	HapI-1

Para determinar la asociación de los haplotipos y la infección por HPV se agrupo a las muestras con HPV16 + y HPV16 – de acuerdo a su haplotipos presente en la región HVS-I y HVS-II (Tabla 8 y 9).

En las tablas 9 y 10 se puede observar que la *P* de las dos regiones HVS-I y HVS-II, son  $> 0.05$ , los que nos indica que en ambos casos, la presencia de cualquier haplotipo en el DNAm no esta asociado con la presencia del HPV, es decir, cualquier cambio nucleotídico presente en las regiones hipervariables del D-loop del DNAm no son asociadas a la infección de HPV16.

Tabla 8. Asociación de haplotipos de la región HVS-II e infección por HPV

<i>Haplotipos</i>	<i>HPV 16</i> <i>No. (%)</i>		<i>P</i>
	+	-	
	(n=19)	(n=6)	
<i>HapII-2</i>	0	1 (16.7)	0.069
<i>HapII-4</i>	1 (5.3)	1 (16.7)	0.369
<i>HapII-5</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapII-6</i>	2 (10.5)	1 (16.7)	0.687
<i>HapII-7</i>	5 (26.3)	2 (33.3)	0.739
<i>HapII-8</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapII-9</i>	0	1 (16.7)	0.069
<i>HapII-10</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapII-11</i>	2 (10.5)	0	0.407
<i>HapII-12</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapII-13</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapII-15</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapII-17</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapII-18</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapII-19</i>	1 (5.3)	0	0.566

Tabla 9. Asociación de haplotipos de la región HVS-I e infección por HPV

<i>Haplotipos</i>	<i>HPV 16</i> <i>No. (%)</i>		<i>P</i>
	+	-	
	(n=19)	(n=6)	
<i>HapI-1</i>	7 (36.8)	3 (50)	0.566
<i>HapI-2</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapI-3</i>	4 (21.1)	0	0.220
<i>HapI-4</i>	0	1 (16.7)	0.069
<i>HapI-5</i>	1 (5.3)	1 (16.7)	0.369
<i>HapI-6</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapI-7</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapI-8</i>	1 (5.3)	1 (16.7)	0.369
<i>HapI-10</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapI-13</i>	1 (5.3)	0	0.566
<i>HapI-15</i>	1 (5.3)	0	0.566

Por otra parte, se determinó la diferencia estadística de las características de los datos clínicos de los casos y los controles mediante el uso de la prueba de  $X^2$  y la prueba  $t$  (Tabla 10).

Tabla 10. Características clínicas de las pacientes en el estudio

<i>Factor de riesgo</i>	<i>CaCu</i>	<i>Sanas</i>	<i>P</i>
<i>Edad</i>	50.3 ± 10.5	27 ± 3.9	< 0.01
<i>Edad de menarca</i>	13.1 ± 1.3	12.0 ± 0.7	0.124
<i>Edad de menopausia</i>	47.2 ± 5.1	-----	-----
<i>Edad de inicio de vida sexual</i>	17.6 ± 1.9	20.1 ± 1.6	< 0.01
<i>No. de parejas</i>	1.5 ± 0.87	2.1 ± 0.87	0.039
<i>No. partos</i>	4.2 ± 2.1	0.1 ± 0.31	< 0.01
<i>Tabaquismo</i>	36%	30%	0.735
<i>Educación (&gt; Secundaria)</i>	8%	100%	< 0.001

En la tabla 10 se observa que existe una diferencia significativa de edades entre las pacientes con CaCu y las sanas, así como en la edad de inicio de vida sexual, el número de partos y la educación. Esto nos indica que estos factores están relacionados con un incremento en el riesgo de CaCu.

## VI. 6. Construcción de Base de datos de DNAm

De la base de datos mtDB-Human Mitochondrial se seleccionaron de forma azarosa 92 secuencias completas de DNAm, aproximadamente de 8 a 10 secuencias de diferentes poblaciones alrededor del mundo: África, Asia, América del Norte, América del Sur, Europa. Además, se incluyó la secuencia de referencia (rCRS) de la base de datos MITOMAP.

Con el apoyo del Dr. Gerardo Coello Coutiño, del Instituto de Fisiología Celular, se realizó el programa ejecutable en Perl que permitiera delimitar dentro de todo el genoma mitocondrial a la región D-loop.

## Programa DNAmitocondrial.pl

```
#!/usr/bin/perl -w

use Bio::DB::Fasta;
use Bio::AlignIO;
use Bio::Tools::Run::StandAloneBlast;
use Bio::Seq;
use strict;

my ($id, $count, $seq, $report);
$count=0;
my $inputfilename = 'secuencias.fasta';

my $str = Bio::SeqIO->new(-file=>$inputfilename, 'format'=>'Fasta');

my $seqout = Bio::SeqIO->new(-file => 'mito_human_dloop.fasta', 'format'=>'Fasta');

while (my $seq = $str->next_seq()) {

    my $longitud = $seq->length();
    next if($longitud < 16017);
    my $subseq_ini = Bio::Seq->new( -display_id => $seq->display_id(),
    -seq => $seq->subseq(1,574));
    my $residuo_final;
    if ($longitud < 16529 ) {
        $residuo_final = $longitud;}
    else {$residuo_final = 16529;}
    my $subseq_fin = Bio::Seq->new( -display_id => $seq->display_id(),
    -seq => $seq->subseq(16017,16529));

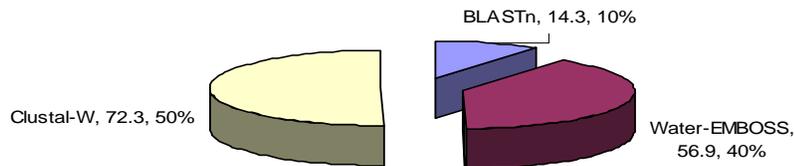
    my $seq_dloop = Bio::Seq->new( -display_id => $seq->display_id(),
    -seq => $subseq_fin->seq() . $subseq_ini->seq());

    print $seq->display_id(),"\t", $seq_dloop->length(), "\n";

    $count++;
    # print "SEQ $count ", $seq->display_id(),"\t", $seq->length(), "\n";
    $seqout->write_seq($seq_dloop);}
```

Para determinar la confiabilidad del uso del programa se buscó cambios nucleotídicos mediante un Blastn, un alineamiento pareado en Water-EMBOSS, utilizando la secuencia de referencia (rCRS) y un alineamiento múltiple utilizando Clustal W ejecutado dentro del programa desarrollado. Para ello, se eligió 10 secuencias al azar de la región HVS-II, y se sometieron al análisis haciendo uso de las tres herramientas antes

mencionadas. De tal forma, que el total de cambios nucleotídicos, tanto anotados como no reportados fue para Clustal W un 72.3%, seguido de Water-EMBOSS con un 56.7% y finalmente muy por debajo Blastn con un porcentaje de 14.3% (Figura 24).



**Figura 24.** Porcentaje de cambios nucleotídicos detectados por tres métodos bioinformáticos.

Por lo tanto, se hizo uso del programa para analizar las secuencias obtenidas tanto del amplificado de la región HVS-II como de la región HVS-I, de modo que el orden de análisis de cada secuencia fue el siguiente: a) Blastn, para determinar que la región amplificada fuera específica para D-loop del DNAm humano y después b) alinear con Clustal-W.

De forma general, los resultados obtenidos se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Todas las pacientes con CaCu presentaron cambios nucleotídicos en la región HVS-I y HVS-II,  $5.6 \pm 1.6$  cambios/paciente con respecto a la secuencia de referencia (rCRS).

En la región HVS-II:

- Se encontró un total de 17 cambios, de los cuales 11 son polimorfismos ya anotados y los otros 6 son nuevas mutaciones.
- Se identificó 4 polimorfismos más frecuentes en mujeres mexicanas, donde el único no reportado es el C411G.
- La inserción de C en posición 315 del tracto D310 se presentó en todas las muestras analizadas (mujeres sanas y pacientes con CaCu).
- El 90% de las mujeres sanas y el 70% de las pacientes con CaCu mostraron la inserción de C en la posición 309 del tracto D310.

- El 20% de las mujeres sanas y el 40% de las pacientes con CaCu no presentaron la delección AC en la posición 523-524.
- En tejido de cérvix con lesión invasora se encontraron 7 cambios nucleotídicos, de los cuales 5 son polimorfismos ya anotados, donde el más representativo fue el G499C en un 24%. Mientras que los otros 2 cambios fueron nuevas mutaciones.

En la región HVS-I:

- Se encontró un total de 23 cambios nucleotídicos, de los cuales 18 fueron polimorfismos ya reportados y 5 nuevas mutaciones.
- Se identificaron 3 polimorfismos previamente descritos en las mujeres mexicanas de este estudio.
- El polimorfismo C16 223T se encontró en más del 80% de la población estudiada (casos y controles).
- En tejido de cérvix con lesión invasora se presentaron 10 cambios nucleotídicos: 7 polimorfismos ya anotados y 3 nuevos.
- El polimorfismo T16 189C se observó en mayor frecuencia en el tejido tumoral, con un 38% con respecto a la secuencias consenso.
- Los cambios A16 182C y A16 183C se identificaron en un 36% en el tejido tumoral.

Y finalmente:

- No se encontró relación entre los cambios nucleotídicos en las regiones hipervariables y la presencia de la infección por HPV.

## VII. DISCUSIÓN

En el proceso de desarrollo de cáncer, existe una serie de eventos que provocan un daño en el DNA de las células, originando un control desregulado que se traduce en una proliferación celular. Estas células tumorales presentan una diferencia significativa a nivel genético, bioquímico e histológico con respecto a las células sanas. Se ha descrito que las células tumorales presentan una alta demanda energética, y que las vías más activa para la obtención de energía son la glucólisis y la fosforilación oxidativa, aunque esta última disminuye su capacidad en algunas de ellas. Sin embargo, durante la producción de ATP también se generan altos niveles de ROS, que en conjunto con factores externo (fármacos, radiaciones, etc.) provocan mutaciones en el DNAm, el cual se encuentra en el interior de la mitocondria. Estas mutaciones se pueden localizar tanto en genes estructurales mitocondriales, como en genes que codifican RNAt. Las mutaciones que se localizan en los genes estructurales, afectan la actividad del complejo que forman parte, pero si es en alguno de los RNAt pueden afectar a más de un complejo. Sin embargo, las mutaciones que caen dentro del la región control, es decir la región no codificante del DNAm, puede afectar la replicación y transcripción de ambos.

A la fecha, existe evidencia de acumulación de mutaciones principalmente en la región D-loop en diferentes tipos de cáncer, permitiendo la especulación de que estas mutaciones, posiblemente puedan favorecer la progresión del tumor. Pocos son los estudios que analizan las mutaciones del DNAm y el relación con el estado clínico del paciente. Por ejemplo, un estudio en el 2003 identificó la asociación de un alto número de mutaciones en el DNAm en cáncer de pulmón en diferentes estadios del tumor. [94]. En ese mismo año, Carew y cols, determinaron que el alto número de mutaciones estaba presente en los pacientes expuestos a quimioterapéuticos, asociado a un incremento en la generación de ROS y a una resistencia al tratamiento [95]. En el 2006, Allalunis reporta una alta frecuencia de cambios nucleotídicos en el Complejo I del DNAm, asociados con un mal pronóstico en pacientes con CaCu [74]. Sin embargo, hasta el momento se desconocen las implicaciones a nivel molecular de estos cambios nucleotídicos en el proceso carcinogénico, localizadas en esta región estructural y funcionalmente importante.

De esta forma, los avances en la búsqueda de alteraciones en el DNAMt en los diferentes tipos de cáncer han permitido conocer que en la mayoría de ellos existe una alta frecuencia de cambios nucleotídicos en la región D-loop. Por tipo de cáncer estas frecuencias se distribuyen en: 42% en pulmón, 55% en esófago, 74% en mama, 33% en ovario, 44% en colon, 48% en endometrio, 20% en próstata, 30% en tiroides, 37% en estómago, 39% en sistema nervioso, 21% en cabeza y cuello, 59% en hígado, 46% riñón y 33% en leucemias[65-85].

El primer reporte de alteraciones en el DNAMt en cáncer de cérvix uterino fue en el 2005, por Sharma y cols. Ellos estudiaron una población de 19 mujeres de la India con CaCu, encontrando una incidencia de 95% de mutaciones (considerando como mutación el cambio que se presentó en al menos una muestra) en la región D-loop en estas pacientes, sin hacer mención del estado de homo o heteroplasmia predominante. El segundo estudio, fue realizado por Allalunis en el 2006, en el cual, determinaron altas frecuencias de sustituciones nucleotídicas pero en las subunidades del Complejo I, asociadas a un pobre pronóstico de vida de la paciente [73-74].

En el presente estudio, se determinó por secuenciación los cambios nucleotídicos (polimorfismos/mutaciones) en uno de los puntos calientes “hot spot” de cada región hipervariables (HVS-I y HVS-II), cubriendo el 57% de la región D-loop. De acuerdo con lo esperado, todas las pacientes en este estudio presentan cambios en ambas regiones hipervariables del DNAMt. En general, cada paciente con CaCu presentó en promedio  $5.9 \pm 1.65$  cambios por las dos regiones analizadas y  $3.8 \pm 0.89$  para mujeres sanas. En ambos casos la región HVS-I fue la más susceptible a cambios [29, 65-66].

Se encontró que la región HVS-II es más polimórfica que la HSV-I con respecto a la secuencia de referencia (rCRS). En promedio se presentaron  $3.75 \pm 0.84$  y  $2.4 \pm 0.94$  cambios nucleotídicos por paciente con CaCu y mujer sana, respectivamente. Además, en el total de las muestras y líneas celulares de CaCu se encontró la inserción de C en la posición 315, lo que nos podría indicar que esta inserción ha sido heredada a través de generaciones, lo que permite hacer una reconsideración de la rCRS en el tracto D310 (303-315), donde después de la T debe estar presente 6 C en lugar de 5. También, los cambios más frecuentes fueron por un lado en el tracto D310, por inserción de C antes de la T y por otro la delección AC en la posición 523-524. De esta manera se estableció la secuencia de referencia de HVS-II del D-loop en mujeres mexicanas, la cual permitió

identificar los cambios nucleotídicos presentes en el tejido tumoral de cérvix. En este tejido se presentó en promedio 11 cambios nucleotídicos, de los cuales 4 fueron polimorfismos propios de la población y de los 7 restantes, 5 son polimorfismos ya descritos y 2 son nuevas mutaciones. Además, el polimorfismo más frecuente fue el G499A, el cual también se observó en las CEOs de las pacientes con CaCu, por lo que posiblemente pueda ser un marcador de la enfermedad. A pesar de que este cambio fue estadísticamente significativo, su RM nos indicó que la presencia del cambio en cuestión no necesariamente aumenta el riesgo en este tipo de neoplasia, por lo que sería recomendable ampliar el número de muestras para determinar la influencia de estos cambios en CaCu.

En cuanto a la polimórfica HVS-I, ésta se conservó más estable con un  $2.2 \pm 1.25$  y  $2 \pm 1.7$  cambios por paciente con CaCu y sana, respectivamente. En general, se presentó en la mayoría de las muestras el cambio en la posición C16 223T. De igual forma que en la región HVS-II, se estableció la secuencia consenso de la región HVS-I del D-loop en mujeres mexicanas. A partir de las secuencias consenso, se determinó un total de 13 cambios nucleotídicos en el tejido tumoral de cérvix, de los cuales 10 son polimorfismos ya anotados y 3 son nuevas mutaciones. Dentro de los cambios nucleotídicos más frecuentes en tejido de cérvix con lesión invasora con respecto a la secuencia consenso fue el T16 189C; y de los polimorfismos más frecuentes únicos del tumor fueron A16 182C y A16 183C. Además, se observó en las muestras de mujeres sanas la presencia de un cambio estadísticamente significativo, el T16 172C, lo que sugiere que este cambio sea un indicativo de una protección o bien un estado normal; para comprobar esto es necesario ampliar el número de muestras. Finalmente, la condición de homoplasmia predominó notablemente.

En un inicio, se esperaba que la CEO de la paciente con CaCu fuera un control interno de la muestra de tejido tumoral, sin embargo se encontró una gran variabilidad entre ellas, pero no en las mujeres sanas, lo que sugiere que a pesar de que el epitelio oral está expuesto a diferentes condiciones físicas y químicas al de un epitelio cervical en una persona sana, los cambios se mantienen homogéneos, variando en un 10% y hasta un 46% cuando se trata de personas fumadoras (más de 10 cigarrillos al día), de acuerdo a un estudio de Tan D y cols [95]. De modo que, cuando la paciente presenta CaCu, la heterogeneidad de los cambios a nivel D-loop del DNAm, varían aún cuando no se trate del tejido afectado, tal vez se pueda deber al ambiente que están generando las

células tumorales del cérvix, el cual es reconocido por otros tejidos como un aviso de alerta de daño del tejido afectado. Cabe mencionar, que en este estudio, la edad de las pacientes con CaCu estaba en un intervalo de  $50 \pm 10.5$  años, lo que representó una diferencia estadísticamente significativa con las mujeres sanas. Este punto es uno de los factores involucrados en la frecuencia de mutaciones en el DNAm, pues numerosos estudios han descrito que el factor de la edad está relacionado con la acumulación de mutaciones en el DNAm que pueden diferir en origen, distribución y tipo de tejido observado, originadas por errores de la DNA polimerasa mitocondrial y el incremento de ROS [96-98]. De allí que también se sugiera que los cambios de las CEOs en muestras de pacientes con CaCu fuera diferente por el hecho de tratarse ya de personas mayores.

A su vez, se pudo determinar estadísticamente que el factor de la edad, la edad del inicio de la vida sexual, el número de partos, la infección por HPV y la educación son factores de riesgo para el desarrollo del cáncer. De éste último, es importante destacar que la mayoría de personas que padecen de CaCu poseen bajo nivel académico, y en consecuencia, muestran un desinterés ante las campañas de salud que actualmente se realizan para prevenir el CaCu.

En cuanto a la infección por HPV 16, se determinó que la presencia de cambios nucleotídicos no está asociada estadísticamente con la infección de HPV 16. De hecho, la prueba que soporta esto es la búsqueda de cambios en ambas regiones hipervariables de DNAm en cinco líneas celulares de CaCu, donde si fuera el caso, CaLo y SiHa, que poseen el mismo tipo viral, hubieran mostrado un patrón de cambios semejante. De manera que las 5 líneas celulares de CaCu presentaron cambios que se encontraron en las células sanas y cambios en baja frecuencia presentes en tejido tumoral. Así que dentro de este contexto, se sugieren dos puntos: a) el hecho de tener una infección por HPV 16 no implica que se pueda presentar cambios nucleotídicos en la región HVS-I y/o HVS-II en el D-loop; b) El hecho de tener los cambios nucleotídicos en la región HVS-I o HVS-II no es un indicativo que la pacientes sea más susceptible a tener una infección.

Por otro lado, muchos de los cambios nucleotídicos determinados en la región HSV-II y HSV-I, tanto en pacientes sanas como con CaCu fueron transiciones del tipo C-T, T-C, seguidos de A-G, y algunas deleciones, como el caso de la deleción en la posición

523-52 de AC. Esto indica que el DNAm es altamente susceptible a transiciones y probablemente los factores más importantes para desencadenar esos cambios sea el estrés oxidativo y errores en la replicación; estos datos coinciden con reportes en ovario, cérvix, mama, tiroides, riñón y tracto gastrointestinal [67-68, 70-71, 77-78]. Sin embargo, el patrón de heteroplasmia como en muchos otros estudios no se presentó; al contrario, existió una alta incidencia de homoplasmia y alguno que otro caso de heteroplasmia en la región HVS-II, por que en la región HVS-I fue exclusivamente de homoplasmia. Se ha demostrado que el estado de homoplasmia puede ser un cambio de la célula progenitora del tumor, donde en algunos caso se apoya la teoría que existe por ventajas replicativas del DNAm, y otra es que no existan ventajas replicativas, solo por eventos al azar, la cual es soportado por modelos bioinformáticas que muestran a través de la replicación imparcial del DNAm las divisiones celulares y la homoplasmia [99-100]

Además, se detectaron alta frecuencia de microsatélites de inestabilidad mitocondrial (mtMSI). Se observaron mtMSI en las dos regiones hipervariables, que incluyeron la posición 303-315 (D310) y la posición 16 184-16 193, presentes en el tejido tumoral, siendo la segunda un evento estadísticamente significativo en esta neoplasia. De hecho, Liu VW y cols. encontraron en cáncer de endometrio tres sitios importantes de mtMSI: inserciones de C en D310 y 16 184-16 193, y repetidos de CA en 514-523. Sin embargo, en cáncer de cérvix los repetidos de CA no fueron identificados; en lugar de ello, se presenta la deleción AC en 523-524, la cual es más frecuente en pacientes sanas que en pacientes con CaCu, hecho que contradice también los hallazgos encontrados en el estudio de Sharma H y cols. en cáncer de cérvix, ya que ellos observan mtMSI en la posición D310 y 514-523 y no en 16 184-16 193 [69, 73]. De tal forma, que los mtMSI de la región 16 184 –16 193 que van desde inserciones de C conservando la T en la posición 16 189, pero en muchas de ellas acompañadas con sustitución de T16 189C, en lugar a un tracto homopolimérico que va desde C<sub>11-12</sub> que se han descrito en tumores de endometrio y glioblastomas. Un estudio de Poulton y cols. determinaron que esta variante en la secuencia es un factor de predisposición en la Diabetes tipo II. Por su parte, Lui VW y cols. al trabajar con cáncer de endometrio sugirieron que el cambio en esa posición pueda ser un factor de predisposición. El último estudio del 2006, Wang Y y cols. encontraron 12 mtMSI en tumores femeninos (ovario, cérvix, mama y endometrio), dentro de los cuales destacan el mtMSI 16 189 que encuentran en una alta frecuencias en endometrio con respecto los otros tipos de tumor, sugiriendo de este

modo que el tracto C interrumpido por T es un hot spot para endometrio, pero además, lo proponen como un polimorfismo de susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de mama [ 69, 74].

El hecho de una alta frecuencia de mtMSI y principalmente en tractos homopoliméricos de C, nos indican por un lado que la replicación del DNAm<sub>t</sub> en células neoplásicas esta alterada, o bien exista un alto déficit en la reparación del DNA, que en conjunto se traduce en una alteración de la mitocondria a nivel de replicación.

Ahora bien, recordemos que el tracto D310 se localizan el bloque de secuencia conservada 2 (CSBII), que es un elemento esencial para la replicación del DNAm<sub>t</sub>, mientras el cambio nucleotídicos C 411 G, no reportado ni como polimorfismo ni mutación se localiza dentro de la secuencia del Promotor de transcripción de la cadena ligera y por último, el polimorfismo que fue altamente significativo G499A, hasta el momento no se ha encontrado que sea el sitio de unión para algún factor de transcripción (búsqueda por TRANSFAC). Sin embargo, está flanqueado por sitios de unión de T<sub>fam</sub>, importantes en el proceso de transcripción [22, 99]. A pesar de que no se conoce la implicación molecular de estos cambios y como afecta en el proceso de transcripción o replicación, nos hacen pensar por un lado que en una célula tumoral, la presencia de mtMSI es el reflejo de una aceleración de la actividad de la replicación de la DNAPol mitocondrial, y por ende una ineficiencia en la polimerización y sobre todo en la corrección de errores. Estos errores pueden presentarse dentro y fuera de tractos homopoliméricos como es el caso de la posición 499. En cuanto a la región HSV-I hasta el momento no se ha descrito factor alguno de transcripción o replicación que se una a esa secuencia.

Por último cabe mencionar que estos resultados fueron obtenidos gracias a un adecuado análisis de secuencias que fue posible con ayuda del programa desarrollado. Por tal motivo, es necesario en cualquier análisis tenga en cuenta los siguiente: a) saber que base de datos existen con referente a el objeto de estudio, en este caso DNA mitocondrial; b) seleccionar una base de datos o crear la propia; y c) saber que método utilizar para un alineamiento de secuencias.

En este estudio, fue posible determinar que MITOMAP no es la única base de datos que se deben tomar como referencia, ya que esta en función de la población a estudiar. Así

que la construcción de una propia base de datos es en un principio un trabajo arduo por la selección e secuencias, pero posteriormente es una puerta abierta para ingresar nuevas secuencias de forma más amigable.

## VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Este estudio nos permitió identificar que todas las pacientes con CaCu presentaron cambios en la región HVS-I Y HVS-II del D-loop del DNA mitocondrial.
- El polimorfismo G499A y el T16 189C en el D-loop del DNA mitocondrial son frecuentes en tejido del cérvix con lesión invasora.
- Las mutaciones reportadas en otros tipos de cáncer son un evento poco frecuente en cáncer de cérvix.

Como perspectivas tenemos:

- Un estudio donde implique un mayor número de muestras.
- Búsqueda de los polimorfismos G499A y T16 189C en lesiones precursoras del cérvix.

## IX. REFERENCIAS

1. Krauss S. (2001) *Mitochondrial: structure and role in respiration*. ELS. 1-6.
2. Martin W, Müller M. (1998) *The hydrogen hypothesis for the first eukaryote*. Nature. 392(6691):34-41.
3. Cummins J. (2005) *Mitochondrial DNA: Fate of the paternal mitochondrial genome*. ELS. 1-8.
4. Carew J, Huang P. (2002) *Mitochondrial defect in cancer*. Mol Cancer. 1(9):1-12.
5. Abnet CC, Hupp K, Carrera A, Armistead D, McKenney K, Hu N, Tang Z, Taylor P, Dawsey SM. (2004) *Control region mutations and the common deletion are frequent in the mitochondrial DNA of patients with esophageal squamous cell carcinoma*. BMC Cancer. 4(30):1-8.
6. Meyer B, Rainer O. (2003) *Mitochondrial regulation of apoptosis*. News Physiol Sci. 18:405-413.
7. Wang X. (2006) *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes & Dev. 15:2922-2933.
8. Schwarrz M, Navarro A, Gross A. (2007) *Mitochondrial carrier and pore. Key regulators of the mitochondrial apoptosis program?* Apoptosis. 12(5):869-876.
9. Maly DJ. (2007) *Exploring the intermembrane space*. ACS Chem Biol. 2(4):213-216.
10. Martinez V, Melendez Z, Maldonado V. (2007) *Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional unregulated*. Cell Signal. 19(6):1212-1220.
11. Rossignol Rodrigue, Gilkerson Robert, Aggeler Robert, Yamagata Kunihiro, Remington Jama, Capaldi Roderick. (2004) *Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cell*. Cancer Res. 64:985-993.
12. Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW. (2007) *Regulation of mitochondria oxidative phosphorylation through cell signaling*. Biochem Biophys Acta. 1773(12): 1701-1720.
13. Saccone C. (2005) *Mitochondrial Genome*. ELS.1-5.
14. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman M. (2002) *Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cell*. EMBO J. 21(7):1616-1627.

15. Crow M, Mani K, Nam Y, Kitsis RN. (2004) *The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis*. Circ Res. 95:957-70.
16. Riel SJ, Salvesen GS. (2007) *The apoptosome: signaling platform of cell death*. Mol Cell Biol. 8:405-413.
17. Rajalingam K, Oswald M, Gottschalk K, Rüdell T. (2007) *Smac/DIABLO is required for effector caspase activation during apoptosis in human cells*. Apoptosis. 12(8):1503-1510.
18. Loque SE, Martin SJ. (2008) *Caspase activation cascade in apoptosis*. Biochem Soc Trans. 36(1):1-9.
19. Adams JM, Cory S. (2007) *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene. 26(9):1324-1337.
20. Anderson S, Bankier B, Barrell M, Bruijn A, Coulson R, Drouin J, Eperon D, Nierlich P, Roe A, Sanger F, Shreirer P, Smith A, Staden R, Young I. (1998) *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature. 290(9):547-565.
21. Andrew RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowers RN, Turnbull DM, Howell N. (1999) *Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA*. Nat Genet. 23(2):147.
22. Madsen CS, Ghivizzani SC, Hauswirth WW. (1993) *Protein binding to a single termination sequence in the mitochondrial DNA D-loop region*. Mol Cell Biol. 13(4):2162-2171.
23. Sánchez CM. (2002) *Mitochondrial DNA alterations in human tumor*. Centro de Investigaciones Oncológicas. 19:15-20.
24. Rogounovith T, Saenko V, Yamashita S. (2004) *Mitochondrial DNA and human thyroid diseases*. Endocr J. 51(3):265-277.
25. Coskun PE, Ruiz PE, Wallace DC. (2003) *Control region mtDNA variants: longevity, climatic, adaptation, and a forensic conundrum*. PNAS. 100(5):2174-2176.
26. Alcolea MP, Colom B, Llado I, Gianotti M, Garcia P. (2005) *Mitochondrial transcription factor A (TFAM) is increased in rat embryo during placentation and associated with mitochondrial differentiation*. Cell Physiol Biochem. 17:79-88.
27. Lutz S, Witting H, Weisser J, Heizmann A, Junge N, Dimo SW, Parson J, Edelmann K, Aslinger S, Jung S, Augustin C. (2000) *Is it possible to differentiate mtDNA by*

- means of HVIII in sample that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions?* Forensic Sci Int. 113:97-101.
28. Warner JB, Bruin EJ, Hanning H, Hellenkamp F, Hörning A, Mittmann K, Steege G, Garritsen HS. (2006) *Use of sequence variation in three highly variable region of the mitochondrial DNA for the discrimination of allogeneic platelets.* Transfusion. 46: 554-561.
  29. Salas A, Lareu V, Calafell F, Bertranpetit J, Carracedo A. (2000) *mtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies.* Eur J Hum Genet. 8:964-974.
  30. Tamura K, Nei M. (1993) *Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees.* Mol Biol Evol. 10(3): 512-526.
  31. Sigurdardóttir S, Helgason A, Gulcher J, Stefansson K, Donnelly P. (2000) *The mutation rate in the human mtDNA control region.* Am J Hum Genet. 66:1599-1609.
  32. Morovvati S, Modarresi M, Habibi G, Kiarudi Y, Karami A, Peyvandi A. (2007) *Sequence analysis of mitochondrial DNA hypervariable regions: an approach to personal identification.* Arch Med Res. 38:345-349.
  33. Stoneking M. (2000) *Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots.* Am J Hum Genet. 67:1029-1032.
  34. Gurven M. (2000) *How can we distinguish between mutational "hot spots" and "old sites" in human mtDNA samples?* Hum Biol. 72(3):455-471.
  35. Naviaux, R, Markusic D, Barshop B, Nyhan W, Haas R. (1999) *Sensitive assay for mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ .* Clin Chem. 45(10):1725-1733.
  36. Graziewicz M, Day B, Copeland W. (2002) *The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage.* Nuclei Acid Res. 30(13):2817-2824.
  37. Korhonen J, Hoi P, Pellegrini M, Falkenberg M. (2004) *Reconstitution of minimal mtDNA replisome in vitro.* EMBO J. 23:2423-429.
  38. Clayton DA. (1982) *Replication of animal mitochondrial DNA.* Cell. 28:693-703.
  39. Clayton DA. (1992) *Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs.* Int Rev Cytol. 141:217-232.
  40. Hoi PX, Farge G, Gaspari M, Gustafsson CM, Falkenber M. (2006) *Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria.* J Biol Chem. 281(34):24647-24652.

41. Fernandez SP, Enriquez JA, Montoya J. (2008) *Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA*. *Exp Physiol*. 88:41-56.
42. Kravchenko JE, Rogozin IB, Koonin Eugene V, Chumakow PM. (2005) *Transcription of mammalian messenger RNA by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin*. *Nature*. 436(4):735-739.
43. Lisowsky T, Wilkens D, Stein T, Hedtke B, Börner T, Weihe A. (2002) *The C-terminal region of mitochondrial single subunit RNA polymerases contains species-specific determinants for maintenance of intact mitochondrial genomes*. *Mol Biol Cell*. 13:2245-2255.
44. Bernall KE., Sykes BC. (1995) *Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region*. *Am J Hum Genet*. 57:248-256.
45. Innan H, Nordborg M. (2002) *Recombination or mutational hot spot in human mtDNA*. *Mol Biol Evol*. 19(7):1122-1127.
46. Zsurka G, Kraytsberg Y, Kudina T, Kornblumm C, Elger C, Khrapho K, Kunz W. (2005) *Recombination of mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple mitochondrial DNA heteroplasmy*. *Nat Genet*. 17(8):873-877.
47. Chennery P, Samuels D, Elson J Turnbull D. (2002) *Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism?* *The Lancet*. 360:1323-1325.
48. Kujoth G, Leeuwenburgh C, Prolla T. (2006) *Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging*. *Cancer Res*. 7386-7389.
49. Mambo E, Gao X, Cohen Y, Guo Z, Talalay P, Sidransky D. (2003) *Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations*. *PNAS*. 100(4):1838-1843.
50. Lewis W, Copeland W, Day B. (2001) *Mitochondrial DNA depletion, oxidative stress, and mutation: mechanisms of dysfunction from Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*. *Lab Invest*. 81(6):777-790.
51. Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. (2005) *The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species and somatic mtDNA mutations*. *PNAS*. 102(50):17993-17998.
52. Freuhauf JP, Meyskens FL. (2007) *Reactive oxygen species: a breath of life or death?* *Clinic Cancer Res*. 13(3):789-794.

53. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovik M, Mazur M. (2006) *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact. 160(1):1-40.
54. Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, Fink MP, Kagan VE. (2007) *Targeting mitochondria*. Acc Chem Res. 41(1):87-97.
55. Kaufman B, Durisic N, Mativetsky J, Costantino S, Hancock M, Grutter P, Shoubbridge E. (2007) *The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the multiple DNA molecules into nucleoid-like structures*. Mol Biol Cell. 18:3225-3236.
56. Kang D, Kim S, Hamasaki N. (2007) *Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions*. Mitochondrion. 1(2):39-44.
57. Maitra A, Cohen Y, Gillespie S, Mambo E, Fukushima N, Hoque MO, Shah N, Goggins M, Califano J, Sidransky D, Chakravarti A (2004) *The Human Mitochip: a high-throughput sequencing microarray for mitochondrial mutation detection*. Genome Res. 14:812-819.
58. Crimi M, O'Hearn SF, Wallace DC, Comi GP. (2005) *Molecular research technologies in mitochondrial diseases; the microarray approach*. IUBMB Life. 57(12):811-818.
59. Zhou S, Kassaei K, Cutler DJ, Kennedy GC, Sidransky D, Maitra A, Califano J. (2006) *An oligonucleotide microarray for high-throughput sequencing of the mitochondrial genome*. J Mol Diagn. 8(4):476-482.
60. Jiang Y, Hall T, Hofstadler S, Naviaux R. (2007) *Mitochondrial DNA mutation detection by Electrospray Mass Spectrometry*. Clin Chem. 53(2):1-9.
61. Birch M. (2005) *Using mitochondrial DNA as a biosensor of early cancer development*. Br J Cancer. 93:271-72.
62. Moreno SR, Rodríguez ES, Marín HA, Saavedra E. (2007) *Energy metabolism in tumor cell*. FEBS, 274(6):1393-1418.
63. Verma M, Naviaux RK, Tanaka M, Kumar D, Franceschi C, Singh K. (2006) *Meeting report: mitochondrial DNA and cancer epidemiology*. Cancer Res. 7(2):437-439.
64. Wong LJ, Liang MH, Know H, Park J, Bai RK, Tan DJ. (2002) *Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations*. Clin Chem. 48(11):1901-1912.
65. Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. (2006) *Mitochondrial DNA mutations in human cancer*. Oncogene. 25:4663-4674.

66. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. (2006) *Mitochondrial mutations in cancer*. *Oncogen* 25:4647-4662.
67. Ling MT, Pen HY, Chin WC, Chih-YH, Chew WW, Liang ML, Yau HW, Hsin CL. (2006) *Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer*. *Genes Chromosomes Cancer*. 45(7):629-638.
68. Cheng YW, Hua WW, Yong GY, Qing PK, Ya PZ. (2007) *Somatic mutations of mitochondrial genome in early stage breast cancer*. *Int J Cancer*. 121:1253-1256.
69. Lui VW, Yand HJ, Wang Y, Tsang PC, Cheung AN, Chui PM, Ng TY, Wong LC, Nagley P, Ngan HY. (2003) *High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas*. *Br J Cancer*. 89:697-701.
70. Wang Y, Lui VW, Xue WC, Cheung AN, Ngan HY. (2006) *Association of decreased mitochondrial DNA content with ovarian cancer progression*. *Br J Cancer*. 95:1087-1091.
71. Lui VW, Shui HH, Cheung AN, Chui PM, Leung TW, Nagley P, Wong LC, Ngan HY. (2001) *High incidence of mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas*. *Cancer Res*. 61:5998-6001.
72. Trappen PO, Cullup T, Troke R, Swann D, Shepherd JH, Jacobs IJ, Gayther SA, Mein CA. (2007) *Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*. 104:129-133.
73. Sharma H, Singh A, Sharma C, Jain S, Singh N. (2005) *Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer*. *Cancer Cell Int*. 5:1-6.
74. Allalunis TJ, Ma I, Hanson J, Pearcey R. (2006) *mtDNA mutations in invasive cervix tumor: a retrospective analysis*. *Cancer Lett*. 243: 193-201.
75. Petros JA, Baumann AK, Ruiz PE, Amin MB, Carrie QS, Hall J, Lim S, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC. (2005) *mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer*. *PNAS*, 102(3):719-724.
76. Dakubo GD, Parr RL, Costello LC, Franklin RB, Thayer RE. (2006) *Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer*. *J Clin Pathol*. 59(1):10-26.
77. Máximo V, Soares P, Lima J, Camesselle TJ, Sabrinho SM. (2002) *Mitochondrial DNA somatic mutation (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variant in human thyroid pathology*. *Am J Pathol*. 160(5):1857-1865.

78. Sui G, Zhou S, Wang J, Canto M, Lee E, Eshleman J, Montgomery E, Sidransky D, Califano J, Maitra A. (2006) *Mitochondrial DNA mutations in preneoplastic lesions of the gastrointestinal tract: a biomarker for the early detection of cancer*. *Mol Cancer*. 5:1-9.
79. Tan DJ, Chang J, Liu LL, Bai RK, Wang YF, Yeh KT, Wong LJ. (2006) *Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer*. *BMC Cancer*. 6:1-11.
80. Abnet C, Huppi K, Carrera A, Armistead D, McKenney K, Hu N, Tang Z, Taylor P, Dawsey S. (2004) *Control region mutations and the 'common deletion' are frequent in the mitochondrial DNA of patients with esophageal squamous cell carcinoma*. *BMC Cancer*. 4:1-8.
81. Lièvre A, Blons H, Houlliere AM, Laccourreye O, Brasnu D, Beaune P, Laurente P. (2006) *Clinicopathological significance of mitochondrial D-loop mutations in head and neck carcinoma*. *Br J Cancer*. 94:962-997.
82. Yamada S, Nomoto S, Fujii T, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Kanazumi N, Nakao A. (2006) *Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinicopathologic parameters of hepatocellular carcinoma*. *Eur J Surg Oncol*. 32(3):303-307.
83. Wheelhouse NM, Lai PB, Wigmore SJ, Ross JA, Harrison DJ. (2005) *Mitochondrial D-loop mutations and deletion profiles of cancerous and noncancerous liver tissue in hepatitis B virus-infected liver*. *Br J Cancer*. 92:1268-1272.
84. Nomoto S, Yamashita K, Koshikawa K, Nakao A, Sidransky D. (2002) *Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma*. *Clin Cancer Res*. 8:481-487,
85. Meierhofer D, Mayr JA, Fink K, Schmeller N, Kofler B, Sperl W. (2006) *Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism*. *Br J Cancer*. 94:268-274.
86. Brando MC, Lott MT, Nguyen K, Spolim S, Navathe SB, Baldi Pierre, Wallace DC. (2005) *MITOMAP: a human mitochondrial genome database-2004 update*. *Nucleic Acids Res*. 33:D611-D613.
87. MITOMAP. <http://www.mitomap.org/>
88. Cancer Mundial Statistical Information System. GLOBOCAN 2002, Graphs. <http://www-dep.iarc.fr/>

89. Sistema Nacional de Información en Salud. Datos de defunciones INEGI, 2005.  
<http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
90. Bareman JG, Koutsky LA. (2005) *The epidemiology of human papillomavirus infections*. J Clin Virol. 32:16-24.
91. Zhang ZM, Baker CC. (2006) *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. Front Biosci. 11:2286-2302.
92. Piña SP, Hernández HD, López RR, Vázquez OG, Pérez PC, Lizano SM, González SJ, Cruz TF, Salcedo V. (2006) *Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions*. Int J Gynecol Cancer. 16:1041-1047.
93. Terris Ma, Peehl D. (1997) *Human papillomavirus detection by polymerase chain reaction in benign and malignant prostate tissue is dependent on the primer set utilized*. Urology. 50(1):150-156.
94. Matsuyama W, Nakagawa M, Wakimoto J, Hirotsu Y, Kawabata M, Osame M. (2003) *Mitochondrial DNA mutation correlates with stage progression and prognosis in non-small cell lung cancer*. Hum Mutat. 21(4):441-443.
95. Tan D, Goerlits D, Dumitresco R Han D, Moiseiwitsch S, Spernak S, Orden R, Chen J, Goldman R, Shields PG. (2008) *Associations between cigarette smoking and mitochondrial DNA abnormalities in buccal cells*. Carcinogenesis, in press.
96. Khropko K, Kravtsov Y, Grey AD, Vijg J, Schol E. (2006) *Does premature aging of the mtDNA mutator mouse prove that mtDNA mutations are involved in natural aging?* Aging Cell. 5(3):279-82.
97. Khropko K, Vijg J. (2007) *Mitochondrial DNA mutations and aging: a case closed?* Nat Genet. 39(4):445-446.
98. Trifunovic A, Larsson NG. (2008) *Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing*. J Intern Med. 263(2):167-178.
99. Habano, W. Nakamura S, Sugai T. (1998) *Microsatellite instability in the mitochondrial of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome*. Oncogene 17: 1931-1937.
100. Chen JZ, Gokden N, Greene GF, Green B, Kadlubar FF. (2003). *Simultaneous generations of multiple mitochondrial DNA mutations in human prostate tumors suggest mitochondrial hyper-mutagenesis*. Carcinogenesis. 24(9):1481-1487.

## **X. ANEXO**

### ***X.1 Reactivos y equipo***

#### *Reactivos*

- Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Promega
- QIAquick Gel extraction kit, Qiagen
- DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen.
- Proteínasa K, Invitrogen
- Taq polimerasa 5U/mL, Fermentas
- Taq Buffer, Fermentas
- MgCl<sub>2</sub>, 25 mM, Fermentas
- dNTP's 10 mM, (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Fermentas
- Iniciadores mitocondriales 12..2 pmol/μL
- Iniciadores E6 25 pmol//μL
- BigDye Terminator v3.1, Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems
- Marcador de Peso Molecular de DNA 100pb, DNA Ladder 100pb, Fermentas
- Formamida

## *Equipos*

- Multiblock, Lab Line Instruments
- Balanza analítica, Sartorius
- Potenciómetro, 720 pHMeter, Beckman
- Vortex, Fisher Scientific
- Microtomo, Leica
- Baño de flotación, Lab Line Instruments
- Centrífuga de tubos eppendorf , 5415C Eppendorf
- Estación de PCR, Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation, UVP
- Termociclador, Thermo Hybaid
- Termociclador, Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480
- Concentrador de vacío, 5301C Eppendorf
- Incubadora, Lab Line Instruments
- Eagle Eye II, Stratagene
- Secuenciador, 3100 Genetic Analyzer ABI PRISMA
- Congelador -4 °C, Whirlpool
- Congelador -20°C, Torrey
- Congelador -70°C, Revco

## *X.2. Preparación de soluciones*

Amortiguador de lisis de glóbulos rojos

Para preparar 1 L:  
10 mM Tris-HCl pH 7.4  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM NaCl

Amortiguador de lisis nuclear

Para preparar 1 L:  
10 mM Tris-HCl pH 8.0  
100 mM NaCl  
25 mM EDTA pH 8.0  
0.5% (w/v) SDS

Proteínasa K ( 10 mg/ml)

Para preparar 25 mL de buffer de proteínasa K:  
1 mM Tris-HCl pH 7.4  
20 mM CaCl<sub>2</sub>  
50% Glicerol  
Por cada 10 mL de buffer, agregar 100 mg de proteínasa K (10mg/mL)

TBE 5X

Para preparar 1L:  
0.43M Tris-base  
0.45M Ácido bórico  
10 mM EDTA pH 8.0

Amortiguador de carga de DNA

0.25% (w/v) Azul de Bromofenol  
40% (w/v) Sacarosa  
Disuelto en H<sub>2</sub>O

### X.3. Lista de secuencias de iniciadores

Lista de iniciadores para la amplificación de una región de E6 de HPV 16

<i><b>Iniciador</b></i>	<i><b>Secuencia 5' → 3'</b></i>	<i><b>Tamaño</b></i>	<i><b>Localización</b></i>
<i><b>E6F</b></i>	5'- CAG GAC CCA CAG GAG CGA CCC -3'		
<i><b>E6R</b></i>	5'- GTC ATA TAC CTC ACG TCG CAG -3'	126 pb	110-235

Lista de iniciadores para la amplificación de una región de la HVS-I y HVS-II

<i><b>Iniciador</b></i>	<i><b>Secuencia 5' → 3'</b></i>	<i><b>Tamaño</b></i>	<i><b>Localización</b></i>
<i><b>mt1F1</b></i>	5'-GAA TGT CTG CAC AGC CAC TTT CCC -3'		
<i><b>mtR2</b></i>	5'-GGA ACG GGG ATG CTT GCA TGT- 3'	466 pb	247-713
<i><b>mt3F3</b></i>	5'-CGT ACA TTA CTG CCA GCC ACC AT- 3'		
<i><b>mt3R3</b></i>	5'-GGT GGC TTT GGA GTT GCA GTT G- 3'	166 pb	16 095-16 260

**X.4 Tablas de cambios nucleotídicos en el DNAm<sub>t</sub> en mujeres mexicanas**

**A. 1. Cambios nucleotídicos de la HVS-II en mujeres sanas**

<b>Muestra</b>	<b>Citología exfoliativa oral</b>		<b>Linfocitos</b>	
	<b>Posición</b>	<b>Cambio</b>	<b>Posición</b>	<b>Cambio</b>
<b>1</b>	303-315 523	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub> del AC	303-315 523	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>2</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
<b>3</b>	303-315 489 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> T-C Homo del AC	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>4</b>	303-315 489 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> T-C Homo del AC	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>5</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
<b>6</b>	303-315 500 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> C-T Homo del AC	303-315 500 523 527	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> C-T Homo del AC C-T Homo
<b>7</b>	303-315 500 523 527	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> C-T Homo del AC C-T Homo	303-315 500 523 527	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> C-T Homo del AC C-T Homo
<b>8</b>	303-315 489 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> T-C Homo del AC	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>9</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC	303-315 411 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> C-G Hete del AC
<b>10</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC

**A.2. Total de cambios nucleotídicos de la HVS-II en mujeres sanas**

<b>Posición</b>	<b>Cambio</b>	<b>Homo/Hete</b>	<b>Frec %</b>	<b>Reportado</b>
<b>303-315</b>	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>	-----	10	Si
<b>303-315</b>	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	-----	90	Si
<b>411</b>	C-G	Hete	5	No
<b>489</b>	T-C	Homo	15	Si
<b>500</b>	C-T	Homo	20	No
<b>523</b>	del AC	-----	80	Si
<b>527</b>	C-T	Homo	15	No

A.3. Cambios nucleotídicos de la HVS-II en tejido tumoral de CaCu

<i>Muestra</i>	<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>
<b>1</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>2</b>	303-315 499 523	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub> G-A Homo del AC
<b>3</b>	303-315 325 523	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub> C-T Homo del AC
<b>4</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
<b>5</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>6</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>7</b>	303-315 499	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> G-A Homo
<b>8</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>9</b>	303-315 411 499	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> C-G Hete G-A -Homo
<b>10</b>	303-315 499	C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub> G-A Homo
<b>11</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>12</b>	303-315 411	C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub> C-G Hete
<b>13</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
<b>14</b>	303-315 523	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>15</b>	303-315 499 523	C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub> G-A Homo del AC
<b>16</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
<b>17</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>18</b>	303-315 493 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> A-G Homo del AC
<b>19</b>	303-315 411	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> C-G

	523	del AC
<b>20</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>21</b>	303-315 482	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> T-C Homo
<b>22</b>	303-315 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del AC
<b>23</b>	303-315 373	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> del A
<b>24</b>	303-315 411 418	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> C-G Hete G-C Hete
<b>25</b>	303-315 499 523	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub> G-A del AC

A.4. Total de cambios nucleotídicos de la HVS-II en tejido tumoral de CaCu

<b>Posición</b>	<b>Cambio</b>	<b>Homo/Hete</b>	<b>Frec %</b>	<b>Reportado</b>
<b>303-315</b>	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>	-----	12	Si
<b>303-315</b>	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	-----	72	Si
<b>303-315</b>	C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub>	-----	12	Si
<b>325</b>	C-T	Homo	4	Si
<b>373</b>	del A	-----	4	No
<b>411</b>	C-G	Hete	16	No
<b>418</b>	G-C	Hete	4	No
<b>482</b>	T-C	Homo	4	Si
<b>493</b>	A-G	Homo	4	Si
<b>499</b>	G-A	Homo	24	Si
<b>523</b>	del AC	-----	60	Si

A.5. Cambios nucleotídicos de la región HVS-II en citologías exfoliativas orales en pacientes con CaCu

<i>Muestra</i>	<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>
<b>1</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	342	T-A Homo
	489	T-C Homo
<b>2</b>	303-315	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>
	499	G-A Homo
<b>3</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	523	Del AC
<b>4</b>	303-315	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>
	411	C-G Hete
	489	G-A Homo
<b>5</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	411	C-G Hete
	499	G-A Homo
<b>6</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	489	T-A Homo
<b>7</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	499	G-A Homo
	523	Del AC
<b>8</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	499	G-A Homo
<b>9</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	411	C-G Hete
	523	Del AC
<b>10</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	499	G-A Homo
<b>11</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	480	T-C Homo
	489	T-CHomo
<b>12</b>	303-315	C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub>
	411	C-G Hete
	523	Del AC
<b>13</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	414	T-C Hete
	499	G-A Homo
<b>14</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	489	T-A Homo
	493	A-G Homo
	523	Del AC
<b>15</b>	303-315	C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub>
	489	T-C Homo
<b>16</b>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>
	523	Del AC

A 6. Total de cambios nucleotídicos de la HVS-II citologías exfoliativas orales en pacientes con CaCu

<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>	<i>Homo/Hete</i>	<i>Frec %</i>	<i>Reportado</i>
303-315	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>	-----	12.5	Si
303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	-----	75	Si
303-315	C <sub>9</sub> TC <sub>6</sub>	-----	12.5	SI
342	T-A	Homo	6.3	No
411	C-G	Hete	25	No
414	T-C	Hete	37	Si
480	T-C	Homo	6.3	No
489	T-C	Homo	37.5	Si
493	A-G	Homo	6.3	Si
499	G-A	Homo	37.5	Si
523	del AC	-----	37.5	Si

A.7. Cambios nucleotídicos de la región HVS-I en mujeres sanas

<i>Muestra</i>	<i>Citología exfoliativa oral</i>		<i>Linfocitos</i>	
	<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>	<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>
<i>1</i>	16 172	T-C Homo	16 172	T-C Homo
	16 187	C-T Homo	16 187	C-T Homo
	16 188	C-T Homo	16 188	C-G Homo
	16 189	T-C Homo	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo	16 223	C-T Homo
	16 230	A-G Homo	16 230	A-G Homo
	<i>2</i>	16 172	T-C Homo	16 172
16 219		A-G Homo	16 219	A-G Homo
16 235		A-G Homo	16 235	A-G Homo
<i>3</i>	16 223	C-T Homo	16 223	C-T Homo
<i>4</i>	16 223	C-T Homo	16 223	C-T Homo
<i>5</i>	16 207	A-G Homo	16 207	A-G Homo
	16 223	C-T Homo	16 223	C-T Homo
<i>6</i>	16 223	C-T Homo	16 223	C-T Homo
<i>7</i>	16 223	C-T Homo	16 223	C-T Homo
<i>8</i>	16 223	C-T Homo	16 223	C-T Homo

A.8. Total de cambios nucleotídicos de la HVS-I en mujeres sanas

<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>	<i>Homo/Hete</i>	<i>Frec %</i>	<i>Reportado</i>
16 172	T-C	Homo	25	Si
16 187	C-T	Homo	12.5	Si
16 188	C-T	Homo	12.5	Si
16 189	T-C	Homo	12.5	Si
16 207	A-G	Homo	12.5	Si
16 219	A-G	Homo	12.5	Si
16 223	C-T	Homo	87.5	Si
16 230	A-G	Homo	12.5	Si
16 235	A-G	Homo	12.5	Si

A.9. Cambios nucleotídicos de la región HVS-I en tejido tumoral de CaCu

<i>Muestra</i>	<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>
<i>1</i>	16 223	C-T Homo
	16 240	Del A
	16 241	Del A
<i>2</i>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<i>3</i>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<i>4</i>	16 187	C-T Homo
	16 209	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<i>5</i>	16 223	C-T Homo
<i>6</i>	16 223	C-T Homo
<i>7</i>	16 223	C-T Homo
<i>8</i>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 228	C-T Homo
<i>9</i>	16 184	C-T Homo
	16 223	C-T Homo
<i>10</i>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
<i>11</i>	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 193	Ins C
	16 223	C-T Homo
<i>12</i>	16 189	T-C Homo

	16 193	Ins C
<b>13</b>	16 223	C-T Homo
<b>14</b>	16 223	C-T Homo
<b>15</b>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<b>16</b>	16 223	C-T Homo
<b>17</b>	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<b>18</b>	16 223	C-T Homo
<b>19</b>	16 189	T-C Homo
	16 194	A-C Homo
<b>20</b>	16 223	C-T Homo
<b>21</b>	16 231	T-C Homo
<b>22</b>	16 223	C-T Homo
<b>23</b>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	T-C Homo
<b>24</b>	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<b>25</b>	16 223	T-C Homo

A.10. Total de cambios nucleotídicos de la HVS-I en tejido tumoral de CaCu

<b>Posición</b>	<b>Cambio</b>	<b>Homo/Hete</b>	<b>Frec %</b>	<b>Reportado</b>
<b>16 182</b>	A-C	Homo	24	Si
<b>16 183</b>	A-C	Homo	36	Si
<b>16 184</b>	C-T	Homo	4	Si
<b>16 187</b>	C-T	Homo	4	Si
<b>16 189</b>	T-C	Homo	40	Si
<b>16 193</b>	ins C	Homo	8	No
<b>16 194</b>	A-C	Homo	4	Si
<b>16 209</b>	T-C	Homo	4	Si
<b>16 223</b>	C-T	Homo	80	Si
<b>16 228</b>	C-T	Homo	4	Si
<b>16 231</b>	T-C	Homo	4	Si
<b>16 240</b>	del A	Homo	4	No
<b>16 241</b>	del A	Homo	4	No

A.11. Cambios nucleotídicos de la región HVS-I en citologías exfoliativas orales en pacientes con CaCu

<i>Muestra</i>	<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>
<b>1</b>	16 223	C-T Homo
<b>2</b>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<b>3</b>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
<b>4</b>	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<b>5</b>	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 194	A-C Homo
	16 223	C-T Homo
<b>6</b>	16 223	C-T Homo
<b>7</b>	16 223	C-T Homo
<b>8</b>	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<b>9</b>	16 184	C-T Homo
	16 213	C-T Homo
	16 223	G-A Homo
<b>10</b>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 217	T-C Homo
<b>11</b>	16 223	C-T Homo
	16 234	C-G Homo
<b>12</b>	16 223	C-T Homo
<b>13</b>	16 223	C-T Homo
<b>14</b>	16 223	C-T Homo
<b>15</b>	16 223	C-T Homo
<b>16</b>	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
	16 223	C-T Homo
<b>17</b>	16 182	A-C Homo
	16 183	A-C Homo
	16 189	T-C Homo
<b>18</b>	16 223	C-T Homo
<b>19</b>	16 223	C-T Homo
<b>20</b>	16 187	C-T Homo
	16 188	C-T Homo
	16 204	G-A Homo
	16 223	C-T Homo

A.12. Total de cambios nucleotídicos de la HVS-I citologías exfoliativas orales en pacientes con CaCu

<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>	<i>Homo/Hete</i>	<i>Frec %</i>	<i>Reportado</i>
16 182	A-C	Homo	20	Si
16 183	A-C	Homo	40	Si
16 184	C-T	Homo	5	Si
16 187	C-T	Homo	5	Si
16 188	C-T	Homo	5	Si
16 189	T-C	Homo	35	Si
16 194	A-C	Homo	5	Si
16 204	G-A	Homo	5	No
16 213	G-A	Homo	5	Si
16 217	T-C	Homo	5	Si
16 223	C-T	Homo	85	Si
16 234	C-G	Homo	5	no

*X.5 Tablas con cambios nucleotídicos del DNAmT en líneas celulares de CaCu*

B.1. Cambios nucleotídicos de la HVS-II en líneas celulares de CaCu

<i>Línea</i>	<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>	<i>Homo/Hete</i>
<i>CaLo</i>	303-315	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>	-----
	523	Del AC	-----
<i>SiHa</i>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	-----
	375	C-A	Homo
	489	T-C	Homo
	556	C-T	Homo
<i>Caski</i>	303-315	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>	-----
<i>HeLa</i>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	-----
	523	Del AC	-----
<i>Inbl</i>	303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	-----
	523	del AC	-----

B.2. Cambios nucleotídicos de la HVS-II en líneas celulares de CaCu

<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>	<i>Homo/Hete</i>	<i>Reportado</i>
303-315	C <sub>7</sub> TC <sub>6</sub>	-----	Si
303-315	C <sub>8</sub> TC <sub>6</sub>	-----	Si
375	C-A	Homo	No
489	T-C	Homo	Si
523	Del AC	-----	Si
556	C-T	Homo	No

B.3. Cambios nucleotídicos de la HVS-I en línea celulares de CaCu

<i>Línea</i>	<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>	<i>Homo/Hete</i>
<i>CaLo</i>	16 223	C-T	Homo
<i>HeLa</i>	16 223	C-T	Homo
<i>Inbl</i>	16 223	C-T	Homo
<i>SiHa</i>	16 189	T-C	Homo
	16 194	A-C	Homo
<i>Caski</i>	16 183	A-C	Homo
	16 189	T-C	Homo
	16 194	A-C	Homo
	16 223	C-T	Homo

B.4. Cambios nucleotídicos de la HVS-I en líneas celulares de CaCu

<i>Posición</i>	<i>Cambio</i>	<i>Homo/Hete</i>	<i>Reportado</i>
<i>16 183</i>	A-C	Homo	Si
<i>16 189</i>	T-C	Homo	Si
<i>16 194</i>	A-C	Homo	Si
<i>16 223</i>	C-T	Homo	Si

*X.6. Análisis estadísticos de los cambios nucleotídicos del DNAm*

C.1. Relación estadística de la región HVS-II

<i>Posición</i>	<i>Base (rCRS)</i>	<i>Cambio de Base</i>	<i>Relación</i>	<i>P</i>	<i>RM</i>	<i>IC 95%</i>
<i>489</i>	T	C	CEO-Tumoral	0.001	1.035	0.136-8.670
<i>489</i>	T	C	Sano-Tumoral	0.045	1.050	0.66-20.653
<i>499</i>	G	A	Tumoral-Sano	0.019	0.019	0.134-7.375
<i>500</i>	C	T	Sano-Tumoral	0.019	0.976	0.089-11.724
<i>527</i>	C	T	Sano-Tumoral	0.045	1.050	0.066-20.653

CEO, Citología exfoliativa oral.

C.2. Relación estadística de la región HVS-I

<i>Posición</i>	<i>Base (rCRS)</i>	<i>Cambio de Base</i>	<i>Relación</i>	<i>P</i>	<i>RM</i>	<i>IC 95%</i>
<i>16 172</i>	T	C	Sana-Tumoral	0.019	0.976	0.089-11.724
<i>16 189</i>	T	C	Tumoral-Sana	0.051	6.00	0.97-47.15

### X.7 Agrupación de Haplotipos del DNAm

#### D.1. Haplotipos para la región HVS-II del DNAm presentes en mujeres sanas, con CaCu y líneas celulares de CaCu

	Posición	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	Muestras
		0	1	2	7	7	1	1	8	8	9	9	0	2	2	2	5	
	Haplotipos	9	5	5	3	5	1	8	2	9	3	9	0	3	4	7	6	
	HapII-1	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	CasKi
	HapII-2	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del A	del C	.	.	14, 1s
H	HapII-3	.	ins C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	del A	del C	.	.	CaLo
A	HapII-4	.	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	del A	del C	.	.	2, 2s
P	HapII-5	.	ins C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del A	del C	.	.	3
	HapII-6	ins C	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4, 13, 16, 2s, 5s
L	HapII-7	ins C	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del A	del C	.	.	1, 5, 6, 8, 11, 17, 20, 22, HeLa, Inbl, 3s, 4s, 8s, 10s
O	HapII-8	ins C	ins C	.	del A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	23
T	HapII-9	ins C	ins C	.	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	24
I	HapII-10	ins C	ins C	.	.	.	G	.	.	.	.	A	.	del A	del C	.	.	9
	HapII-11	ins C	ins C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	del A	del C	.	.	19, 9s
P	HapII-12	ins C	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	del A	del C	.	.	7
O	HapII-13	ins C	ins C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	21
S	HapII-14	ins C	ins C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	SiHa
	HapII-15	ins C	ins C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	del A	del C	.	.	18
	HapII-16	Ins C	Ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	del A	del C.	.	.	6s, 7s
	HapII-17	ins CC	ins C	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	12
	HapII-18	ins CC	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	10
	HapII-19	ins CC	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	del A	del C	.	.	15

Los números representan las muestras con CaCu, los números con una "s" son las muestras sanas.

D.2. Haplotipos para la región HVS-I del DNAm<sub>t</sub> presentes en mujeres sanas, con CaCu y líneas celulares de CaCu

Posición	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Muestras
	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	7	8	8	8	8	8	8	9	9	0	0	1	2	2	3	3	3	4	4	
	2	2	3	4	7	8	9	3	4	7	9	9	3	8	0	1	5	0	1	
HapI-1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	5, 6, 7, 13, 14, 16, 18, 20, 22, 25, HeLa, CaLo, Inbl, 3s, 4s, 6s, 7s, 8s
HapI-2	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10
H HapI-3	.	C	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	2, 3, 15, 23
A HapI-4	.	C	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	8
P HapI-5	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	17, 24
L HapI-6	.	.	.	.	.	.	C	ins C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	12
A HapI-7	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	19, SiHa
T HapI-8	.	.	C	.	.	.	C	ins C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	11
I HapI-9	.	.	C	.	.	.	C	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	CasKi
P HapI-10	.	.	.	T.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	9
O HapI-11	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	4
S HapI-12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	5s
HapI-13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	del A	del A	1
HapI-14	C	.	.	.	T	G	C	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	1s
HapI-15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	21
HapI-16	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.	5s

Los números representan las muestras con CaCu, los números con una "s" son las muestras sanas.

### X.8. Asociación estadística de la infección de HPV y haplotipos mitocondriales

#### E. 1. Frecuencia de haplotipos en la región HSV-I en pacientes con CaCu y sanas

<i>Haplotipo II</i>	<i>Casos (n=25)</i> <i>No. (%)</i>	<i>Controles</i> <i>(n=10)</i> <i>No. (%)</i>	<i>P</i>
<i>1</i>	1 (4)	0	0.521
<i>2</i>	1 (4)	1 (10)	0.490
<i>3</i>	0	0	-----
<i>4</i>	2 (8)	0	0.357
<i>5</i>	1 (4)	0	0.521
<i>6</i>	3 (12)	2 (20)	0.541
<i>7</i>	8 (32)	4 (40)	0.652
<i>8</i>	1 (4)	0	0.521
<i>9</i>	1 (4)	0	0.521
<i>10</i>	1 (4)	0	0.521
<i>11</i>	1 (4)	1 (10)	0.490
<i>12</i>	1 (4)	0	0.490
<i>13</i>	1 (4)	0	0.490
<i>14</i>	0	0	-----
<i>15</i>	1 (4)	0	0.521
<i>16</i>	0	2 (20)	0.021*
<i>17</i>	1 (4)	0	0.490
<i>18</i>	1 (4)	0	0.490
<i>19</i>	1 (4)	0	0.490

\* La RM fue de 1.0 y el intervalo de confianza 0.034-520.16

#### E.2. Frecuencia de haplotipos de la región HVS-I en pacientes con CaCu y sanas

<i>Haplotipo II</i>	<i>Casos (n=25)</i> <i>No. (%)</i>	<i>Controles (n=8)</i> <i>No. (%)</i>	<i>P</i>
<i>1</i>	10 (40)	5 (31)	0.266
<i>2</i>	1 (4)	0	0.566
<i>3</i>	4 (16)	0	0.227
<i>4</i>	1 (4)	0	0.566
<i>5</i>	2 (8)	0	0.409
<i>6</i>	1(4)	0	0.556
<i>7</i>	1(4)	0	0.556
<i>8</i>	1(4)	0	0.556
<i>9</i>	0	0	-----
<i>10</i>	1 (4)	0	0.556
<i>11</i>	1 (4)	0	0.556
<i>12</i>	0	1 (6)	0.073
<i>13</i>	1 (1)	0	0.556
<i>14</i>	0	1 (6)	0.073
<i>15</i>	1 (4)	0	0.556
<i>16</i>	0	1 (6)	0.073