

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



**PROGRAMA DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**DNA MITOCONDRIAL Y CÁNCER DEL CUELLO
UTERINO: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES EN LA
REGIÓN D-LOOP.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

José Mariano Guardado Estrada

Facultad de Medicina



MEXICO, D.F.

MAYO DEL 2011



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.

Programa Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Facultad de Medicina, UNAM

Unidad de Medicina Genómica, Departamento de Medicina Experimental.

Tutor Principal: Dr. Jaime Berumen Campos

Comité tutorial: Dr. Daniel Piñero Dalmau

Dra. Susana Kofman Epstein

Jurado para examen de grado:

Presidente: Dr. Rubén Lisker Yourkowitzky

Secretario: Dr. Jaime Berumen Campos

Vocal: Dra. Marcela Lizano Soberón

Vocal: Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Vocal: Dr. Nicolás Villegas.

*A Dios,
mi esposa Irene,
mi madre Ruth
y mi hermano Danilo
sin ustedes esto no hubiera sido posible*

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.
- A CONACYT por haberme otorgado la beca para la realización de mis estudios.
- Al Dr. Jaime Berumen Campos, tutor y amigo, por darme la oportunidad de estar en su laboratorio bajo su tutoría. A quien agradezco su apoyo, dirección, enseñanza y libertad para el desarrollo de la presente investigación.
- A mis muy estimados miembros del comité tutorial, el Dr. Daniel Piñero y la Dra. Susana Kofman, quienes aportaron y enriquecieron con sus conocimientos el presente trabajo.
- A mi jurado de examen de grado, por sus valiosos comentarios y correcciones de mi tesis: Dr. Rubén Lisker, Dra. Leticia Rocha, Dra. Marcela Lizano, Dr. Nicolás Villegas y Dr. Jaime Berumen.
- Al personal de los servicios de patología, oncología y colposcopia del Hospital General de México, en especial al Dr. Edgar Román y al Dr. Guillermo Gómez por facilitarme las muestras de los pacientes.
- A la dirección de investigación del Hospital General de México O. D.
- A Eligia Juárez, por su amistad y ser mi maestra en la parte experimental.
- A mi amiga Ana Wegier, por tomarse el tiempo en enseñarme a analizar mis secuencias de DNA desde otra perspectiva.
- A la Dra. Patricia Ostrosky, su amistad, cariño y apoyo incondicional.

- A mis amigos Ingrid, Víctor y Valeria con quienes compartí muy gratos recuerdos.
- A mis compañeros del laboratorio, de quienes aprendí mucho.
- A mis compañeros y amigos del posgrado.
- Y finalmente a cada una de las personas que me han acompañado, directa o indirectamente, en esta etapa de mi vida.

.....*Gracias*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.

Ancestría del DNA mitocondrial en población mexicana.

- *Historia del mestizaje en México*.....1
- *Marcadores genéticos de ancestría en la población mexicana*.....2
- *DNA mitocondrial*.....5
- *DNA mitocondrial y genética de poblaciones*.....7
- *DNA mitocondrial y cáncer*.....11

Factores genéticos asociados al Cáncer del Cuello Uterino.

- *Virus del Papiloma Humano (VPH)*.....13
- *Patogenia del VPH en el desarrollo del cáncer cervical*.....15
- *Genes de protección y susceptibilidad en cáncer cervical*.....17

II. OBJETIVOS.....21

III. HIPÓTESIS.....22

IV. JUSTIFICACIÓN.....23

V. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

VI.I Identificación del polimorfismo y ancestría mitocondrial en la región D-loop del DNA mitocondrial en mujeres mestizas mexicana sanas.

- Materiales y Métodos.....24
- Resultados y Discusión.....28
- Conclusiones.....44

VI.II Estudio de asociación mitocondrial entre mujeres mestizas mexicanas sanas y mujeres diagnosticadas con CaCU y análisis de la expresión genética de 29 genes mitocondriales en mujeres con cáncer estratificadas por haplogrupos Amerindios.

- Materiales y Métodos.....45
- Resultados.....49
- Discusión.....62
- Conclusiones.....71

VI. PERSPECTIVAS.....72

VII. BIBLIOGRAFÍA.....73

VIII. ANEXOS.....96

I. INTRODUCCIÓN.

Ancestría del DNA mitocondrial en población mexicana.

Historia del mestizaje en México.

Aproximadamente, el 95% de la población mexicana actual se puede considerar como mestiza (INEGI 2010). De acuerdo al INAH, para que un individuo sea considerado como mestizo, debe tener un apellido de origen español y ancestros de tercera generación que hayan nacido en México (Gorodezky et al. 2001). El origen de la población mestiza mexicana, surge hace 500 años aproximadamente, cuando los colonizadores españoles tuvieron los primeros contactos con los pobladores nativos del nuevo continente (Ochoa 1995, Serrano 2004). Por otro lado, a la llegada de los españoles, la región geográfica con mayor densidad poblacional indígena era la región centro-sur del país, que incluía al imperio azteca (Smith 2001). Sin embargo, en la región norte del país, los pobladores indígenas no formaron grandes comunidades y se caracterizaron más por ser poblaciones nómadas. En la región centro de México, una vez concluida la conquista de los aztecas, los españoles fundaron la ciudad de México desplazando a los pequeños grupos de indígenas sobrevivientes hacia las periferias del valle de México (Humboldt 1822). Durante los siguientes 300 años, el México colonial recibió un flujo constante de inmigrantes Europeos, los cuales llegaron a fundar ciudades cercanas a regiones ricas en recursos minerales en el norte y sur del país (Benitez 2002). Al mismo tiempo, los colonizadores Europeos en México facilitaron la

llegada de esclavos Africanos de África occidental, quienes posteriormente se establecieron principalmente en la región de la costa del país (Beltrán 1944). Las características fenotípicas de los individuos mexicanos en distintas regiones del país, hacen suponer que el mestizaje no ha sido homogéneo a lo largo del país (Lisker 1981). Por ejemplo, en individuos del norte del país predominan los rasgos caucásicos, a diferencia de las poblaciones del sur del país en donde prevalecen los rasgos indígenas. Este fenómeno antropomórfico también se observa a través de los estratos socioeconómicos presentes en México, en donde los rasgos Amerindios suelen ser más frecuentes en niveles socioeconómicos bajos (Ochoa 1995, Lisker 1981).

Marcadores genéticos de ancestría en la población mexicana.

La historia del mestizaje en México, también se ve reflejada en genes polimórficos de mestizos mexicanos. A través de los primeros estudios del sistema ABO también se puede correlacionar que el grado de mestizaje varía según la región geográfica de donde provienen los individuos (Lisker 1981, Lisker et al 1988 y 1990). Esta variación del mestizaje a través del país pudiera representarse gráficamente en un triángulo, en donde en cada vértice se localizan aquellos individuos genéticamente “puros” de ancestría amerindia, europea y africana (Ver Fig. 1). La ancestría europea predomina en la región del norte de país, mientras que en la región centro-sur predomina la amerindia. La contribución de la ancestría africana en la población mexicana puede ser hasta del 40.5% en la región de la costa (Lisker et al 1986). Estos resultados son consistentes al estudiar el polimorfismo de los alelos del complejo mayor de

Histocompatibilidad clase I y clase II (HLA, de las siglas en inglés Human Leukocyte Antigen), y los repetidos cortos en tándem (STR, de las siglas en inglés Short Tandem Repeats) en poblaciones mestizas mexicanas de varias regiones del país (Gorodezky et al. 2001, Vargas-Alarcón et al. 2010, Luna-Vázquez et al. 2003, Gutiérrez et al. 2007, Licea et al. 2006, H.Rangel-Villalobos et al. 2000).

Por otra parte, a lo largo de la historia de México, las uniones que propiciaron el mestizaje fueron principalmente entre varón español y mujer indígena. Notablemente, existe una correlación del mestizaje y la ancestría del DNA mitocondrial y el cromosoma Y en la población mexicana. Por ejemplo, el alelo DSY199T* es el alelo Amerindio más frecuentemente encontrado en el continente americano y su frecuencia en poblaciones mestizas mexicanas es del 26.9% (Bonilla et al. 2005, Martínez-Marignac et al. 2007). Sin embargo, se sugiere que la frecuencia de este alelo Amerindio sufrió un cuello de botella posterior a la conquista de los pueblos indígenas por parte de los españoles. Además, como era de esperarse, la contribución europea en el cromosoma Y en la población mestiza mexicana es del 60% (Martínez-Marignac et al. 2007). Por el contrario, la ancestría mitocondrial Amerindia predomina en la población mestiza mexicana como resultado del tipo de mestizaje descrito previamente.



Figura 1. Representación relativa de los componentes Europeos, Amerindios y Africanos en la ancestría de la población mexicana actual.

El DNA mitocondrial.

El DNA mitocondrial (DNAMt) es un genoma no nuclear que se localiza en la membrana interna de las mitocondrias y presenta un elevado número de copias (100-500 copias; Malka et al. 2006). Además de haber sido el primer genoma secuenciado en su totalidad, el DNAMt presenta características muy peculiares que lo diferencian del genoma nuclear. El DNAMt consta de una doble hebra de DNA circular de aproximadamente 16 KB, con una región regulatoria de control y una región codificante que contiene 37 genes (Ver Figura 2; Malka et al. 2006, Anderson et al. 1981). En base al contenido de G+T en ambas hebras del DNA, el DNAMt se puede separar de acuerdo a la densidad en gradientes desnaturalizantes en una cadena pesada (del inglés H-strand) y una cadena ligera (L-strand). El contenido genético del DNAMt incluye a dos RNA ribosomales, 22 RNAs de transferencia (RNAt) y 13 subunidades de las proteínas que componen la cadena respiratoria. La cadena pesada codifica la mayor parte de la información genética contenida en el DNAMt (Ver Fig. 2). La región no codificante del DNAMt o de control, mejor conocida como región D-loop (del inglés, Displacement loop), contiene tres regiones hipervariables (RHV1, RHV2, RHV3), el origen de replicación de la cadena pesada (O_H), los promotores para la transcripción de los genes de ambas cadenas y otros elementos-cis reguladores tanto de la replicación como de la transcripción (Fernández-Silva et al. 2003, Wanrooij et al. 2010).

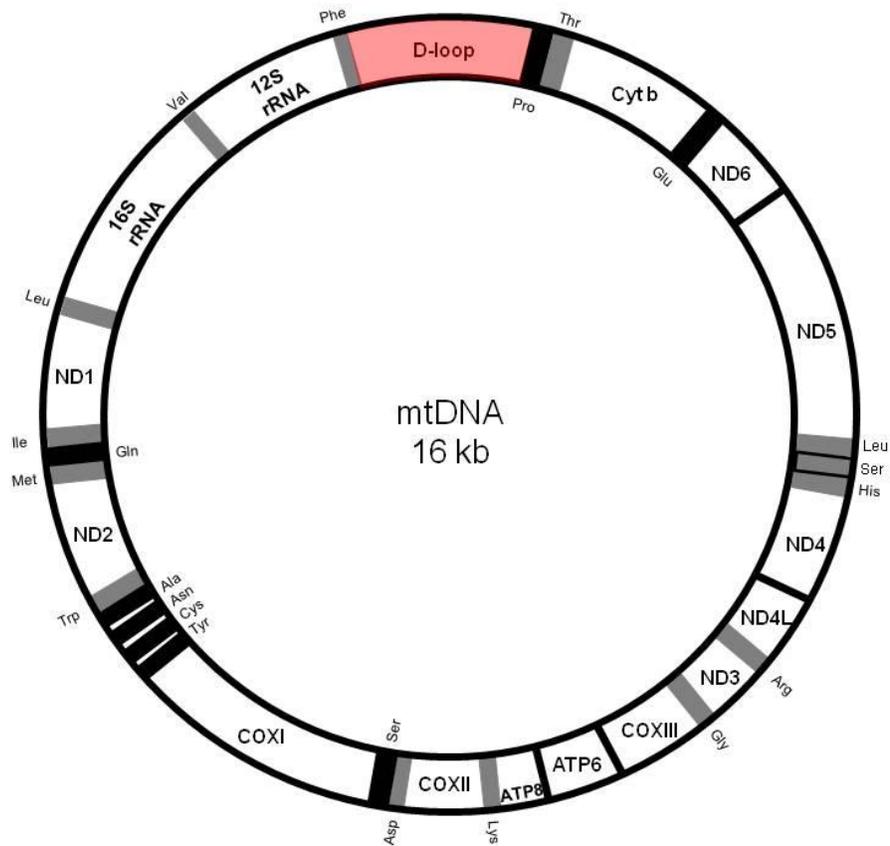


Figura 2. Representación esquemática del genoma mitocondrial humano. En color rojo se muestra la región reguladora D-loop o de control del DNAm. Los 13 genes mitocondriales están indicados en los cuadros color blanco. Las cajas color gris representan los tRNAs de la cadena pesada (H) y las cajas negras de la cadena ligera (L).

Otra característica del DNAm, es su segregación genética, pues se hereda exclusivamente por vía materna (Giles et al. 1980). Esto es debido a que en el momento que el espermatozoide fecunda al óvulo, no ingresan mitocondrias paternas o la cantidad suele ser muy pequeña y son eliminadas en las divisiones subsecuentes (Sutovsky et al. 2000, Sutovsky et al. 2004). Por otra parte el genoma mitocondrial se considera como un genoma haploide, pues es un genoma que se hereda en bloque y carece de recombinación.

Por último, el DNAMt presenta una tasa de mutación de 5 a 10 veces más elevada que el DNA nuclear (Ingman et al. 2000). La elevada tasa mutacional del DNAMt se debe a que carece de histonas que lo protejan, la pobre fidelidad de la DNAMt polimerasa (Pol- γ), además de que se encuentra asociado a la membrana interna de la mitocondria donde existe un ambiente superoxidante ocasionado por los radicales libres de oxígeno (Fernández-Silva et al. 2003). Además, se sabe que la tasa de mutación no es homogénea a lo largo del genoma mitocondrial, ya que la región D-loop presenta una tasa de mutación mucho más elevada que la región codificante especialmente en las regiones hipervariables 1 (HVR1) y 2 (HVR2; Soares et al. 2009). Gracias a la rápida tasa de evolución del DNAMt, ha sido posible realizar estudios evolutivos de eventos recientes con una mejor resolución (Kivisild et al. 2006).

DNA mitocondrial y genética de poblaciones.

Debido a la alta tasa de mutación, al elevado número de copias y la facilidad para aislar su genoma, el DNAMt se ha utilizado como una herramienta en la genética de poblaciones (Brown et al. 1980, Pakendorf et al. 2005). Mediante el análisis de marcadores genéticos se ha buscado contestar la pregunta del origen del hombre moderno, y el DNAMt no ha sido la excepción. Inicialmente, fue a través de enzimas de restricción (RFLPs, del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) que se pudo identificar una variación en DNAMt de individuos de distintas regiones geográficas (Whittam et al. 1986). Sin embargo no fue hasta los primeros estudios realizados por Cann y cols., en 1987 en los que se propone la teoría del origen común del hombre

moderno en el continente Africano (Eva Mitocondrial) (Cann et al. 1987). Estos análisis permitieron construir las primeras filogenias del DNAMt que logra separar las poblaciones del África sub-Sahara de las poblaciones de Eurasia.

Una de las razones por las que fue criticada la teoría del origen común en África, fue debido al método inter-específico (NJ, del inglés neighbourhood joining method) utilizado para realizar la filogenia (Templeton et al. 2005, Templeton et al. 1997). Estos métodos fueron diseñados en un principio para calcular tiempos de divergencias entre especies, en nuestro caso, la separación del hombre moderno de los homínidos (Saitou et al. 1987). Sin embargo, el tiempo de aparición del hombre moderno es relativamente reciente (hace ~200 mil años), y aunque existen diferencias fenotípicas notables entre los distintos grupos étnicos alrededor del globo, la diversidad genética del ser humano continúa siendo baja en comparación con otras especies (McDougall et al. 2005, Cavalli-Sforza et al. 2003). Es por ello que al elaborar filogenias inter-específicas con el polimorfismo mitocondrial, se ha observado patrones multifurcados, agrupaciones de haplotipos “fantasmas”, falsos o carentes de resolución (Ingman et al. 2000, Kivisild et al. 2006). A pesar de estos inconvenientes, a través de las filogenias mitocondriales se han obtenido resultados consistentes, los cuáles han sido reforzados en la selección de los individuos, secuenciación completa del genoma mitocondrial y el desarrollo de nuevos métodos intra-específicos para elaborar redes de haplotipos mitocondriales (Kivisild et al. 2006, Bandelt et al. 1999, Posada et al. 2001, Maca-Meyer et al. 2001). Con estos estudios podemos destacar que existen polimorfismos “ancestrales” en el DNAMt, que permiten agrupar los haplotipos de DNAs mitocondriales individuales de acuerdo a la región geográfica; lo que se conoce como haplogrupos mitocondriales

(Kivisild et al. 2006). En la filogenia o red del DNA mitocondrial existe una clara separación entre los individuos del África sub-Sahara y aquellas poblaciones que componen a la región de Eurasia (Ver Figura 3; Maca-Meyer et al. 2001). Por último, utilizando la filogeografía mitocondrial, se han hecho estimados de los patrones de migración ocurridos a lo largo de la historia del hombre moderno, tal es el caso de la salida y dispersión desde el continente Africano y la colonización del nuevo continente con los primeros pobladores Amerindios (Maca-Meyer et al. 2001, Salas et al. 2004, Kivisild et al. 2002, Kivisild et al. 1999).

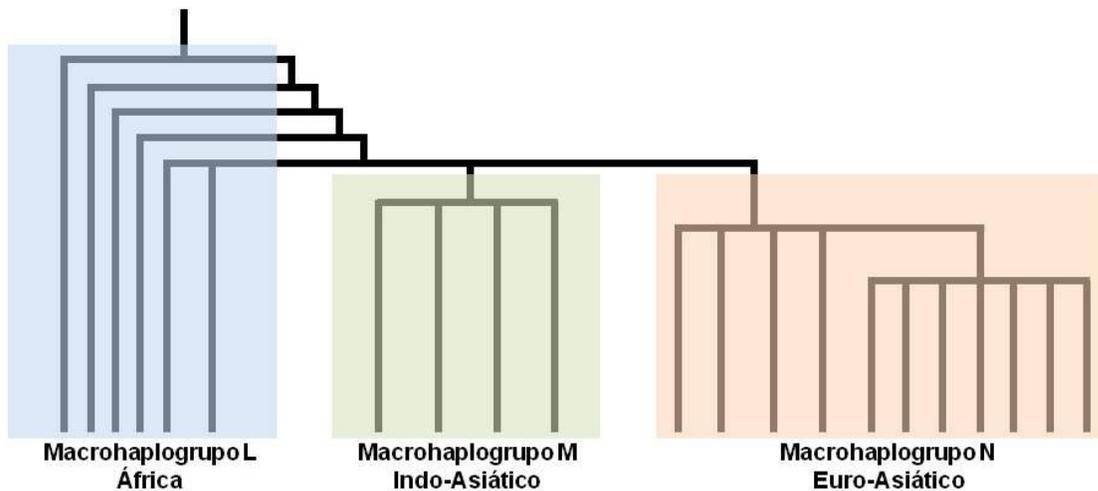


Figura 3. Filogenia global del DNA mitocondrial humano. En la filogenia están representados los tres grandes linajes mitocondriales y su distribución geográfica.

Como ha sido mencionado previamente, los haplotipos mitocondriales individuales pueden agruparse en diferentes haplogrupos mitocondriales según la región geográfica de cada individuo. Dichas agrupaciones se deben a que a lo largo del linaje mitocondrial se han originado polimorfismos que son compartidos en algunos grupos poblacionales. Se define como polimorfismo mitocondrial aquel cambio en cualquier

nucleótido del DNAMt, respecto a la secuencia utilizada como referencia (rCRS, del inglés revisited Cambridge Reference Sequence) y que haya sido reportado previamente en la base de datos del Mitomap.org (Andrews et al. 1999). Es probable que la mayor parte de los polimorfismos mitocondriales se hayan mantenido como un mecanismo adaptativo a las distintas condiciones climáticas adversas a las que se ha enfrentado el ser humano (Brandon et al. 2006). La designación de los haplogrupos mitocondriales se ha hecho con las letras del alfabeto. Las poblaciones africanas se encuentran representadas por el macrohaplogrupo L y las de Eurasia por los Macrohaplogrupos M y N, los cuales están separados por una transición en la posición 10398 (C por T). El haplogrupo N está compuesto por los haplogrupos de origen caucásico H, J, K, T, W, I, V y U, y los haplogrupos Amerindios B2 y A2. En cambio, el haplogrupo M contiene a los haplogrupos C1 y D1 junto con los haplogrupos M y G (Ingman et al. 2000, Maca-Meyer et al. 2001).

Los llamados haplogrupos Amerindios fueron los primeros haplogrupos en identificarse a través de enzimas de restricción y en ese entonces fueron designados con las letras A, B, C y D (Torroni et al. 1992, Torroni et al. 1993, Torroni et al. 1994). Posteriormente, al secuenciar tanto la región codificante como de la región de control del DNAMt de individuos Amerindios, se determina la nomenclatura actual que corresponde a las letras A2, B1, C1 y D1 (Bandelt et al. 2003). Estos haplogrupos presentan polimorfismos distintivos de los haplogrupos A, B, C y D encontrados en poblaciones asiáticas. Los haplogrupos mitocondriales predominan en la mayor parte de las poblaciones de Latinoamérica y su frecuencia está en función de la historia del mestizaje de cada región (Salas et al. 2008, Salas et al. 2008, Martinez-Marignac et al.

2007). En México se han realizado algunos estudios de la ancestría mitocondrial en poblaciones indígenas y mestizas, por lo que se sabe que la ancestría materna en México es de predominio Amerindio (Green et al. 2000, Peñaloza-Espinosa et al. 2007). Cabe mencionar que la mayor parte de los estudios realizados en México, fueron realizados mediante el análisis de RFLPs y poco se sabe del polimorfismo en la región de control de la población mestiza mexicana.

DNA mitocondrial y cáncer.

Las mitocondrias son los organelos considerados como las baterías de la célula, pues en ellas se lleva a cabo la síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa (55). En el proceso de la glucólisis aeróbica, por cada molécula de glucosa se sintetizan 32 moléculas de ATP en presencia de oxígeno. Del 100 % del total de oxígeno consumido, un 2-4% del oxígeno consumido es convertido a especies reactivas de oxígeno (ERO) (Wallace et al. 2010, Hamanaka et al. 2009). Las EROs han sido directamente vinculadas con el proceso de carcinogénesis, debido a los efectos oxidativos ocasionados por estas especies en macromoléculas de la célula y la modulación de vías de señalización activadas por mitógenos (Hamanaka et al. 2009, Levine et al. 2010). Se ha asociado el efecto de las especies reactivas de oxígeno directamente en la mutagénesis del DNAm de varios tumores (Bayona-Bafaluy et al. 2010). Por ejemplo, se han identificado mutaciones somáticas distribuidas en todo el genoma mitocondrial en tumores de mama, cabeza y cuello, hepáticos, de colon entre otros (Akouchekian et al. 2011, Vivekanandan et al. 2010, Ye et al. 2010, Allegra et al. 2006).

Las mutaciones somáticas en el DNAm son eventos muy frecuentes en los tumores y llama la atención entender si estas mutaciones son funcionales para el tumor, fueron originadas como consecuencia del proceso tumoral o han sido artefactos experimentales (Brandon et al. 2006, Salas et al. 2005). A través de ensayos con híbridos se ha podido observar el efecto de las mutaciones somáticas en los procesos de crecimiento tumoral y en la generación de especies reactivas de oxígeno (Bayona-Bafaluy et al. 2010). Estos ensayos soportan la idea del importante rol que tiene la mitocondria en el proceso de la carcinogénesis. Por otra parte, existen reportes de que un 77% de las mutaciones somáticas reportadas en los tumores, corresponden a polimorfismos encontrados en DNA mitocondrial de línea germinal (Brandon et al. 2006). Es por ello que se ha estudiado el polimorfismo mitocondrial de línea germinal y su riesgo para cáncer en distintos tipos de tumores a través de estudios de asociación mitocondrial (Fang et al. 2010, Singh KK et al. 2009, Wang et al. 2007, Booker et al. 2006, Datta et al. 2007).

Factores genéticos asociados al cáncer del cuello uterino.

Virus del Papiloma Humano (VPH).

El virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de DNA de doble hebra de aproximadamente 8 Kb y pertenece a la familia de los *Papillomaviridae*. El genoma del VPH es circular y se encuentra protegido por una cápside. Los VPHs que infectan al ser humano pertenecen al género alpha-papilomavirus, el cual se compone de 15 especies (de Villiers et al. 2004). De acuerdo a la similitud del genoma, los VPHs son clasificados en tipos virales, subtipos y variantes. Los tipos virales difieren entre en más del 10% de su genoma y a cada uno se le asigna un número arábigo (Ej. HPV6, HPV11, etc.). Sin embargo, cada tipo viral no se puede considerar como un ente aislado único, más bien se compone de un conjunto de variantes que difieren entre sí en menos del 2% de su genoma. Respecto a los subtipos, estos difieren de los otros VPHs en más del 2% pero menos del 10% y actualmente solo se han identificado 5 subtipos que cumplen estos criterios (HPV34, 44, 54, 68 y 82) (de Villiers et al. 2004, Burk et al. 2009).

El genoma del VPH consta de 3 regiones (ver Figura 4): una región reguladora que contiene los elementos cis que regulan la transcripción y replicación del virus, una región temprana con los marcos de lectura para los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y una región tardía que codifica a los genes L1 y L2. Los genes E1 y E2 están involucrados en la replicación y control de la transcripción del DNA viral. El gen E4 está involucrado en la alteración de la red del citoesqueleto, pero del gen E5 conoce

muy poco acerca de su función. Los genes E6 y E7 son los genes conocidos como oncogenes, ya que sus productos tienen propiedades transformantes y reguladoras del ciclo celular. La proteína E6 favorece la degradación de la proteína p53, mientras que la proteína E7 secuestra a la proteína de Retinoblastoma para que pueda ser liberado E2F e inicie el ciclo celular. Finalmente los genes encargados de las síntesis de las proteínas de la cápside son los genes L1 y L2 (Fehrmann et al. 2003).

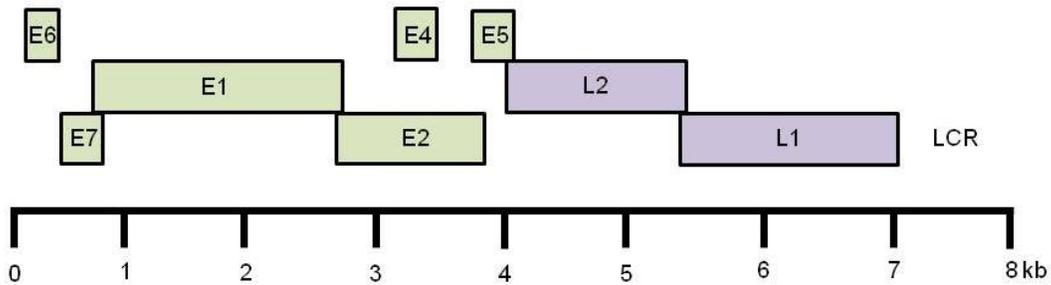


Figura 4. Organización del genoma del VPH. Los genes tempranos están representados en color verde y los tardíos en violeta.

Patogenia del VPH en el desarrollo del cáncer cervical.

A pesar de los esfuerzos del sistema de salud pública en México, el cáncer Cervicouterino (CaCu) se mantiene como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas (Palacio-Mejía et al. 2009). El virus del papiloma humano se encuentra asociado al desarrollo del cáncer del cuello uterino, ya que el genoma viral se encuentra en hasta un 99.7% de las biopsias tumorales (Walboomers et al. 1999, Clifford et al. 2005). De los 100 tipos virales que infectan al ser humano, existen al menos 40 tipos virales que infectan al tracto anogenital. Los virus del papiloma humano se clasifican epidemiológicamente en virus de alto y bajo riesgo (Munoz et al. 2003). Los tipos virales de bajo riesgo están asociados principalmente a lesiones de tipo condilomatosas y lesiones cervicales de bajo grado. Por otra parte los tipos virales de alto riesgo son aquellos que están asociados a lesiones cervicales de alto grado, cáncer cervical invasor y en menor proporción al carcinoma de pene. De los tipos virales asociados a cáncer cervical, el tipo viral más frecuente asociado a cáncer es el VPH16 (más del 50% de los casos), después le siguen en orden descendente los tipos 18, 31 y 45 principalmente (Munoz et al. 2003, Castellsagué et al. 2008, Lizano et al. 2006, Franceschi et al. 2006). El principal mecanismo de transmisión del VPH es a través del contacto sexual y la prevalencia de la infección suele ser muy elevada en la población sexualmente activa, teniendo un pico máximo en los grupos de edad de 20-30 años que posteriormente declina conforme avanza la edad (Clifford et al. 2005). En las mujeres después de los 50 años existe un incremento en la prevalencia de la infección por este virus, y aunque las causas no se conocen con certeza, se sugiere

que es un efecto cohorte o inclusive una reactivación de la infección (Franceschi et al. 2006, Trottier et al. 2006).

Para que una mujer llegue a desarrollar cáncer cervical se requiere una serie de eventos consecutivos posterior a la infección por el virus del papiloma humano. El ciclo de vida del VPH, en condiciones naturales, depende estrechamente del programa de diferenciación celular del epitelio plano escamoso del cuello uterino (Longworth et al. 2004). A través de pequeñas micro-abrasiones, el virus infecta a las células basales o de reserva del epitelio, en donde se establece en forma episomal con 50-100 copias virales por célula. Una vez dentro de la célula, el virus utiliza su maquinaria para llevar a cabo la replicación del genoma viral, así como la transcripción de sus genes. En las células suprabasales del epitelio, ocurre la expresión controlada de los oncogenes E6 y E7, para posteriormente expresar los genes tardíos y completar su ciclo. La fase donde son liberadas las partículas virales es conocida como fase productiva. La fase productiva del ciclo está directamente relacionada con las lesiones cervicales de bajo grado (Longworth et al. 2004, Doorbar 2005).

El cáncer cervical se origina a partir de lesiones conocidas como pre-invasoras o neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), y el grado de severidad depende del espesor del epitelio cervical afectado por las células atípicas o infectadas por el VPH (Lizano et al. 2009.). Uno de los factores de riesgo conocidos para la progresión de las lesiones pre-invasoras hacia un cáncer invasor es la infección persistente con un VPH de alto riesgo (Lizano et al. 2009, Woodman et al. 2007). A diferencia de los virus de bajo riesgo, muchos de los virus de alto riesgo son incapaces de mantenerse en forma episomal. Es en estos virus que ocurre frecuentemente la integración del genoma del

virus del papiloma humano dentro del DNA de la célula hospedera (Pett et al. 2007). Esto ocurre en la fase del ciclo conocida como abortiva y ocurre en las células basales del epitelio como resultado de una exposición prolongada al virus. La integración del genoma viral, por lo regular resulta en la ruptura de la región que codifica para el gen E2, aboliendo la actividad represora transcripcional de la proteína sobre los oncogenes virales. Posterior a la integración se incrementan los niveles de expresión y la estabilidad de los transcritos que codifican para las proteínas E6 y E7. Los productos de la transcripción de los oncogenes virales en las células basales inhiben la diferenciación celular e inducen altos niveles de inestabilidad cromosómica, que eventualmente pudieran dirigir la progresión hacia un fenotipo maligno. Estos cambios son ocasionados por la degradación de p53 y la inhibición de pRB por parte de E6 y E7, respectivamente. Aunque estos pasos son esenciales para el proceso de transformación e inmortalización, no son suficientes producir un fenotipo maligno en la célula epitelial cervical (Peter et al. 2006, Steenbergen et al. 2005).

Genes de protección y susceptibilidad en cáncer cervical.

A pesar de la elevada prevalencia en la infección por el virus del papiloma humano, se estima que de 1000 mujeres infectadas por cualquier VPH solo 8 llegarán desarrollar cáncer cervical (Schlecht et al. 2003, Schlecht et al. 2001). El cáncer se pudiera clasificar como una enfermedad compleja en donde influyen múltiples factores, tanto ambientales (VPH) y genéticos que todavía no se determinan por completo. Al igual que en otras enfermedades complejas, la participación genética no es muy evidente y

el patrón de herencia es difícil de establecer. Recientemente, se ha sugerido que los factores genéticos pudieran modular el riesgo para cáncer cervical causado por la infección por VPH (Wang et al. 2003). Datos que soportan ello, en una enfermedad con un factor ambiental fuerte como el VPH, el componente hereditario encontrado en estudios familiares y en gemelos es relativamente alto (~60%; Magnusson et al. 2000, Hemminki et al. 2006). Por otra parte, se ha reportado que los familiares en primer grado de mujeres con cáncer cervical tienen hasta tres veces más riesgo para desarrollar cáncer cervical (Zelmanowicz et al. 2005). Aunque estos estudios no pueden discernir de manera exacta los factores ambientales que pudiesen compartir miembros de una familia, no se puede descartar que exista una agregación familiar en la enfermedad.

Quizá uno de los primeros estudios de asociación para riesgo de cáncer por VPH ha sido el polimorfismo de los alelos del complejo mayor de Histocompatibilidad (HLA, Human Leukocyte Antigen) de clase I (HLA I) y de clase II (HLA II). Los genes del complejo HLA participan en la respuesta inmune humoral y celular. Estos genes codifican para proteínas que participan en el procesamiento y presentación de péptidos en la membrana celular. Las moléculas HLA I se encuentran en todas las células y presentan los péptidos intracelulares a los linfocitos CD8+, mientras que las moléculas HLA II se encuentran en los linfocitos B y las células profesionales presentadoras de antígenos, como los macrófagos y células dendríticas, las cuales presentan péptidos extracelulares a los linfocitos CD4+. Del complejo HLA I existen 3 loci (A, B, C) y del complejo HLA II, los loci DR, DQ y DP. Se sabe que estos genes son muy polimórficos y que existe una gran cantidad de alelos de estos loci en la población. La respuesta

inmune desatada contra la infección por el VPH pudiera ser distinta entre los individuos con diferentes combinaciones alélicas (haplotipos) de los genes de clase HLA I y HLA II, ya que la eficiencia en el procesamiento y presentación de los péptidos derivados de los antígenos virales puede ser variable. Estas diferencias pudieran afectar la naturaleza de la respuesta inmune y por lo tanto la duración o persistencia de la infección del VPH; la progresión de la infección viral a lesiones cervicales de alto grado, y después a un cáncer invasor. Al estudiar el polimorfismo de estos genes, ciertos alelos de clase I (HLA-Cgrp1, HLA-Cgrp2) y clase II (HLA-DRB1*1301, HLA-DRB1*1501) confieren protección o susceptibilidad para desarrollar una NICs de alto grado. De forma interesante, los portadores de alelos protectores de moléculas HLA-II presentan cargas virales bajas, infecciones virales de corta duración y un riesgo disminuido para desarrollar lesiones de alto grado. Algunos de los alelos que confieren un riesgo elevado para padecer cáncer del cérvix son el DQB1*0301, DQB1*0303 (Wank et al. 1992), DQB1*06 (Beskow et al. 2001), DRB1*15, DRB1*1503 (Maciag et al. 2000), DRB1*1001, DRB1*1101, (Madeleine et al. 2002) y DRB1*1501 (Engelmark et al. 2004). Alelos que confieren protección son el DRB1*1301 (Wang et al. 2001), DRB1*0101, DRB1*05, DRB1*1302, DQA1*0101/04 (Maciag et al. 2000), DRB1*0301 y DRB1*13 (Madeleine et al. 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos no son consistentes en todas las poblaciones analizadas; esto quizá porque en los estudios reportados no se han considerado los tipos y variantes virales presentes en las lesiones neoplásicas o por la variación genética propia de cada población. Otros genes involucrados con la respuesta inmune como los de IL10, TNF-alfa y Fas fueron estudiados en forma aislada. El alelo A del polimorfismo IL10-592 se encuentra

asociado al cáncer del cérvix (Zoodma et al. 2005), al igual que el alelo FasL-844C confiere un riesgo tres veces mayor que el alelo 844T (Sun et al. 2005) y el alelo 308A del TNF-alfa un riesgo dos veces mayor (Duarte et al. 2005) para el desarrollo de la enfermedad. Los polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo de drogas, xenobióticos y agentes carcinogénicos como el CYP1A1 (Joseph et al. 2006, Taskiran et al. 2006) y CYP2E1 (Ferreira et al. 2006) son asociados también al cáncer del cérvix. Algunos alelos de genes involucrados en el ciclo celular, como el gen de la ciclina D1 (CCND1) que es un importante regulador positivo de la fase G1/S del ciclo celular, también es asociado al cáncer del cérvix, especialmente el polimorfismo A870G del gen CCND1 que confiere un riesgo tres veces mayor para desarrollar cáncer (Catarino et al. 2005). Otros genes no relacionados al HLA en los que se ha buscado su asociación a la enfermedad han sido proteasas como la metaloproteasa MMP-7 (Singh et al. 2008), TNF-alfa, ItA TAP1 y TAP2 y genes para enzimas reparadoras de ADN (He et al. 2008, Juárez-Cedillo et al. 2007, Wang et al. 2010). Es importante resaltar que la razón de momios obtenida de estos estudios, es moderada, lo cual pudiera deberse a la heterogeneidad de la enfermedad.

Resumen

Aunque el Virus del Papiloma Humano es el principal factor para el desarrollo del cáncer cervical (CC), existen datos que indican que los factores genéticos pudieran estar involucrados en la enfermedad. Estudios en hermanos sugieren que los factores heredados vía materna también podrían estar involucrados en el CC. El DNA mitocondrial se hereda exclusivamente por vía materna y se ha asociado a algunos tipos de cáncer. Para evaluar si el polimorfismo del DNA mitocondrial (DNAMt) está asociado al cáncer cervical y la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), se realizó un estudio de casos y controles en la población mestiza mexicana. Por otro lado, existen pocos datos reportados acerca de la variación genética del DNAMt en esta población mestiza. Por consiguiente, se describió el polimorfismo mitocondrial de la región D-loop en el grupo control. A partir del DNA total de sangre periférica, se secuenciaron y analizaron las regiones hipervariables 1 y 2 del DNAMt en 187 pacientes con cáncer cervical y 270 controles sanos. Se realizó la detección y tipificación del VPH en ambos grupos de mujeres. Además, se analizó la expresión de 29 genes mitocondriales en 45 biopsias tumorales de las pacientes utilizando microarreglos de RNA. En la población mestiza mexicana, se encontró que la frecuencia de los haplotipos amerindios fue de 93.3%, seguida de los haplotipos europeos (6.0%) y africanos (0.7%). En esta población, los haplogrupos Amerindios encontrados fueron el A2 (51.1%), B2 (17.8%), C1 (18.5%) y D1 (5.9%). Interesantemente, en el estudio de casos y controles, el haplogrupo amerindio B2 incrementó el riesgo para CC (RM=1.6, IC 95%: 1.05-2.58) y mostró un efecto aditivo de 36% sobre el riesgo conferido por el VPH (RM=153, IC 95%: 65.4-357.5). Dos genes

mitocondriales (tRNA Asp, tRNA lys) podrían estar involucrados en el incremento del riesgo por el haplogrupo B2, ya que estos se encontraron sobre-expresados en los tumores del haplogrupo B2. Por otro lado, las pacientes del haplogrupo D1 presentaron una alta frecuencia de los tipos virales 31, 45 y otros VPHs en comparación con la prevalencia de los tipos 16 y 18. Los resultados del presente trabajo sugieren que el polimorfismo del DNAm podría modular el riesgo del CC causado por la infección del VPH.

Palabras clave: Amerindio, región de control, haplogrupo, haplotipo, mestizo, DNAm, red de haplotipos, HPV, cáncer cervical

II. Objetivos.

Objetivo general:

Identificar la asociación del polimorfismo de la región D-loop del DNA mitocondrial y cáncer del cuello uterino en un estudio de casos y controles.

Objetivos Particulares:

- Identificar el polimorfismo y ancestría mitocondrial en la región D-loop del DNA mitocondrial en mujeres mestizas mexicana sanas.
- Realización de un estudio de asociación mitocondrial entre mujeres mestizas mexicanas sanas y mujeres diagnosticadas con CaCU.
- Determinar los patrones de expresión genética de los genes mitocondriales en mujeres con cáncer estratificadas por los haplogrupos amerindios.

III. HIPÓTESIS.

Si se ha encontrado una asociación del DNA mitocondrial con algunos tipos de cáncer, entonces algunos polimorfismos mitocondriales pudieran conferir un riesgo o protección para desarrollar cáncer cervical.

II. JUSTIFICACIÓN.

Aunque en México se han hecho esfuerzos importantes por parte de los sistemas de salud para detectar oportunamente el Cáncer Cervical a través del Papanicolaou; el CaCu se mantiene entre las cinco primeras causas de muerte por cáncer en las mujeres del país. Por otra parte, aunque ya se han desarrollado vacunas profilácticas para evitar la infección por el virus del papiloma humano, los efectos directos de estas vacunas sobre la incidencia de CaCu se espera que sean visibles hasta dentro de 10-15 años aproximadamente. La identificación de polimorfismos en la población que estén asociados a un riesgo o protección para desarrollar CaCU, permitirá identificar grupos de susceptibilidad en la población mexicana para establecer un seguimiento más estrecho. Una de las características de los estudios del polimorfismo de genes y su asociación a enfermedades complejas, son los efectos leves de estos locus o genes en la enfermedad. Al incrementar el conocimiento de aquellos genes que estén relacionados con el riesgo para CaCU, permitirá desarrollar nuevos algoritmos que incluyan la interacción de estos con la infección del VPH y establecer estimados más aproximados del riesgo en las mujeres infectadas por este virus. Además, el presente estudio también permitirá conocer en detalle el polimorfismo mitocondrial de la población mestiza mexicana. Los resultados complementarán los resultados de estudios previos para conocer mejor los patrones de ancestría mitocondrial en población mexicana.

VI. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

VI.I Identificación del polimorfismo y ancestría mitocondrial en la región D-loop del DNA mitocondrial en mujeres mestizas mexicana sanas.

Materiales Y Métodos.

Muestras.

Se tomaron muestras de sangre periférica de 270 mujeres sanas, no relacionadas entre sí, que atienden al servicio de colposcopia del Hospital General de México. Todas las mujeres son nacidas en México y tienen una ascendencia mexicana de dos generaciones atrás. De las 270 mujeres: 100 son de la Ciudad de México, 115 de la región central del país, 47 de la región de la costa (Ocho de la costa del Golfo de México y 39 de la costa del Pacífico) y 8 de la región del norte del país (Ver Fig. 5). Todas las mujeres aceptaron participar en el estudio y firmaron una hoja de consentimiento por escrito. El protocolo y los procedimientos del estudio fueron revisados y aprobados por el comité científico y de ética local del Hospital General de México.



Figura 5. Localización geográfica del lugar de nacimiento de los individuos. Las muestras fueron agrupadas en aquellos individuos nacidos en la ciudad de México (flecha negra, n=100), en la región de la costa (Veracruz, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas; ||| n= 47), región norte (Jalisco, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa; ■ n=8) y la región central excluyendo a la ciudad de México (Estado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Morelos, Querétaro, Guanajuato; ≡ n =115).

Se extrajo y purificó el DNA total de los linfocitos de sangre periférica utilizando el kit comercial para extracción y purificación de DNA (Qiagen, Valencia, CA, E.E.U.U.) según las recomendaciones del fabricante. La región completa D-loop del DNAm_t (1261pb) fue amplificada mediante la técnica de PCR. El par de oligos utilizados para amplificar la región D-loop fueron el L-15926 (5'- ATACACCAGTCTTGTAACCC-3', posición rCSR 15907–15926 de la cadena ligera) y el H-00580 (5'- TTGAGGAGGTAAGCTACATA-3', posición rCSR 599–580 de la cadena pesada). Se utilizaron 500 ng de DNA total en una reacción de 25 µl que contiene 2mM de MgCl₂, 1X Buffer de PCR (50mM de KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3), 200 µM de cada deoxinucleótido tri-fosfato, 1 µM de cada primer y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, los E.E.U.U.). Las reacciones fueron realizadas en un sistema GeneAmp PCR 2720 (Applied Biosystems,

Carlsbad, CA, E.E.U.U.). Después de desnaturalizar por 2 minutos a 94 °C, se realizaron 32 ciclos estableciendo la estación 1 a 94°C por 45 segundos, la estación 2 a 60°C por 1 minuto y la estación 3 a 72 °C por 2 min. Finalmente, la PCR se mantuvo a 72°C por otros 7 minutos. Ambas cadenas de la región hipervariable 1 (RHV1, de 16024-16365) y la región hipervariable 2 (RHV2, de 73-340) fueron secuenciadas utilizando el método de secuenciación por fluorescencia (BigDye Terminator Ready Reaction Kit, Applied Biosystems). El análisis de las secuencias fue hecho en un sistema analizador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). La secuencia y posición de los oligos forward y reverso para la secuenciación se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligos utilizados para secuenciar ambas hebras de DNA de las regiones hipervariables 1 y 2 del DNA mitocondrial.

Oligo	Secuencia 5'-3'	Posición rCSR	Cadena
L-15926	ATACACCAGTCTTGTAACC	15 907–15 926	Ligera
H-16410	CACGGAGGATGGTGGTCAAG	16 414–16 395	Pesada
L-00015	CACCCTATTAACCACTCACG	15–34	Ligera
H-00383	AGGCTGGTGTAGGGTTCTT	383–364	Pesada

Análisis de los Datos.

Las secuencias de las regiones RHV1 y RHV2 de cada individuo fueron comparadas y alineadas con la secuencia revisada de referencia de Cambridge (rCSR) utilizando el programa de cómputo de AppliedBiosystems Seq Scape ver. 2.5 (Andrews et al. 1999). Los polimorfismos identificados en cada muestra fueron almacenados en una base de datos de Microsoft Office 2007 para construir e identificar los haplotipos, calcular las frecuencias alélicas y haplotípicas. Los cálculos del número promedio de diferencias por par, diversidad nucleotídica, diversidad haplotípica, *mismatch distribution*, Thau (τ) y la D de Tajima de la prueba de neutralidad fueron realizadas utilizando el programa computacional de genética de poblaciones Arlequin ver 3.11 (Excoffier et al. 2005). Los motivos presentes en ambas regiones que caracterizan a los haplogrupos mitocondriales Amerindios, (Tamm et al. 2007, Achilli et al. 2008, Forster et al. 1996) Europeos (Torroni et al. 1996, Álvarez et al. 2007) y Africanos (Salas et al. 2004) fueron utilizados para clasificar cada muestra por su haplogrupo. El algoritmo de parsimonia estadística fue aplicado para construir una red de haplotipos con las secuencias de la región de control utilizando el programa estadístico TCS ver 1.21 (Templeton et al. 1992, Clement et al. 2000). Aquellas posiciones que no se ajustan a un modelo de sitios infinitos debido a una mutación heterogénea en ambas regiones (posiciones 16 051, 16 093, 16 126, 16 129, 16 172, 16 187, 16 189, 16 223, 146, 150, 152, 182, 189, 195) fueron removidas del análisis para reducir el grado de homoplasia presente (Meyer et al. 1999). Aunque estos sitios fueron removidos, no todas las reticulaciones fueron eliminadas en la red, por lo que los loops restantes fueron resueltos utilizando los algoritmos basados en la

teoría de coalescencia (Posada et al. 2001). La significancia de las comparaciones de las diferencias promedio por par de secuencias y la diversidad nucleotídica fueron evaluadas utilizando la prueba de *t* de student. Todos los test estadísticos fueron de esta parte del trabajo fueron llevados a cabo con el programa estadístico Minitab.

Resultados y Discusión.

Identificación del polimorfismo y ancestría mitocondrial en la región D-loop del DNA mitocondrial en mujeres mestizas mexicanas sanas.

De 610 nucleótidos analizados, se encontraron un total de 162 substituciones en 154 posiciones polimórficas (102 in RHV1 y 52 en RHV2). Se identificaron un total de 202 diferentes haplotipos en toda la muestra (n=270). El número de posiciones polimórficas presentes en los haplotipos fue de 1 a 16, con una media de 8.9. En el global, 168 haplotipos (83.1%) fueron identificados solo una vez y el haplotipo más frecuente (haplotipo Mx7) estuvo presente en 15 (5.6%) de los individuos (Ver Anexo 1). Es importante mencionar que la mayor parte de los haplotipos (192; 95%) no han sido reportados previamente (Ver Anexo 1) (Tamm et al. 2007, Allard et al. 2006, Salas et al. 2008, Salas et al. 2008). La diversidad haplotípica de toda la región de control del DNAm_t fue de 0.9945, con un número promedio de diferencias por par de secuencias de 11.14 y una diversidad nucleotídica de 0.0655 (Ver Tabla 2). A diferencia de RHV1, la RHV2 tuvo 15 sitios que mostraron

indels tanto como simples inserciones (inserción a 180G) o como parte de un micro satélite polimórfico (p248–249, p286–291, p303–309 y p311–315) y una región no-micro satélite (p106–111). En el tracto de poli-citosinas p303-309, solo el 26% de los individuos mostraron siete citosinas como la rCSR, mientras la mayor parte de los individuos (54.8%) tuvieron ocho citosinas y 18.8% nueve citosinas (Ver Tabla 3). Interesantemente, in el otro micro satélite en 311-315, todos excepto un individuo tuvieron seis citosinas, una más que la reportada en la rCSR. Ambos tractos homopoliméricos de citosinas son conocidos por ser altamente variables (Stewart et al. 2001); sin embargo, en nuestra muestra solo el micro satélite p303-309 fue polimórfico. La frecuencia de los alelos en el tracto p303-309 en nuestra muestra fue similar a las frecuencias reportadas en otras poblaciones (Allard et al. 2006, Vigilant et al. 1991, Yong et al. 2005, Crespillo et al. 2000, Salas et al. 2000, Turchi 2008). La pérdida de dos adeninas en el tracto de poli-As en las posiciones p286-291 fue siempre ligado con la pérdida de una adenina en la posición p248-249 y esta combinación fue encontrada en 17.1% de los individuos examinados, mientras los individuos restantes (82.9%) tuvieron seis adeninas en el primero y dos adeninas en los últimos similar al rCSR. En 4 individuos fue encontrada una pérdida de seis nucleótidos de la posición 106 a 111, la cual ha sido previamente descrita en las poblaciones amerindias de Chibcha (Santos et al. 1994). La inserción de un nucleótido de guanina en la posición 180 fue solo encontrada en un individuo.

Tabla 2. Índices de diversidad genética calculados para toda la muestra y para los haplogrupos Amerindios y Europeos.

Estadística de resumen	Todas las muestras	Amerindios				Europeos
		A2	B2	C1	D1	
n	270	138	48	50	16	16
No. Substituciones	162	94	59	55	20	43
Sitios Polimórficos	154	93	59	55	19	43
Transiciones	143	88	50	55	18	40
Transversiones	19	6	9	0	2	3
Haplotipos	202	93	37	41	13	16
Diferencia promedio por par de secuencias	11.1	4.7*	5.8	5.9	3.7*	8.7
Diversidad Nucleotídica	0.065	0.027*	0.034	0.034	0.021	0.051
D de Tajima	-1.82**	-2.37**	-1.96**	-1.95**	-1.42**	-1.37**
Diversidad Haplotípica	0.9945	0.9823	0.9876	0.9875	0.9667	1.000

* P < 0.01, t de Student; comparando entre los haplogrupos.

** D de Tajima test, P < 0.01.

Tabla 3. Frecuencias alélicas de los micro satélites en los tractos 303-309 y 311-315 de la región hipervariable II de la región D loop del DNAm

	% (n)
p303-309	
(C) ₆	0.3 (1)
(C) ₇	26.0 (70)
(C) ₈	54.8 (148)
(C) ₈	18.8 (51)
p311-315	
	% (n)
(C) ₆	99.7 (269)
(C) ₇	0.3 (1)

Haplogrupos mitocondriales.

En toda la muestra analizada, un total de 252 individuos (93.3%) fueron clasificados dentro de uno de los haplogrupos Amerindios. Los haplogrupos Amerindios encontrados fueron el A2, B2, C1 y D1 con una frecuencia de 51.1, 17.8, 18.5 y 5.9%, respectivamente (Figura 6b). La frecuencia de los haplogrupos no-Amerindios encontrados en la muestra fue de 6.7%, de los cuáles el 5.9% (16 individuos) corresponden a los haplogrupos europeos y el 0.7% (dos individuos) a los haplogrupos africanos. La proporción de ancestría Amerindia encontrada en nuestra muestra fue ligeramente mayor, aunque no significativa, de la previamente reportada en un estudio con RFLPs llevado a cabo en población mestiza de la ciudad de México (90.5%) (Martinez-Marignac et al. 2007). En comparación con dicho reporte, en el que se incluyeron personas afiliadas al IMSS (Arredondo et al. 1999), las mujeres pertenecientes a nuestro estudio fueron captadas en el programa detección oportuna de cáncer del Hospital General de México. Dicho hospital, da servicio a gente de escasos recursos sin seguro social, y de antemano se ha sugerido que la ancestría amerindia suele ser mayor en individuos que provienen de estratos socioeconómicos bajos (Lisker 1981, Relethford et al. 1983).

Haplogrupos mitocondriales Amerindios.

Haplogrupo A2. Los polimorfismos que caracterizan este haplogrupo son las transiciones 16111T, 16223T, 16290T, 16319A, 16362C, 146C, 153G y 235G (Tamm et al. 2007, Achilli et al. 2008). Además de estos polimorfismos característicos, 50 haplotipos, incluyendo el haplotipo Mx7, mostraron la transición

73G y 263G (Ver Anexo 1). Debido a que en la mayor parte de los estudios mitocondriales previos solo se ha analizado la región hipervariable 1 del DNAMt, las posiciones de esta región fueron comparadas con las secuencias reportadas en la literatura. Los polimorfismos de la RHV1 encontrados en el haplotipo Mx7 de nuestra muestra (11.1% de todos los haplotipos cuando solo RHV1 fue considerado) han sido reportado previamente en otros estudios pero en menor proporción (5-8%) (Allard et al. 2006, Barbosa et al. 2008, Salas et al. 2008, Salas et al. 2008). De los 93 haplotipos que comprenden al haplogrupo A2, 77 tuvieron una timina en la posición 16111 y solo 16 tuvieron una citosina similar a la rCSR. Antes de la clasificación de los haplogrupos amerindios sugerida por Bandelt (Bandelt et al. 2003), el haplogrupo A era dividido en A1 y A2 por la transición en 16111 (Forster et al. 1996). Sin embargo, en estudios subsecuentes se reportó que el alelo C en la posición 16111 de los haplotipos de A2 era una mutación reversa debido a la alta tasa de mutación presente en la región de control del DNAMt (Achilli et al. 2008). La transición en la posición 16111 es característica del haplogrupo Amerindio A2, debido a que es raramente encontrado en las secuencias asiáticas del haplogrupo A (Easton et al. 1996, Kong et al. 2006). Por otra parte, el polimorfismo 16111T es raramente encontrado en otros haplogrupos (Tanaka et al. 2004, Mabuchi et al. 2007). Las sustituciones 153G and 235G fueron frecuentemente encontradas en nuestro estudio en el haplogrupo A2, con una frecuencia de 88.4 y 94.2%, respectivamente. Aunque estas posiciones caracterizan al haplogrupo A2, estas fueron encontradas rara vez en otros haplogrupos Amerindios (C y B) y no-Amerindios (H) en nuestra muestra. Interesantemente, encontramos la transición 152C en el 17.8% de las secuencias

del haplogrupo A2, mientras que en las secuencias asiáticas del haplogrupo A reportadas previamente, fue encontrada en 16 de 18 secuencias (Yao et al. 2002).

Haplogrupo B2. Este haplogrupo estuvo presente en 48 de los 270 individuos analizados, y fue el tercer haplogrupo más común de los haplogrupos amerindios encontrados en nuestra muestra. Los motivos del RHV1 característicos del haplogrupo B2 son las transiciones T16189C y T16217C (Tamm et al. 2007, Easton et al. 1996). Sin embargo, otras posiciones asociadas con los haplotipos B2 son las transversiones A16182C y A16183C (Achilli et al. 2008, Allard et al. 2006). El haplotipo Mx101 fue el más frecuente del haplogrupo B2 en nuestro estudio (cuatro individuos) e incluyó también los polimorfismos 16182C, 16183C, 16189C, 16217C, 73G y 263G (Ver Anexo 1). Considerando solo las posiciones en RHV1, este haplotipo ha sido reportado previamente una vez en Latino América (Barbosa et al. 2008, Salas et al. 2008, Salas et al. 2008). Interesantemente, el polimorfismo 16183C fue identificado en todas las secuencias del haplogrupo B2. El haplogrupo B2 en este estudio fue dividido en dos subgrupos basado en la transversión 16182C, la cual fue encontrada en 54.1% de los haplotipos B2. Estos datos contrastan fuertemente con un estudio previo realizado en población mestiza mexicana, en el cual las transversiones 16182C y 16183C no fueron encontradas en el análisis de la RHV1 de 33 individuos (Green et al. 2000). Por otra parte, la transversión en 16183 ya ha sido reportada en todos los haplotipos B analizados en Latino América y en casi todos los de Asia, mientras que la transversión 16182C fue ausente en la población de Argentina y poco frecuente en Colombia y Brasil (25%) (Barbosa et al. 2008, Salas et al. 2008, Kong et al. 2006). El

polimorfismo 16182C está ampliamente distribuido entre los haplogrupos B asiáticos, principalmente en los subhaplogrupos B4a y B4b (Kong et al. 2006, Mabuchi et al. 2007, Yao et al. 2002). De hecho, se ha sugerido que los haplogrupos amerindios B2 descienden directamente del haplogrupo B4b (Bandelt et al. 2003, Kivisild et al. 2002). De acuerdo con la filogenia más reciente, los haplotipos del haplogrupo B que tienen la transversión 16182C, pertenecen al subhaplogrupo B2c (Achilli et al. 2008).

Haplogrupo C1. El haplogrupo C1 estuvo presente en 50 (18.5%) individuos del total de la muestra analizada y fue el segundo haplogrupo más frecuente. Reportes previos han encontrado que las frecuencias del haplogrupo C1 varían a lo largo de los distintos grupos étnicos nativo Americanos de México, llegando a tener una frecuencia similar a la de haplogrupo B2 (Torroni et al. 1994, González-Oliver et al. 2001). El haplogrupo C1 es definido por los polimorfismos 16223T, 16298C, 16325C, 16327T, 73G, 263G y las pérdidas de las adeninas en las posiciones 249, 290 y 291 de la RHV2 (Bandelt et al. 2003, Tamm et al. 2007, Achilli et al. 2008). El haplotipo Mx144 tuvo los polimorfismos característicos del haplogrupo C1 y fue el más frecuente en nuestra población (cinco individuos; ver Anexo 1). Considerando solo la RHV1, este haplotipo ha sido reportado previamente en poblaciones de México y Latino América (Green et al. 2000, Barbosa et al. 2008). Aunque la pérdida de las adeninas en el tracto de poli-A del RHV2 es característica del haplogrupo C1, también han sido reportados rara vez en otros haplogrupos (Barbosa et al. 2008, Crespillo et al. 2000). Por ejemplo, en las poblaciones asiáticas, estas pérdidas han sido encontradas en los haplogrupos

A, F y R9 (Kong et al. 2006, Kivisild et al. 2002). En contraste, en los haplogrupos C4c y L2b la pérdida de una adenina en la posición 248-249 se encontró ligada a la pérdida de las dos adeninas en las posiciones 290-291 (Tamm et al. 2007, Barbosa et al. 2008). Interesantemente, la transición 16051G, la cual ha sido asociada con el haplogrupo C1d, fue encontrada en el 32% (16 individuos) de los haplotipos C1 de nuestra muestra.

Haplogrupo D1. Este haplogrupo fue el haplogrupo Amerindio menos frecuente en nuestro estudio y fue encontrado solo en 16 (5.9%) individuos. Los polimorfismos característicos en RHV1 de este haplogrupo son las transiciones 16223T, 16325C y 16362C (Tamm et al. 2007). El haplotipo más frecuentemente encontrado del haplogrupo D1 fue el Mx174 y presentó los polimorfismos característicos, más las transiciones A73G y A263G (Ver Anexo 1). Considerando sólo los polimorfismos del RHV1, este haplotipo ya ha sido encontrado previamente en Sudamérica (Salas et al. 2008). El haplogrupo D1 pertenece a una rama del haplogrupo asiático D4; sin embargo, la transición en la posición 16325 no se encuentra en los haplotipos asiáticos del haplogrupo D (Kong et al. 2006, Kivisild et al. 2002). Las frecuencias del haplogrupo D1 en poblaciones amerindias son menores en Centroamérica y elevadas en Norte y Sudamérica (Torroni et al. 1993, Torroni et al. 1994, Salzano et al. 2002).

Diversidad genética de los haplogrupos mitocondriales Amerindios.

Los índices de diversidad molecular fueron calculados para cada haplogrupo Amerindio (Ver Tabla 2). Interesantemente, aunque el haplogrupo A2 fue el más

frecuente en toda la muestra, tuvo un bajo promedio de diferencias por par de secuencias (4.7) y una baja diversidad nucleotídica (0.027) comparado con los haplogrupos B2 (5.8; 0.034) y C1 (5.9; 0.034) ($p < 0.01$, prueba de t de student). Los índices de diversidad genética del haplogrupo A2 fueron más elevados que los del haplogrupo D1, aunque estos no fueron significativos (Ver tabla 2). El mismatch distribution fue graficado para cada haplogrupo Amerindio y todos los haplogrupos mostraron una distribución uni-modal (Ver Anexo 2). Además, los valores calculados de la D de Tajima para los haplogrupos A2, B2, C1 y D1 fueron significativamente negativos (Ver Tabla 2). Un valor negativo de la D de Tajima significativo con una distribución uni-modal en la mismatch distribution sugiere una expansión demográfica (Harpending et al. 1998, Tajima et al. 1993). El valor de τ calculado para los haplogrupos A2, B2, C1 y D1 fue de 2.7, 6.1, 5.1 y 1.8, respectivamente. Utilizando τ y la tasa de mutación estimada para la región de control del DNAm (HV1R: 1.64×10^{-7} y HV2R: 2.29×10^{-7}) (Soares et al. 2009), el tiempo a la expansión demográfica calculada para los haplogrupos A2, B2, C1 y D1 fue de hace 11.6, 25.9, 21.6 y 7.9 mil años, respectivamente. Por lo tanto, la baja diversidad genética presente en los haplogrupos A2 y D1 pudiera reflejar una reciente expansión de estos haplogrupos en la población mestizo mexicana (Schneider et al. 1999). Es importante acentuar que los cálculos hechos en el presente estudio fueron realizados con los datos de la región de control del DNAm, la cual tiene una tasa mutacional más elevada en comparación con la región codificante (Torrioni et al. 1994).

Haplogrupos no Amerindios.

Los haplogrupos europeos presentes en nuestra muestra (16 individuos) fueron el H (1.9%), J (0.7%), K (0.7%), T (0.7%), U (1.9%) y V (0.4%). La frecuencia del haplogrupo H es similar a la reportada previamente en la ciudad de México (Martinez-Marignac et al. 2007). Interesantemente, este haplogrupo es el más frecuentemente encontrado en España (Torroni et al. 1996, Álvarez et al. 2007). La baja frecuencia de los haplogrupos mitocondriales europeos está relacionada con el raro mestizaje entre mujeres europeas y varones amerindios o mestizos a través de la historia de México (Ochoa 1995). Los dos individuos con haplotipos africanos pertenecen al haplogrupo L3. La frecuencia de los haplogrupos africanos encontrados en la muestra fue menor que lo previamente reportado (4.4%) (Green et al. 2000).

Topología de la red de haplotipos (mínimum spanning network) construida con los haplogrupos mitocondriales.

Las secuencias individuales que fueron previamente clasificadas en alguno de los haplogrupos mitocondriales por los motivos de la región de control, fueron representados en una red de haplotipos (mínimum spanning network, Ver Figura 6a). Claramente se puede observar que los individuos del mismo haplogrupo son agrupados. Por lo tanto, la red agrupó a los haplotipos Amerindios en los cuatro haplogrupos Amerindios (A2, B2, C1 y D1), mientras que los haplotipos no Amerindios fueron separados en dos grupos distintos, uno con los haplogrupos europeos y otro con los africanos. Los cuatro haplogrupos amerindios representados en la red tuvieron un patrón en forma de estrella con un nodo

interno conectado con otros haplotipos menos frecuentes (Ver Figura 6a). Este patrón observado en forma de estrella ha sido descrito previamente en los haplogrupos Amerindios y también sugiere una expansión de la población (Achilli et al. 2008, Harpending et al. 1998, Kaessmann et al. 2002). Los haplotipos A2 fueron agrupados en tres nodos internos principales, dos nodos tienen la transición 16111T pero están separados por la transición 153G. El tercer nodo incluye aquellos haplotipos con la transición reversa o mutación reversa 16111C. El haplogrupo B2 está representado en la red de haplotipos por dos nodos internos principales con múltiples conexiones a otros haplotipos con una topología de estrella. Ambos nodos fueron separados por la transversión A16182C. Cabe mencionar que los haplotipos B2 se encontraron cercanos a los haplotipos del haplogrupo H debido a que ambos provienen del haplogrupo ancestral R (Maca-Meyer et al. 2001), el cual pertenece al macrohaplogrupo N. Los haplotipos de los haplogrupos C1 y D1 solo tuvieron un nodo interno conectado a haplotipos individuales.

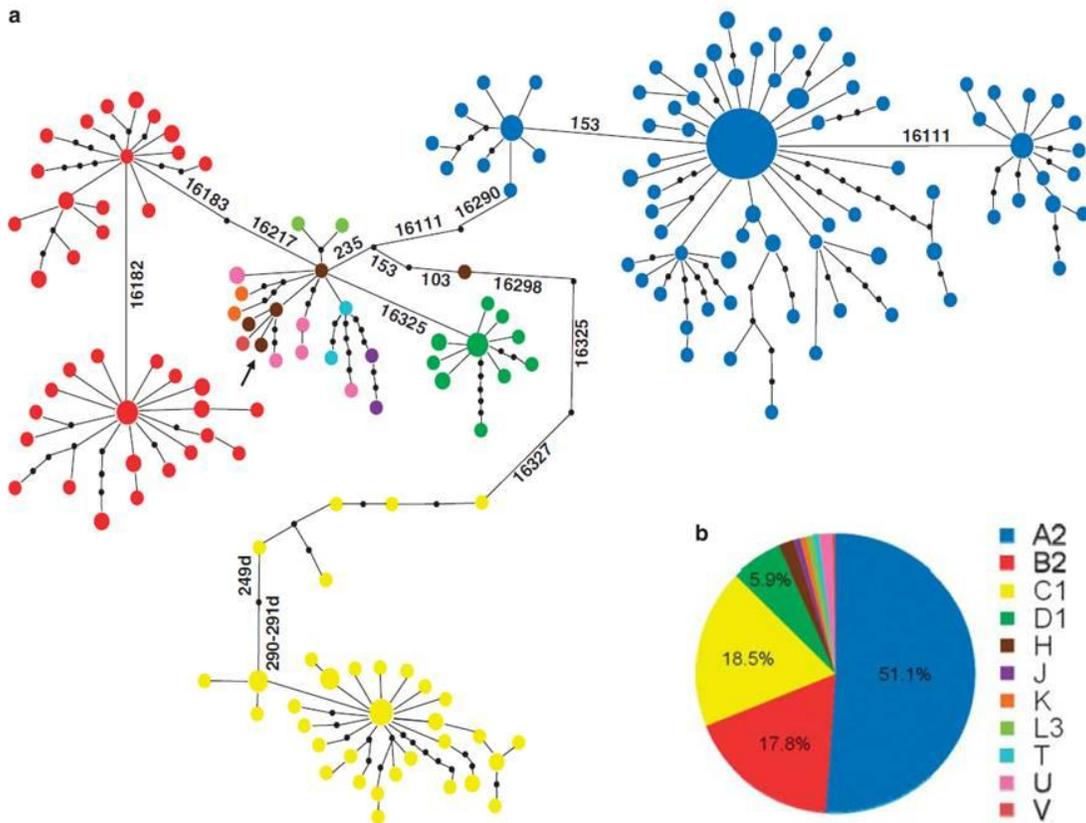


Figura 6. Haplogrupos mitocondriales en la población mestizo mexicana. (a) Red de haplotipos construida con las secuencias de la región de control del DNA mitocondrial (DNAMt). Los círculos de color en la red muestran los haplotipos dentro de cada haplogrupo y sus relaciones; el tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos. Los círculos negros representan haplotipos inferidos y la flecha indica la localización de la rCSR en la red. Los principales pasos mutacionales son mostrados. (b) Frecuencia de los haplogrupos mitocondriales encontrados en el total de la muestra; los colores de los haplogrupos son los mismos en ambas figuras.

Distribución de los haplogrupos mitocondriales por región geográfica origen.

No hubo diferencias significativas en la ancestría Amerindia entre los individuos agrupados por su región de origen (Ver Tabla 4). Sin embargo, los individuos de la ciudad de México (91.0%) y la región de la costa (91.6%) mostraron la frecuencia más baja de ancestría Amerindia, mientras que los individuos de la región central tuvieron el porcentaje más alto de esta ancestría (95.7%). Esto coincide con el hecho de que la mayor parte de las comunidades indígenas actuales, como los Náhuatl, Mazahua y Otomí, están concentrados en la región central de México (Valdés 1989, INEGI 2005). La frecuencia del haplogrupo A2 fue similar en todas las regiones; sin embargo, la transición 16111T fue significativamente más frecuente en los haplotipos A2 de la ciudad de México (94.2%, 49 de 52) que en la región central (75.4%, 43 de 57; $p < 0.01$, χ^2). Cabe mencionar que la frecuencia del haplogrupo B2 fue significativamente mayor en los individuos provenientes de la región central comparados con aquellos de la ciudad de México y la región de la costa ($p < 0.01$, χ^2). Esto a su vez, concuerda con la elevada frecuencia reportada de los haplotipos B en algunas poblaciones indígenas de las regiones centrales del país, como las Náhuatl (27-40%) o del sur, como los Mixe (33.3%) (Peñaloza-Espinosa et al. 2007, Torroni et al. 1993, Torroni et al. 1994). Estos datos también sugieren que la elevada ancestría Amerindia de nuestra muestra en la región central, es debida esencialmente al incremento en la frecuencia de los haplotipos B. La frecuencia de la transversión 16182C en los haplotipos B2 fue más frecuente en la región central (55.5%, 15 de 27 individuos) que en los haplotipos B2 de la ciudad de México (41.6%, 5 de 12 individuos), aunque esta diferencia no fue

significativa. Por el contrario, el haplogrupo C1 fue más frecuente en individuos de la ciudad de México (21%) que los de la región central (15.6%) y la región de la costa (17%), pero esta diferencia tampoco fue significativa. La baja frecuencia de los haplotipos C en la región central concuerda con la baja frecuencia de este haplogrupo en poblaciones indígenas del valle de México (Peñaloza-Espinosa et al. 2007). Por el contrario, la mitad de los ocho individuos de la región del norte tuvieron este haplotipo, lo cual coincide con la alta frecuencia de este haplogrupo en poblaciones indígenas del norte como las poblaciones Huichol (41%) y Tarahumara (38%) (Peñaloza-Espinosa et al. 2007, Torroni et al. 1993, Torroni et al. 1994). La frecuencia del haplogrupo D1 fue similarmente baja en todas las regiones geográficas analizadas. Más de la mitad de los individuos con haplogrupos europeos fueron concentrados en la ciudad de México, lo cual es consistente con las diferencias en la ancestría matrilineal en el país debido al hecho histórico de que las mujeres europeas se establecieron principalmente en la ciudad de México y en las grandes ciudades coloniales (Serrano et al. 1996).

Tabla 4. Frecuencias de los haplogrupos mitocondriales de acuerdo al lugar de origen de los individuos.

Región	Haplogrupos Amerindios							
		Amer	Eur	Afr	A2	B2	C1	D1
	n	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
Distrito Federal	100	91.0 (91)	9.0 (9)	0.0 (0)	52.0 (52)	12.0 (12)	21.0 (21)	6.0 (6)
Centro ^a	115	95.7 (110)	3.5 (4)	0.8 (1)	49.5 (57)	23.5 (27)*	15.6 (18)	7.0 (8)
Costa ^b	47	91.5 (43)	6.4 (3)	2.1 (1)	55.3 (26)	17.0 (8)	14.9 (7)	4.2 (2)
Norte ^c	8	100.0 (8)	0.0 (0)	0.0 (0)	37.5 (3)	12.5 (1)	50.0 (4)	0.0 (0)
Todos	270	93.3 (252)	5.9 (16)	0.7 (2)	51.1 (138)	17.8 (48)	18.5 (50)	5.9 (16)

*P<0.01, χ^2 test; entre las regiones

^a Estado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Morelos, Querétaro and Guanajuato.

^b Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Veracruz and Michoacán.

^c Jalisco, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango and Sinaloa.

Conclusiones.

Los resultados presentados en esta parte del trabajo son el primer análisis en detalle de la región completa de control del DNAm en la población mestizo mexicana. Aunque la diversidad haplotípica fue igualmente elevada como en otras poblaciones, la mayor parte de los haplotipos identificados en este trabajo no han sido reportados previamente. Una elevada frecuencia de la ancestría Amerindia fue encontrada en los individuos de la región central de México que en aquellos de la ciudad de México y las regiones de la costa. Estas diferencias podrían deberse a un establecimiento heterogéneo de las comunidades indígenas en el país, con una alta concentración de estas comunidades en la región central de México. La ciudad de México tuvo la mayor frecuencia de los haplogrupos europeos que las otras regiones, lo que coincide con el hecho de que la mayoría de las mujeres europeas se establecieron en esta ciudad. El test de neutralidad de la D de Tajima hecho en esta muestra y la topología de la red de haplotipos pudiera sugerir una expansión de todos los haplogrupos mitocondriales Amerindios en la población mestiza mexicana. Los valores de τ calculados para estos haplogrupos Amerindios mostraron que el tiempo a la expansión fue más reciente para los haplogrupos A2 y C1. El conocimiento de este trabajo permitirá contribuir a futuros estudios forenses, evolutivos y demográficos en mestizos mexicanos. Estos datos, en conjunto con otros marcadores genéticos, serán útiles para estimar la proporción de ancestría de los sujetos en los estudios de asociación para seleccionar adecuadamente a los casos y a los controles.

VI.II Estudio de asociación mitocondrial en Cáncer del Cuello Uterino y análisis de la expresión genética de 29 genes mitocondriales en mujeres con cáncer estratificadas por haplogrupos Amerindios.

Materiales Y Métodos.

Muestras.

Un total de 187 pacientes con cáncer invasor diagnosticadas en el Hospital General de México fueron reclutadas. Los casos fueron seleccionados secuencialmente durante el periodo de noviembre del 2003 a abril del 2005 y representan cerca del 80% de los casos incidentes de cáncer cervical diagnosticados en *este periodo debido a los restrictivos criterios de inclusión del estudio (no haber recibido tratamiento previo, ser casos incidentes, nacidos en México y que tengan ancestros mexicanos dos generaciones hacia atrás)*. Entre las 187 tumores cervicales, 86.1% fueron carcinomas de células escamosas, 12.3% adenocarcinomas, 0.5% adenoescamosos y 1.1% no diferenciados. Un total de 270 mujeres fueron seleccionadas y pareadas con los casos por edad (en un intervalo de dos años de la edad de las pacientes con cáncer; intervalo: 24-78 años). Estas mujeres atendieron al programa de detección oportuna de cáncer cervical del Hospital General de México durante el mismo periodo de las mujeres con cáncer. Cuando una mujer con cáncer fue identificada y confirmada, fueron escogidas del programa de detección uno o dos controles pareados por edad con

un Papanicolaou normal. La tasa de participación de los casos y controles fue cercana al 95%. Los casos recibieron una evaluación clínica completa. Se recolectaron biopsias dirigidas por colposcopia en las mujeres con cáncer. Los tejidos fueron fijados en formalina, envueltos en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina para diagnóstico patológico de rutina. Para la detección del VPH, en mujeres sanas y con cáncer, se recolectaron citologías cervicales del endocérnix y ectocérnix y las células fueron suspendida en un vial con buffer de extracción y conservadas a -20°C hasta el análisis. Para analizar el polimorfismo mitocondrial, se recolectaron muestras sanguíneas de casos y controles. El análisis de la expresión genética mitocondrial fue realizada en 45 casos de los cuáles se tomaron dos biopsias. Un total de 17 muestras de epitelio cervical sano fueron utilizadas como control para el análisis de la expresión genética. Estas muestras fueron obtenidas de mujeres a las que se les realizó histerectomía debido a miomatosis uterina en el servicio de ginecología del Hospital General de México. Previo a la histerectomía, en estas mujeres se confirmó que tuviesen un cérnix sano mediante colposcopia y citología. Cada biopsia fue dividida en dos partes equivalentes, un fragmento fue congelado con nitrógeno líquido a -70°C y la otra parte fue utilizada en el diagnóstico patológico. El protocolo y los procedimientos del estudio fueron revisados y aprobados por el comité científico y de ética local del Hospital General de México.

Detección y tipificación del VPH.

Se obtuvo DNA a partir de los exudados cervicales de casos y controles utilizando un kit de purificación de DNA (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La detección del VPH fue llevada a cabo mediante PCR utilizando los oligos universales en el gen L1 del virus, MY09/MY11 y GP5+/6+ descritos previamente. Un fragmento del gen β -globin fue utilizado para evaluar la calidad del DNA. Los tipos virales del VPH fueron identificados secuenciando la banda amplificada en las muestras positivas para VPH utilizando el método de secuenciación por fluorescencia (BigDye Terminator Ready Reaction Kit, Applied Biosystems). El análisis de las secuencias fue hecho con el analizador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Las secuencias de las bandas amplificadas fueron analizadas a través de la herramienta bioinformática FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>)

Extracción de RNA total e hibridación con los microarreglos 1.0 ST de Affymetrix.

El RNA total de cada biopsia fue extraído con Trizol (Gibco-BRL Life Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante y posteriormente fue cuantificado con un espectrofotómetro a 260/280 nm y la calidad del RNA fue determinado por el ratio de las intensidades de las bandas ribosomales 18S/28S en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Del RNA purificado, se sintetizó cDNA e hibridó con el microarreglo Human Gene 1.0 ST que contiene 28, 869 sondas, utilizando el protocolo de la manufactura. La hibridación fue hecha durante 17 horas a 45 °C en un GeneChip® Hybridization Oven 640 (Affymetrix).

Después del lavado y teñido en una estación de fluidos, los cRNAs fueron detectados utilizando un escáner GeneChip 3000. Las imágenes digitalizadas fueron procesadas utilizando el programa GCOS ver 1.4. Solo fueron utilizadas las intensidades normalizadas de 29 genes mitocondriales contenidas en el microarreglo para el análisis.

Análisis de los datos.

Las secuencias de las regiones hipervariables 1 y 2 del DNAmT en cada individuo fueron analizadas y los haplogrupos caracterizados del mismo modo descrito previamente (Guardado et al. 2009). Los riesgos fueron calculados como razón de momios (RM) utilizando una regresión logística incondicional ajustada por edad cuando el VPH fue considerado en el modelo. Las frecuencias de los VPHs en los haplogrupos mitocondriales fueron comparadas con la prueba de χ^2 ajustado por la corrección de Yate ó con la prueba exacta de Fisher. Las diferencias encontradas se consideraron significativas con valores de p menores a 0.05.

Para el análisis de la expresión genética, se seleccionaron únicamente las intensidades normalizadas de 29 sondas que exploran genes mitocondriales, para posteriormente ser comparadas entre los grupos utilizando una prueba de t de student. Las comparaciones fueron realizadas entre casos y controles y entre los haplogrupos mitocondriales junto con los controles con el programa FlexArray (<http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>). Se calculó el fold-change dividiendo la intensidad promedio de cada sonda de todos los casos y los haplogrupos amerindios mitocondriales entre la intensidad media de las sondas del tejido cervical sano usado como control.

Resultados.

Virus del Papiloma Humano y Cáncer Cervical.

El DNA del virus del papiloma humano fue encontrado en 180 de 187 (96.3%) de las muestras de cáncer cervical y en 42 de 270 (15.6%) de las muestras epiteliales de mujeres sanas. En las muestras con cáncer, el VPH16 (46.5%) fue el tipo viral detectado con más frecuencia, seguido del VPH18 (13.4%), VPH45 (8.6%), VPH31 (4.8%), VPH58 (3.7%), VPH59 (3.2%), VPH33 (2.7%), VPH56 (2.7%), VPH52 (2.1%), VPH51 (2.1%), VPH35 (1.1%) Y VPH66 (1.1%; Ver Tabla 5). La frecuencia acumulada de estos 12 tipos virales más comunes en mujeres con cáncer cervical fue de 91.6%. Otros tipos virales, con una frecuencia menor al 1%, fueron encontrados en las muestras tumorales, e incluyen a los tipos 52, 51, 35, 66, 73, 53, 39, 6, 61, 68, 11 y 69, los cuales representan el 10.3% restante de las muestras positivas para el VPH. En las mujeres control, el VPH16 fue también el más frecuente tipo viral encontrado (4.8%) seguido de los tipos virales 31, 58, 53, 18, 56, 66, 6, 61, 71, 45, 68, 29, 32, 70, 90 y 97, todos ellos con una frecuencia menor al 1.5%.

Tabla 5. Riesgo de cáncer cervical asociado con la presencia de los 12 tipos de VPH más comunes y otros encontrados en la muestra.

Tipo viral	Controles % (n) n=270	Casos % (n) n=187	^a RM (IC 95%)	^b p
VPH16	4.8 (13)	46.0 (87)	16.8 (8.9-31.5)	< 0.001
VPH18	0.7 (2)	13.9 (25)	20.0 (4.6-86.0)	< 0.001
VPH45	0.4 (1)	8.6 (16)	23.3 (3.0-178.0)	< 0.001
VPH31	1.1 (3)	4.8 (9)	4.8 (1.2-18.2)	< 0.001
VPH58	1.1 (3)	3.7 (7)	3.8 (0.96-15.0)	< 0.001
VPH59	0.0 (0)	3.2 (6)	-	
VPH33	0.0 (0)	2.7 (5)	-	
VPH56	0.7 (2)	2.7 (5)	3.8 (0.73-20.3)	< 0.001
VPH52	0.0 (0)	2.1 (4)	-	
VPH51	0.4 (1)	2.1 (4)	6.4 (0.71-59.1)	< 0.001
VPH35	0.0 (0)	1.1 (2)	-	
VPH66	0.7 (2)	1.1 (2)	1.7 (0.24-12.7)	< 0.001
^c Otros VPHs	5.5 (15)	4.2 (8)	0.55 (0.37-0.82)	< 0.0001
VPH positivas	15.6 (42)	96.3 (180)	152.9 (65.4-357.5)	< 0.0001
VPH negativas	84.4 (228)	3.7 (7)	1	

^aRM ajustada por edad.

^b valor de p de la regresión logística incondicional .

^c Incluye los VPHs 73, 39,11, 69,68,6,61,53,35,66, 52 y 51 in casos y los VPHs 51, 68, 29, 32, 70, 90, 97, 66, 6, 61, 71 y 53 en controles.

Se calculó un estimado del riesgo para cáncer cervical asociado a la infección por el VPH a través de una regresión logística incondicional como es mostrado en la Tabla 5. La razón de momios (RM) para mujeres positivas para cualquier tipo de VPH fue de 152.9 (95% CI, 65.4-357.5). Para los tipos virales individuales, la RM más alta encontrada fue para el VPH45 (23.3, 95% CI 3.0-178.0), seguido de la RM para el VPH18 (20.0, 95% CI 4.6-86.0) y VPH16 (16.8, 95% CI 8.9-31.5). Sin embargo, el riesgo calculado para los tipos 16 y 18 tuvo un valor de p mucho menor junto con intervalos de confianza más estrechos que los calculados para el VPH45 (Ver Tabla 5). Cabe mencionar que la razón de momios de estos tres virus es mucho más alta que la RM de los otros VPHs menos frecuentes.

El polimorfismo del DNAMt y el cáncer cervical.

Un total de 188 sitios polimórficos fueron identificados en la región hipervariable I y la región hipervariable II incluyendo casos y controles. De estos sitios polimórficos, 98 fueron encontrados en ambos grupos de mujeres, 35 en el grupo de mujeres con cáncer y 55 en mujeres sanas. Estos polimorfismos se encuentran distribuidos en 238 haplotipos distintos, 115 de los cuales fueron encontrados solo en casos y 83 únicamente en controles (Ver Anexo 1). Los haplogrupos mitocondriales fueron identificados utilizando los motivos en la región de control, como fue descrito previamente (Achilli et al. 2008, Guardado e. al 2009). La ancestría amerindia mitocondrial predominó en la muestra total con una frecuencia de 93.9%, seguido por la ancestría europea (4.8%) y africana (1.3%). Las frecuencias de los

haplogrupos amerindios A2, B2, C1 y D1 en la muestra global fueron de 48.1%, 21.2%, 18.2% y 6.3%, respectivamente. El haplotipo más común tuvo una frecuencia de 5.5% y perteneció al haplogrupo A2 (Anexo 1). Los haplogrupos europeos identificados fueron los H, I, J, K, T, U y V, mientras que los africanos incluyeron a los haplogrupos L1 y L3. La frecuencia de los haplogrupos mitocondriales en mujeres sanas y con cáncer cervical es mostrada en la Tabla 6. La frecuencia del haplogrupo A2 fue mayor en las mujeres sanas que en las pacientes con cáncer (51.1% vs. 43.3%), mientras lo opuesto fue encontrado para el haplogrupo B2 (17.8% in controles vs. 26.2% in casos). Sin embargo, solo la diferencia del haplogrupo B2 fue estadísticamente significativo ($p = 0.04$, χ^2) y la RM fue de 1.64 (95% CI 1.04-2.57), sugiriendo que este haplogrupo incrementa el riesgo para cáncer cervical. Ha sido previamente reportado que la frecuencia de los haplogrupos amerindios pudiera variar a lo largo de las regiones geográficas de acuerdo con la historia del mestizaje. Sin embargo, la frecuencia del haplogrupo B2 no cambió significativamente entre los grupos de casos y controles, cuando estos fueron estratificados por la región geográfica de origen.

Tabla 6. El riesgo de cáncer cervical de acuerdo a los haplogrupos del DNAMt.

Haplogrupo	Controles % (n) n=270	Casos % (n) n=187	p ^a	RM 95% IC ^b
A2	51.1 (138)	43.3 (81)	0.101	0.73 (0.50-1.06)
B2	17.8 (48)	26.2 (49)	0.040	1.64 (1.05-2.58)
C1	18.5 (50)	18.2 (34)	0.927	0.98 (0.60-1.58)
D1	5.9 (16)	7.0 (13)	0.658	1.19 (0.56-2.53)
Europeos	5.9 (16)	3.2 (6)	0.182	0.53 (0.20-1.37)
Africanos	0.7 (2)	2.1 (4)	0.232	2.93 (0.53-16.16)

^a χ^2 corregido para continuidad

^b RM calculada por regresión logística univariada.

Existen alelos específicos en diez posiciones polimórficas en la RHV1 que definen a los haplogrupos mitocondriales amerindios. Por lo tanto, la distribución alélica de estas posiciones individuales se compararon entre casos y controles (Ver tabla 7). La distribución de los alelos fue estadísticamente diferente entre los grupos en tres posiciones (16362, 16183 y 16189; Ver Tabla 7). El polimorfismo 16362C, el cual es presente principalmente en el haplogrupo A2, tuvo una mayor frecuencia en los controles que en el grupo de cáncer (60.0% vs. 48.7%; $p=0.02$, χ^2) y tuvo una RM = 0.63 (95% CI 0.43- 0.92). Por lo cual, este pudiera considerarse como una alelo protector para cáncer cervical. Por el contrario, los alelos 16183C y 16189C, presentes principalmente en el haplogrupo B2, fueron más frecuentes en mujeres con cáncer cervical que en los controles (26.7% vs. 18.5%, $p=0.04$ and 31% vs. 20.7%, $p=0.01$, respectivamente, χ^2 ; Ver Tabla 7) y tuvieron una RM de 1.61 (95% CI 1.03- 2.51) y 1.72 (95% CI 1.12 -2.63), respectivamente. Estos alelos pudieran considerarse como alelos de riesgo para el desarrollo de cáncer

Tabla 7. Riesgo de cáncer cervical asociado a los sitios polimórficos más comunes de la RHV1 presentes en los haplogrupos mitocondriales.

Polimorfismo ^a	Controles % (n)	Casos % (n)	p ^b	RM CI (95%) ^c
16111T	43.7 (118)	34.2 (64)	0.05	0.67 (0.45 -0.99)
16111C	56.3 (152)	65.2(122)		Referencia
16290T	50.7 (137)	43.3 (81)	0.14	0.74 (0.51-1.08)
16290C	49.3 (133)	56.7 (106)		Referencia
16319A	51.5 (139)	46.0 (86)	0.28	0.80 (0.55-1.17)
16319G	48.5 (131)	54.0 (101)		Referencia
16362C	60.0 (162)	48.7 (91)	0.02	0.63 (0.43- 0.92)
16362T	40.0 (108)	51.3 (96)		Referencia
16182C	9.6 (26)	15.0 (28)	0.11	1.65 (0.93-2.92)
16182A	90.4 (244)	85.0 (159)		Referencia
16183C	18.5 (50)	26.7 (50)	0.04	1.61 (1.03- 2.51)
16183A	81.5 (220)	73.3 (137)		Referencia
16189C	20.7 (56)	31.0 (58)	0.01	1.72 (1.12 -2.63)
16189T	79.3 (214)	69.0 (129)		Referencia
16217C	18.1 (49)	25.7 (48)	0.07	1.56 (0.99-2.45)
16217T	81.9 (221)	74.3 (139)		Referencia
16327T	18.5 (50)	17.6 (33)	0.96	0.95 (0.58-1.54)
16327C	81.5 (220)	81.8 (153)		Referencia
16325C	26.3 (71)	25.7 (48)	0.90	0.97 (0.63-1.48)
16325T	73.7 (199)	74.3 (139)		Referencia

^a Polimorfismos respecto a la rCSR son mostrados en negritas y el haplogrupo mitocondrial asociado está en el anexo 2.

^b Valor de p corregido para continuidad de la prueba de χ^2 .

^c RM calculada con la regresión logística incondicional.

Interacción de la infección por VPH con los polimorfismos mitocondriales en el riesgo para cáncer cervical.

Para identificar si la distribución de los tipos virales del VPH está relacionada con la ancestría mitocondrial, las frecuencias de los VPHs 16, 18, 45 y 31 y otros VPHs fueron comparadas entre los cuatro haplogrupos Amerindios en casos y controles. Interesantemente, en los pacientes con cáncer la distribución de los tipos virales fue similar en todos los haplogrupos excepto en uno (D1), en el cual se observa de manera notoria la ausencia del VPH18, una muy baja frecuencia del VPH16 y una elevada frecuencia de los VPH 45, 31 y otros tipos ($p < 0.01$, prueba de Fisher; Ver Figure 7A). En los controles, el haplogrupo D1 mostró una elevada positividad para los VPHs, haciendo notar que, fue dos veces más que la positividad para toda la muestra de control (31.3% vs 15.6%; $p > 0.01$, prueba de Fisher). Este incremento fue principalmente debido al incremento del VPH18 y otros tipos virales (Ver Figura 7B). Para evaluar si la ancestría mitocondrial potencia o atenúa el riesgo para cáncer cervical de la infección por VPH, se realizó un análisis estratificado por los haplogrupos mitocondriales Amerindios. Como era esperado, el riesgo para cáncer cervical conferido únicamente por la infección por VPH (OR=152.9, 95% CI = 65.4-357.5; Tabla 8) incrementó en mujeres con el haplogrupo B2 (OR = 208, 95% CI = 25.2-1713.5; $p < 0.01$, regresión logística incondicional bi-variada). Este incremento fue mayor, cerca del 50% en mujeres con los polimorfismos ligados al haplogrupo B2 (16183C y 16189C; Tabla 8). Por el contrario, el riesgo para cáncer cervical dado por la infección por VPH disminuyó aproximadamente más de 6 veces en mujeres con el haplogrupo D1,

principalmente por el incremento en la frecuencia de la infección por VPH en el grupo control hasta 31.3%. (Ver Figura 7). El riesgo para cáncer cervical conferido por la infección por VPH no fue influenciado por la presencia de los haplogrupos A2 o C1 (Ver Tabla 8). Por otra parte, en el haplogrupo A2 incrementó la RM (hasta 28.7), mientras que en el haplogrupo B2, así como en los alelos ligados al mismo (16183C y 16189C) disminuyó la razón de momios (10.1) en mujeres infectadas por VPH16, en comparación con la RM calculada para toda la muestra (Ver Tabla 8).

Tabla 8. Riesgo para cáncer cervical atribuido a los virus del papiloma humano en las mujeres con los haplogrupos mitocondriales amerindios y polimorfismos mitocondriales.

DNAmt	^a RM (CI 95%)		
	VPH positivo	VPH 16	Tipos 16, 18, 45, 31
Haplogrupo			
A2	156 (44.9-541.8)*	28.7 (10.6-77.8)*	57.3 (22.9-143.1)*
B2	208 (25.1-1735)*	10.1 (3.1-32.9)*	21.1 (7.1-62.6)*
C1	151.6 (26.0-882.4)*	20.0 (4.1-96.9)*	143.3 (15.1-1359.2)*
D1	-	3.2 (0.1-64.6)	7.2 (0.96-55.3)
Polimorfismo			
16362C	144 (46.17-452.9)*	19.8 (8.3-47.4)*	48.3 (21.1-110.3) *
16183C	222.9 (26.9-1843.2)*	10.3 (3.2-33.1)*	20.7 (7.0-60.4) *
16189C	295.6(36-24*	12.5 (3.9-39.4)*	28.5 (9.9-82.1) *

^a RM calculada para las mujeres de los haplogrupos mitocondriales Amerindios y sus polimorfismos individuales principales ajustado por infección de VPH y edad de las mujeres. - Infinito. * Muestra los RM con valor de p menor a 0.05.

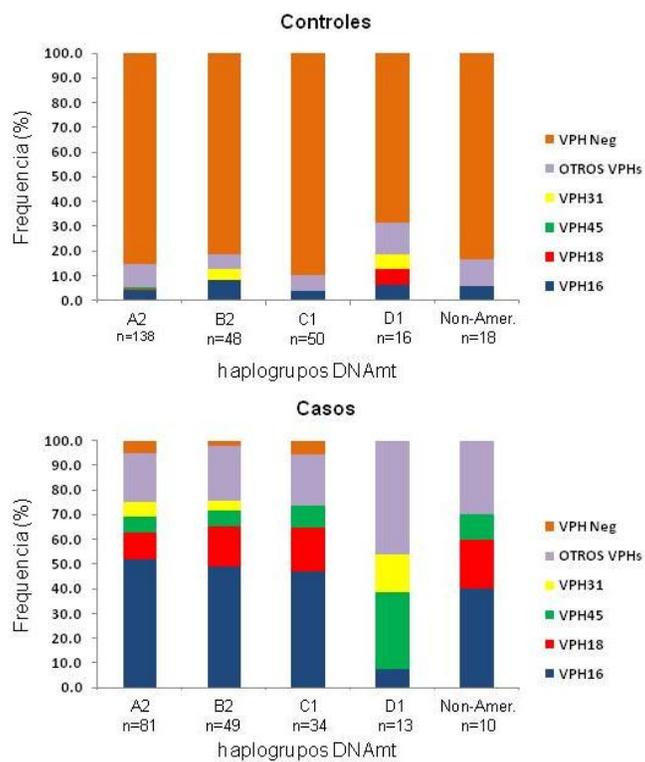


Figura 7. Distribución de los tipos virales 16, 18, 45 y 31 y otros VPHs entre los haplogrupos amerindios en mujeres con cáncer cervical y controles sanos.

Análisis de la expresión genética del DNA mitocondrial.

Si un polimorfismo confiere un riesgo elevado para la enfermedad, pudiera ser esperado un cambio en la expresión de los genes ligados al mismo. Por lo tanto, se investigó si los niveles de expresión de algunos genes mitocondriales cambiaron en las muestras tumorales del haplogrupo B2 comparado con el epitelio cervical sano y con tumores con otros haplogrupos Amerindios. Un total de 29 genes mitocondriales fueron analizados para el cambio en la expresión genética comparando un subgrupo de 45 tumores cervicales positivos para el VPH16 contra 17 epitelios cervicales sanos, como fue descrito previamente en materiales y métodos. Un total de siete genes (tRNA gly, tRNA his, tRNA leu2, tRNA cys, tRNA tyr, tRNA asn and tRNA ala) fueron encontrados sobre-expresados en todas las muestras tumorales comparado con las muestras control ($p < 0.05$, t de student; Ver tabla 9). Interesantemente, cuando el análisis fue realizado por los haplogrupos individuales, ninguno de ellos permaneció sobre-expresado en algún haplogrupo. En cambio, tres nuevos genes fueron encontrados sobre-expresados, dos solo en tumores del haplogrupo B2 (tRNA asp, tRNA lysine; Tabla 9 y Figura 8) y uno (tRNA ser1; Tabla 9) en los tumores del haplogrupo C1 ($p < 0.05$, t de student). Comparando solo los tumores, la expresión genética media de los genes tRNA Asp y tRNA lys fue también significativamente alta en el haplogrupo B2 comparado con el haplogrupo A2 ($p < 0.05$, t de student; Figura 8). Cabe mencionar que estos dos genes pertenecen al mismo transcrito del DNAm (transcrito 16 en la cadena H; Figura 9).

Tabla 9. Comparación de la expresión genética de los genes mitocondriales en los tumores

DNAmt gen	Fold Change ^a				
	DNAmt haplogrupos				Tumores n=45
	A2 n=22	B2 n=9	C1 n=10	D1 n=4	
H-strand					
rRNA 12S	0.9	1.0	0.9	0.8	0.9
tRNA val	1.1	1.3	1.2	1.5	1.2
rRNA 16S	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
ND1	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1
tRNA met	1.1	1.4	1.2	1.4	1.2
ND2	1.0	1.3	1.0	0.8	1.0
CO I	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
tRNA asp	1.0	2.1*	1.3	1.1	1.3
CO II	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1
tRNA lys	1.2	1.8*	1.3	1.3	1.3
CO III/ATPase 8	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1
tRNA gly	1.5	2.4	2.1	1.0	1.8*
ND3	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
ND4	0.9	1.1	1.1	1.1	1.0
tRNA his	1.6	1.5	1.7	1.3	1.5**
tRNA ser2	1.1	1.1	1.3	1.2	1.2
tRNA leu2	1.5	2.0	1.8	0.9	1.6*
ND5	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
Cyt b	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0
tRNA thr	1.3	1.7	1.0	0.9	1.3
L-strand					
tRNA phe	0.9	1.1	0.9	1.1	1.0
tRNA pro	1.3	1.4	1.2	1.2	1.3
tRNA glu	1.3	1.4	1.2	1.3	1.3
ND6	1.2	1.3	1.3	1.5	1.3
tRNA ser1	1.4	1.3	1.6*	1.2	1.4
tRNA cys, tRNA tyr	1.6	1.6	1.8	1.2	1.6*
tRNA asn	1.5	1.6	1.8	1.3	1.6**
tRNA ala	1.5	1.4	1.6	1.3	1.5**
tRNA gln	1.5	2.4	2.1	1.0	1.8

cervicales entre los haplogrupos Amerindios.

^a Fold Change: promedio de la intensidad de las sondas de los casos dividido entre la intensidad promedio de los controles (n=17).

* Valor de p menor a 0.05, ** valor de p menor a 0.01, ambos calculados con la prueba t de student.

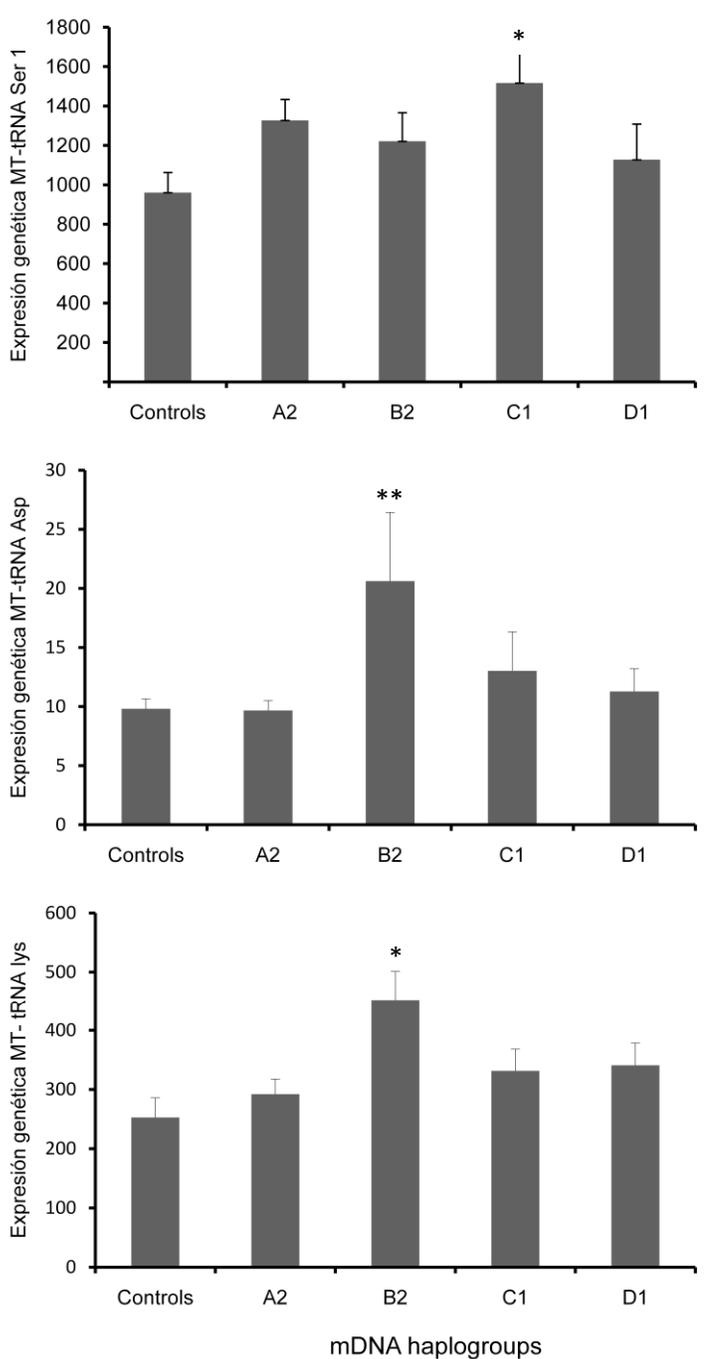


Figura 8. Expresión genética de los genes mitocondriales. Los genes tRNAs con un valor significativo de p en el análisis de la expresión genética de los tumores de mujeres con cáncer cervical con distintos haplogrupos mitocondriales en comparación con tejido no tumoral sano. (A) MT-tRNA ser1. (B) MT-tRNA ácido aspártico y (C) MT-tRNA lisina. Las barras verticales muestran la media de la intensidad de la prueba de cada gene +/- una desviación estándar. (*) Muestra un valor de $p < 0.05$ comparando B2 ó C1 vs. Controles. (**) B2 vs. controles y B2 vs. A2.

b.

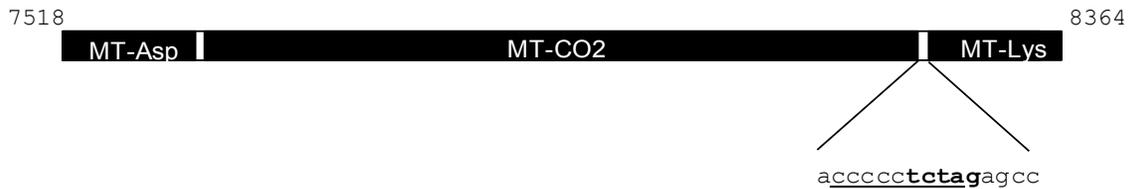


Figura 9. Representación esquemática de los genes que rodean la pérdida intergénica de 9pb COII-tRNA^{Lys} en el haplogrupo B2. La región codificante muestra los genes tRNA-Asp, COII y tRNA-Lys. La secuencia intergénica entre COII y tRNA-Lys es mostrada y los nueve nucleótidos que son perdidos en el haplogrupo B2 están subrayados.

Discusión.

El virus del papiloma humano es considerado hasta ahora, el factor causal para el desarrollo de cáncer cervical, aunque se ha incrementado la incidencia de que factores genéticos contribuyen a la enfermedad. En el presente estudio encontramos una asociación entre los haplogrupos mitocondriales Amerindios y sus polimorfismos de línea germinal con el cáncer cervical. También encontramos diferencias en la expresión genética de los genes mitocondriales en los tumores de un subgrupo de pacientes con cáncer al estratificarlos por los haplogrupos amerindios mitocondriales. En nuestra muestra, la ancestría amerindia predominó tanto en mujeres sanas como con cáncer cervical, lo cual era esperado debido a la historia del mestizaje de la población mestiza mexicana (Lisker 1981). Sin embargo, el haplogrupo B2 fue sobre-representado en mujeres con cáncer cervical

mientras que el haplogrupo A2 fue el más frecuente en las mujeres sanas. Aunque nuestro grupo de estudio tuvo casi la misma proporción de ancestría amerindia materna, se ha reportado que la frecuencia del haplogrupo B2 pudiera variar a lo largo de las regiones geográficas de México. Esta diferencia probablemente es debida a las diferentes densidades demográficas de las comunidades indígenas establecidas en estas áreas (Guardado et al. 2009). Sin embargo, cuando las comparaciones de los haplogrupos mitocondriales amerindios entre los casos y controles fueron estratificadas por el lugar de origen de los individuos, no se encontraron diferencias significativas. Por lo tanto podemos descartar un sesgo en la selección de nuestras muestras debido a una sub-estructura en la población que pudiera dar falsas asociaciones. Para nuestro conocimiento, aunque se han hecho varios estudios de asociación mitocondrial en diferentes tipos de cáncer, los datos que se conocen de la asociación de los polimorfismos de línea germinal con el cáncer cervical son prácticamente nulos.

Como se ha mencionado, se sabe que los haplogrupos mitocondriales divergen en tres ramas mayores: el macrohaplogrupo africano L y los macrohaplogrupos euroasiáticos M y N. Bajo esta clasificación, los haplogrupos amerindios B2 y A2 pertenecen al Macrohaplogrupo N junto con los haplogrupos caucasoides H, J, K, T, W, I, V y U (Achilli et al. 2008, Maca-Meyer et al. 2001). Por el contrario, el Macrohaplogrupo M contienen lo haplogrupos amerindios C1 y D1 juntos con los haplogrupos M y G (Maca-Meyer et al. 2001). Nuestra asociación encontrada del haplogrupo B2 con cáncer cervical en la población mestizo mexicana en conjunto con previos estudios de asociación mitocondrial realizados en otros tumores

sugiere que, el riesgo conferido por el polimorfismo mitocondrial es población y tumor específico (Bayona-Bafaluy et al. 2010). Por ejemplo, en una población de China, el haplogrupo D4a ha sido asociado a un riesgo incrementado de cáncer de tiroides con una RM de 3 (95% CI, 1.09-8.29) y por el contrario, el haplogrupo D5 aumentó el riesgo para cáncer de mama con una RM de 3.11 (95% CI, 1.07-9.06) (Fang et al. 2010). El haplogrupo europeo U, fue encontrado asociado con un riesgo elevado para cáncer de próstata (RM: 1.95) y cáncer renal (RM: 2.52) en población caucásica norteamericana (Booker et al. 2006). Además, en poblaciones europeas los haplogrupos I, H y el super-haplogrupo UK fueron asociados a un incremento en el riesgo para carcinoma de mama, colon y vulva, respectivamente. Sin embargo, también en esta población, no hubo asociación del haplogrupo U con cáncer de próstata (Bayona-Bafaluy et al. 2010, Klemba et al. 2010).

Por otra parte, el haplogrupo A2 fue más frecuente en nuestro grupo de mujeres control, aunque esta diferencia no alcanzó un nivel de significancia estadística. En poblaciones europeas caucásicas, el haplogrupo H fue asociado a un riesgo reducido para cáncer endometrial, y de antemano se conoce que este haplogrupo es el más frecuente encontrado en poblaciones europeas (Czarnecka et al. 2009). Es importante señalar, que el haplogrupo A2 fue el haplogrupo mitocondrial más frecuente en nuestras muestras como ha sido previamente reportado en otras poblaciones de Latinoamérica (Salas et al. 2008, Barbosa et al. 2008).

Una posible explicación para el agrupamiento geográfico del riesgo y protección conferida por el polimorfismo del DNAm^t es que los haplogrupos individuales tienen diferentes respuestas a la exposición del medio ambiente. Desde la

divergencia y dispersión del hombre moderno desde África, se han originado polimorfismos mitocondriales que han separado los Macrohaplogrupos M y N (Achilli et al. 2008). El conocimiento de los efectos fenotípicos en los haplogrupos mitocondriales de estos polimorfismos se han relacionado con la dinámica de la mitocondria, consumo de oxígeno, producción de especies reactivas de oxígeno y balance en el pH de la matriz mitocondrial (Pello et al. 2008, Martínez-Redondo et al. 2010). Probablemente los polimorfismos del DNAm se han originado como un mecanismo de adaptación de los seres humanos para superar al medio ambiente a lo largo de la historia, con la posibilidad de que las células tumorales pudieran tomar ventaja de ellos para el desarrollo de cáncer.

Cuando comparamos en ambos grupos, los alelos más frecuentes encontrados en los haplogrupos Amerindios, los polimorfismos relacionados con los haplogrupos A2 y B2 fueron asociados a cáncer cervical. Encontramos que los alelos 16183C y 16189C fueron asociados a un riesgo incrementado para cáncer cervical. Interesantemente, en un reporte previo que exploró el polimorfismo de línea germinal en la posición 16189 en pacientes con tumores ginecológicos, encontraron que el alelo 16189C aumentó el riesgo para cáncer en una población de China (Liu et al. 2003). Aunque en el mismo estudio no encontraron asociación de este polimorfismo con cáncer cervical; el alelo 16189C fue más frecuente en mujeres con cáncer que en el grupo control. Notablemente, la posición 16189 ha sido reportada como una inestabilidad de micro satélite, al tener la transición C>T en tumores comparados con tejido normal (Liu et al. 2003, Wang et al. 2005). Por otra parte, aunque el polimorfismo T16189C de línea germinal es casi

representativo del haplogrupo B2, también puede ser encontrado en otros haplogrupos debido a una mutación reversa (Achilli et al. 2008). Cuando ocurre una transición en la posición 16189, un largo tracto de citosinas es creado y este invento pudiera estar involucrado en una inestabilidad genómica mitocondrial (Wang et al. 2005). Más aún, dentro de las posiciones 16184-16193, están localizados los elementos cis conocidos como TASs (del inglés, 3'-end of a termination associated sequence) y el sitio de unión a DNA 7S los cuales son elementos importantes para la replicación (Fernández-Silva et al. 2003). Los polimorfismos 16183C no han sido previamente asociados a otros tumores y el efecto pudiera ser el mismo que con el alelo 16189C, ya que esta posición es también asociada al haplogrupo B2 y está en el mismo micro satélite. El alelo 16362C fue encontrado como protector para cáncer cervical y lo encontramos principalmente en el haplogrupo A2.

Inesperadamente, encontramos una diferente distribución de los VPHs en las mujeres con cáncer cervical del haplogrupo D1, en las cuales los VPHs 45 y 31 predominaron en vez del VPH16 y VPH18. Por otra parte, en mujeres sanas con el haplogrupo mitocondrial D1, la positividad del VPH fue mucho mayor. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la predisposición a la infección por VPH es diferente entre los haplogrupos Amerindios. Se ha reportado que la frecuencia del VPH 16 y 18 en mujeres con cáncer cervical es muy similar a lo largo de todo el mundo (Muñoz et al. 2003). Sin embargo, existen estudios que indican que la prevalencia de los siguientes tipos virales más comunes en cáncer cervical presentan una distribución geográfica diferente (Clifford et al. 2006, Smith et al.

2007). Por ejemplo, la prevalencia del VPH58 es más alta entre las poblaciones asiáticas; la distribución de las variantes del VPH33 es diferente entre las mujeres de Canadá y Brasil, y la variante del VPH16 subclase c es mucho más frecuente en México que en otras regiones geográficas (Muñoz et al. 2003, Smith et al. 2007, Berumen et al. 2001). Las diferencias en la prevalencia de estos VPHs pudiera deberse por el antecedente genético de estas poblaciones y el polimorfismo del DNA mitocondrial pudiera utilizarse para aclarar estas diferencias. Sería importante tomar en cuenta aquellos grupos de mujeres con susceptibilidad a algunos VPHs que no se encuentran cubiertos por las vacunas preventivas actualmente disponibles, para establecer un seguimiento mucho más estrecho de esos grupos.

Nuestros resultados en conjunto con otros estudios irán aclarando gradualmente la importancia de los antecedentes genéticos en el desarrollo del cáncer cervical y en la infección por el VPH (Wang et al. 2003, Wang et al. 2010). Interesantemente, observamos que el riesgo para cáncer cervical fue potenciado en las mujeres con el haplogrupo B2 infectadas por el VPH. Nuestros datos sugieren que aunque el virus del papiloma humano es el factor principal para el desarrollo del cáncer, las variedades genéticas del DNAm^t pueden modular el riesgo para la enfermedad. Aunque los resultados presentados en este trabajo, no excluyen la influencia de algunos genes nucleares involucrados en la enfermedad, estudios previos sugieren una interacción entre la mitocondrial y el virus del papiloma humano. Se ha encontrado que la proteína E1^{E4} del VPH se une a la membrana mitocondrial para inducir apoptosis y completar el ciclo viral (Raj et al. 2004). Por otra parte,

existe evidencia de que la oncoproteína E7 del VPH puede proteger a los queratinocitos HaCat del daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno (Shim et al. 2008). Aunque los conocimientos de la mitocondria y su contribución para el cáncer se han incrementado, estudios futuros aclararán el rol de ella en la infección por VPH y en el cáncer cervical.

Uno de los problemas frecuentemente encontrados con los estudios de asociación, es la dificultad para replicar los resultados. Los polimorfismos en cáncer pueden tener un modo de heredabilidad de tipo recesivo o dominante, el cual depende de la pérdida o ganancia de función respectivamente (Fletcher et al. 2010). Se ha propuesto que los polimorfismos pudieran mimetizar las mutaciones somáticas originadas en el tumor, haciendo susceptible al individuo después de una serie de pasos mutacionales (Fletcher et al. 2010, Bayona-Bafaluy et al. 2010). Adicionalmente, se ha visto que el 72% de las mutaciones mitocondriales reportadas como tumor-específicas son variedades genéticas encontradas en las poblaciones humanas (Brandon et al. 2006). En este trabajo proponemos que si la ancestría del haplogrupo B2 está asociada al cáncer cervical, un cambio en la expresión genética mitocondrial pudiera ser observada en la célula tumoral con este haplogrupo. Primero, encontramos diferencias en la expresión genética mitocondrial al comparar las muestras sin tomar en cuenta el haplogrupo mitocondrial con tejido cervical sano. Es importante señalar que, en esta comparación, todos los genes diferencialmente expresados fueron sobre-expresados y todos excepto un gen fueron tRNAs. Segundo, los tumores con el haplogrupo B2 mostraron diferencias fenotípicas en la expresión genética de tres

tRNAs. El MT-tRNA-asp fue exclusivamente encontrado en los tumores del haplogrupo B2 y fue sobre-regulado en conjunto con el MT-tRNA-lys, el cual pertenece al mismo transcrito. Tercero, recapitulando la relación polimorfismo-fenotipo del DNAm, estos dos tRNA flanquean la sub-unidad II de la citocromo C oxidasa (COII) la cuál contiene la pérdida de 9 pares de bases característica del haplogrupo B2 (Kivisild et al. 2003).

Los tRNAs son muy importantes para síntesis de las proteínas de la fosforilación oxidativa y las mutaciones en estos RNAs tienen serias consecuencias en la cadena respiratoria (Boulet et al. 2010). Un alto nivel de expresión de los tRNAs tanto nucleares como mitocondriales se ha encontrado en cáncer de mama y líneas celulares derivadas de este carcinoma (Pavon-Eternod et al. 2009). La elevada tasa en la síntesis de tRNAs pudiera ser un proceso regulatorio para satisfacer las altas demandas traduccionales de los tumores en crecimiento. En este trabajo encontramos la sobre-expresión del MT-tRNA-leu2 en las muestras tumorales y se ha reportado que este tRNA es uno de los más utilizados para la síntesis de proteínas mitocondriales. (Swire et al. 2005). Sin embargo, también es sabido que en las células tumorales, las mutaciones somáticas ocurren en el DNAm con la consecuente disrupción en la síntesis de las proteínas de la cadena respiratoria y un incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (Singh KK et al. 2009, Solaini et al. 2005). Además, las células tumorales deben enfrentar condiciones de hipoxia/normoxia durante el crecimiento tumoral y aquellas células que sobreviven bajo estas circunstancias tienen una ventaja selectiva (Solaini et al. 2010). Por otra parte, se ha encontrado una sobre-

regulación de los tRNAs mitocondriales después de periodos de hipoxia en cardiomiocitos de ratón (Jian et al. 2010). Finalmente, una sobre expresión de los tRNAs en cáncer pudiera ser utilizado como un mecanismo de la célula para prevenir la apoptosis inactivando la vía intrínseca por la célula tumoral (Mei et al. 2010). La realización de más estudios funcionales in vitro ayudará a dilucidar los mecanismos relacionados con el haplogrupo B2 y la predisposición a cáncer.

Podemos concluir que existe una relación entre los polimorfismos mitocondriales de línea germinal y el cáncer cervical en mujeres infectadas con el VPH. El análisis de los polimorfismos mitocondriales pudiera ser útil para identificar la proporción de individuos que están sujetos a ser infectados con los VPHs oncogénicos menos comunes. También, existe una asociación entre la ancestría mitocondrial Amerindia del haplogrupo B2 y el fenotipo de la expresión genética mitocondrial en las células tumorales con este haplogrupo. Aunque el DNAmT es solo uno de los varios loci que podrían estar implicados en el riesgo para cáncer cervical, estudios funcionales proveerán estimados biológicos del efecto de estos polimorfismos con el medio ambiente en el proceso de la carcinogénesis.

Conclusiones:

Los resultados de la última parte de este trabajo indican que existe una asociación entre la ancestría Amerindia y el riesgo para desarrollar cáncer cervical. Cabe mencionar que el riesgo conferido por el haplogrupo B2 es leve, lo cual es similar a lo reportado en otros estudios de asociación en cáncer cervical analizando otros genes candidato. El DNA mitocondrial pudiera considerarse como un loci candidato involucrado en el riesgo de cáncer cervical. Es probable que existan polimorfismos en otros genes nucleares no conocidos que actúen en conjunto con los genes mitocondriales para conferir la susceptibilidad o protección para desarrollar cáncer cervical. Los resultados arrojados por el presente estudio, incrementarán el acervo de los genes de riesgo para cáncer cervical en población mexicana. Estudios futuros en un tamaño de muestra mayor y en otras poblaciones ayudarán a dilucidar la asociación entre la infección por el virus del papiloma humano y la ancestría mitocondrial, especialmente con aquellos virus poco frecuentes no cubiertos por las vacunas preventivas actualmente disponibles. Nuestros datos indican que existen diferencias fenotípicas del haplogrupo B2 en el cáncer cervical debido a la sobre expresión de los genes mitocondriales tRNA lys y tRNA asp, por lo que futuros estudios funcionales permitirán esclarecer los mecanismos involucrados entre el VPH, la mitocondria y el desarrollo del cáncer.

VI. PERSPECTIVAS.

Como ya se ha mencionado en este trabajo, el cáncer cervical se mantiene entre las primeras causas de muerte por cáncer en mujeres. Poco se conoce de los factores genéticos que pudieran estar involucrados en el desarrollo del cáncer cervical. La identificación de variantes genéticas que confieran riesgo o susceptibilidad para desarrollar cáncer, permitirá en un futuro poder definir mejor las interacciones entre el genoma del individuo, el medio ambiente y la enfermedad. Al realizar este tipo de estudios en población mestiza, se tiene que tomar ciertas consideraciones para evitar asociaciones espurias. Conocer los patrones de ancestría e historia del mestizaje en las distintas regiones de México permitirán diseñar mejor estos estudios. Finalmente, los resultados en el presente trabajo requerirán de replicarlos en un tamaño de muestra mayor y en otras poblaciones con ancestría Amerindia. Esto continúa siendo considerado como el talón de Aquiles en los estudios de asociación, ya que gran parte de los resultados obtenidos al replicar estos estudios suelen ser inconsistentes. Es por ello que la caracterización funcional de estos polimorfismos en los genes y los genes relacionados pudieran considerarse como una opción para solventar estos problemas. Finalmente, aunque los resultados de este tipo de estudios suelen ser modestos, al conocer el mayor número de genes servirá para estudiar la interacción entre estos genes para el riesgo de desarrollar la enfermedad.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- INEGI. XIII General de Población y Vivienda. Available at <http://www.censo2010.org.mx/> 2010.
- Gorodezky C, C, Vázquez-García M, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Pérez-Luque E, Muñoz L. The Genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol* 2001; 62: 979-91.
- Achilli A, UA, Bravi CM, Coble MD, Kong Q-P, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt H-Jr. The Phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies. *PLoS ONE* 2008; 3: e1764.
- Akouchekian M, M, Akbari MH, Kamalidehghan B, Dehghan M. Analysis of mitochondrial ND1 gene in human colorectal cancer. *J Res Med Sci.* 2011; 16: 50-5.
- Allard MW, D, Wilson MR, Monson KL, Budowle B. Evaluation of Variation in Control Region Sequences for Hispanic Individuals in the SWGDAM mtDNA Data Set. *J Forensic Sci* 2006; 51: 566-73.
- Allegra E, Garozzo A, Lombardo N, De Clemente M, Carey TE. Mutations and polymorphisms in mitochondrial DNA in head and neck cancer cell lines. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2006; 26:185-90.

- Alvarez JC, LEJ, Jose AL, Esther M-e, Luis JM-G, Marc A, Mark RW, Bruce B. Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic mtDNA data set. *Legal Med (Tokyo, Japan)* 2007; 9: 293-304.
- Anderson S, AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981 290:457-65.
- Andrews R, I, Chinnery P, Lightowlers R, Turnbull D, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999; 23:147.
- Arredondo A, P, Leyva R. Atención médica ambulatoria en México: el costo para los usuarios. *Salud Pública Méx* 1999; 41:18-26.
- Bandelt HJ, P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 37 - 48.
- Bandelt H-J, C, Yao Y, Kong Q, Kivisild T, Rengo C, Scozzari R, Richards M, Villems R, Macaulay V, Howell N, Torroni A, et al. Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 512-24.
- Barbosa A, L, Dalmo dS, Valdir A, Luiz B. Mitochondrial DNA Control Region Polymorphism in the Population of Alagoas State, North-Eastern Brazil. *J Forensic Sci* 2008; 53: 142-6.

- Bayona-Bafaluy MP, E, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Maternally inherited susceptibility to cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010 - Bioenergetics; In Press.
- Beltran A. Slave Trade in Mexico. *Hispanic Am. Hist. Rev.* 1944; 24: 412-31.
- Benitez, A. *Mestizo*, (Fondo de Cultura Económica, México, 2002).
- Berumen J, RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study. *J Nat Cancer Inst* 2001; 93: 1325-30.
- Beskow, AH., AM.,y Gyllensten., UB. HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ. *Int J Cancer*; 2001. 93: 817-22.
- Bonilla C, G, Parra E, Kline C, Shriver M. Admixture analysis of a rural population of the state of Guerrero, Mexico. *Am J Phys Anthropol* 2005; 128: 861-9.
- Booker LM, GM, Jessie BC, Sun QC, Baumann AK, Amin M, Lim SD, Fernandez-Golarz C, Lyles RH, Brown MD, Marshall FF, Petros JA. North American White Mitochondrial Haplogroups in Prostate and Renal Cancer. *J Urol* 2006; 175: 468-73.
- Boulet L, G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet.* 1992; 51:1187-200.
- Brandon M, P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006; 25: 4647-62.

- Brown W. in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 3605-9.
- Burk RD, Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 2009; 12: 281-90.
- Cann RL Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987; 325: 31-6.
- Castellsagué X. history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: S4-S7.
- Catarino, R., A., Pinto, D., Pereira, D., Craveiro, R., Vasconcelos, A., Lopes, C. y Medeiros, R. Increased risk of cervical cancer associated with cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 160: 49-54
- Cavalli-Sforza LL, MW. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nat Genet*. 2003 Mar; 33 Suppl: 266-75.
- Clement M, D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 2000; 9: 1657-9.
- Clifford GM, RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human Papillomavirus Genotype Distribution in Low-Grade Cervical Lesions: Comparison by Geographic Region and with Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1157-64.
- Clifford G, S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006; 24: S26-S34.

- Crespillo M, JA, Paredes M, Fernández R, Ramírez E, Valverde JL. Mitochondrial DNA sequences for 118 individuals from northeastern Spain. *Int J Legal Med* 2000; 114: 130-2.
- Czarnecka A, A, Semczuk A, Plak K, Marzec B, Krawczyk T, Kofler B, Golik P, Bartnik E. Common mitochondrial polymorphisms as risk factor for endometrial cancer. *Int Arch Med* 2009; 2: 33.
- Datta S, M, Biswas NK, Sikdar N, Roy B. Increased risk of oral cancer in relation to common Indian mitochondrial polymorphisms and Autosomal GSTP1 locus. *Cancer* 2007; 110: 1991-9.
- de Villiers Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, H. zH. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
- Doorbar J. papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32:7-15.
- Duarte I, A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, Pereira D, Moutinho J, Canedo P, Machado JC, y Medeiros R. G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334: 588-92.
- Easton RD, DA, Crews DE, Ferrell RE. mtDNA Variation in the Yanomami: Evidence for Additional New World Founding Lineages. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 213-25.
- Engelmark, M., A., Magnusson, J., Erlich, H. y Gyllensten, U. Affected sib-pair analysis of the contribution of HLA class I and class II loci to development of cervical cancer. *Hum Mol Genet* 2004; 13, 1951-1958.

- Excoffier V, L, Schneider S. Arlequin ver 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; 1: 47-50.
- Fang H, L, Chen T, He J, Ding Z, Wei J, Qu J, Chen G, Lu J, Bai Y. Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 421.
- Fehrmann F, LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; 22: 5201-7.
- Fernandez-Silva P, JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 2003; 88: 41-56.
- Ferreira, P. Catarino, R., Pereira, D., Matos, A., Pinto, D., Coelho, A., Lopes, C. y Medeiros, R. 2006. Cervical cancer and CYP2E1 polymorphisms: implications for molecular epidemiology. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006; 62:15-21.
- Fletcher O, RS. Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 353-61.
- Forster P, R, Torroni A, Bandelt H. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am J Hum Genet.* 1996; 59: 935-45.
- Franceschi S, R, Clifford GM, Snijders PJF, Arslan A, Anh PTH, Bosch FX, Ferreccio C, Hieu NT, Lazcano-Ponce E, Matos E, Molano M, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* 2006; 119: 2677-84.
- Giles R, H, Cann H, Wallace D. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 6715-9.

- González-Oliver A, L, Jiménez J, Torre-Blanco A. Founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in ancient Maya from Xcaret, Quintana Roo. *Am J Phys Anthropol* 2001; 116: 230-5.
- Green L, J, Knight A. mtDNA Affinities of the Peoples of North-Central Mexico. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 989-98.
- Guardado-Estrada M, E, Medina-Martinez I, Wegier A, Macias A, Gomez G, Cruz-Talonia F, Roman-Bassaure E, Pinero D, Kofman-Alfaro S, Berumen J. A great diversity of Amerindian mitochondrial DNA ancestry is present in the Mexican mestizo population. *J Hum Genet* 2009; 54: 695-705.
- Gutiérrez A, T, León J, Cuéllar N, Rangel V. Allele and haplotype distribution for 16 Y-STRs (AmpFISTR® Y-filerT kit) in the state of Chihuahua at North Center of Mexico. *Legal Med* 2007; 9: 154-7.
- H. Kaessmann The genetical history of humans and the great apes. *J Int Med* 2002; 251: 1-18.
- H.Rangel-Villalobos., Rivas L. Sandoval, B. Ibarra, Z.Y. García-Carvajal, J.M. Cantú, Figuera. LE. Genetic Variation among Four Mexican Populations (Huichol, Purepecha, Tarahumara, and Mestizo) Revealed by Two VNTRs and Four STRs. *Hum Biol* 2000; 72: 983-005.
- Hamanaka RB, NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 894-9.
- Harpending HC, MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR, Sherry ST. Genetic traces of ancient demography. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998; 95: 1961-7.

- He X, F, Zhang J, Cheng Q, Shen J, y Chen H. REV1 genetic variants associated with the risk of cervical carcinoma. *Eur Journal Epidemiol* 2008; 23: 403-9.
- Hemminki K, B. Familial Risks for Cervical Tumors in Full and Half Siblings: Etiologic Apportioning. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1413-4.
- Humboldt, A. *Político sobre el Reino de la Nueva-España*, (Editorial Porrúa, Ciudad de México, México, 1822).
- INEGI. *Perfil de la Población Hablante de Náhuatl* (INEGI, México, 2005).
- Ingman M, H, Paabo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000; 408: 708 - 13.
- Jian B, S, Chen D, Zou L, Chatham JC, Chaudry I, Raju R. Aging influences cardiac mitochondrial gene expression and cardiovascular function following hemorrhage injury. *Mol Med* 2010 Dec 22.
- Joseph, T., P., Wesley, R., Jayaprakash, P. G., James, F. V. y Pillai, M. R. Germline genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian cervical cancer: Associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol* 2006; 101:411-7
- Juárez-Cedillo T, M, Fragoso JM, Hernández-Hernández DM, Rodríguez-Pérez JM, Sánchez-García S, del Carmen García-Peña M, García-Carrancá A, Mohar-Betancourt A, Granados J, y Vargas-Alarcón G. The risk of developing cervical cancer in Mexican women is associated to CYP1A1 MspI polymorphism. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1590-5.

- Kivisild T, M, Bandelt H-J, Richards M, Villems R. The World mtDNA Phylogeny Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens. Springer ed. 2006: 149-79.
- Kivisild T, H-V, Parik J, Wang Y, Papiha SS, Bandelt H-J, Villems R. The Emerging Limbs and Twigs of the East Asian mtDNA Tree. Mol Biol Evol 2002; 19: 1737-51.
- Kivisild T, MJ, Kaldma K, Metspalu M, Metspalu E, Reidla M, Laos S, Parik J, Watkins WS, Dixon ME. Deep common ancestry of Indian and western-Eurasian mitochondrial DNA lineages. Curr Biol 1999; 9: 1331 - 4.
- Klemba A, M, Kukwa W, Tonska K, Szybinska A, Mossakowska M, Scinska A, Golik P, Koper K, Radziszewski J, Kukwa A, Czarnecka AM, Bartnik E. Mitochondrial genotype in vulvar carcinoma - cuckoo in the nest. J Biomed Sci 2010; 8: 73.
- Kong Q-P, H-J, Sun C, Yao Y-G, Salas A, Achilli A, Wang C-Y, Zhong L, Zhu C-L, Wu S-F, Torroni A, Zhang Y-P. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. Hum Mol Genet 2006; 15: 2076-86.
- Levine AJ, AM. The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Science 2010; 330: 1340-4.
- Licea C, J, Muñiz L, Páez R, Rangel V. Population data of nine STRs of Mexican-mestizos from Veracruz (Central South-Eastern, Mexico). Legal Med 2006; 8: 251-2.

- Lisker R, E, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centers. *Hum Biol* 1990; 62: 791-801.
- Lisker R, R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in the state of Puebla, Mexico. *Am J Phys Anthropol* 1988; 76: 331-5.
- Lisker R, Briceño R, Granados J, Babinsky V, Rubens J, Armendares S, Buentello L. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 1986; 71:203-207.
- Lisker, R. *Genética de la Poblacion Mexicana*, (Salvat, Mexico City, 1981).
- Liu VWS, Y, Yang H-J, Tsang PCK, Ng T-Y, Wong L-C, et al. Mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with susceptibility to endometrial cancer. *Human Mutation* 2003; 22: 173-174.
- Lizano M, la Cruz-Hernández E, Carrillo-García A, García-Carrancá A, Ponce de Leon-Rosales S, Dueñas-González A, Hernández-Hernández DM, Mohar A. Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecol Oncol* 2006; 102: 230-5.
- Lizano M, Berumen J, García-Carrancá A. HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants. *Arch Med Res* 2009; 40: 428-34.
- Longworth MS, LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 362-72.

- Luna-Vazquez A, G, Paez-Riberos LA, Muñoz-Valle F, González-Martin A, Rangel-Villalobos H. Population data of nine STRs of Mexican-Mestizos from Mexico City. *Forensic Sci Int* 2003; 136: 96-8.
- Mabuchi T, R, Kido A, Oya M. Typing the 1.1 kb Control Region of Human Mitochondrial DNA in Japanese Individuals. *J Forensic Sci* 2007; 52: 355-63.
- Maca-Meyer N, A, Larruga J, Flores C, Cabrera V. Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. *BMC Genetics* 2001; 2:13.
- Maciag, P.C., N.F., Souza, P.S., Franco, E.L, Villa, L.L., y Petzl-Erler M.L. Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1183-91.
- Madeleine, M. Brumback, B., Cushing-Haugen, K.L., Schwartz, S.M., Daling, J.R., Smith, A.G, Nelson, J.L, Porter, P., Shera, K.A., McDougall, J.K., y Galloway, D.A. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. *J Infect Dis* 2002; 186:1565-74.
- Magnusson PKE, P, Gyllensten UB. Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer* 2000; 88: 698-701.
- Malka F, A, Rojo M. Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: Focus on vertebrate nucleoids. *Biochim Biophys Acta- Molecular Cell Research* 2006; 1763: 463-72.

- Martinez-Marignac V, A, Cameron E, Chan A, Perera A, Globus-Goldberg R, Wacher N, Kumate J, McKeigue P, O'donnell D, Shriver M, Cruz M, et al. Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of Type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet* 2007; 120: 807-19.
- Martínez-Redondo D, A, Casajús JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J, et al. Human mitochondrial haplogroup H: The highest VO₂max consumer - Is it a paradox?. *Mitochondrion* 2010; 10: 102-107.
- McDougall I, FH, Fleagle JG. Stratigraphic placement and age of modern humans from Kibish, Ethiopia. *Nature* 2005; 433: 733-6.
- Mei Y, J, Liu H, Shi Y, Meinkoth J, Dreyfuss G, et al. tRNA Binds to Cytochrome c and Inhibits Caspase Activation. *Mol Cell* 2010; 37: 668-678.
- Meyer S, G, von Haeseler A. Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. *Genetics* 1999; 152: 1103-10.
- Munoz N, FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM, the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study G. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
- Ochoa L. Transculturation y Mestizaje. Raíz y Origen de México ed. México City: Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Antropológicas, 1995.

- Pakendorf B, M. Mitochondrial Dna And Human Evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005; 6:165-83.
- Palacio-Mejía L Sa, E, Allen-Leigh B, Hernández-Ávila M. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública Méx* 2009; 51: s208-s19.
- Pavon-Eternod M, S, Geslain R, Dai Q, Rosner MR, Pan T. tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 7268-80.
- Pello R, MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, Pala M, et al. Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 4001-4011.
- Peñalozza-Espinosa R, D, Cerda-Flores RM, Buentello-Malo L, González-Valencia G, Torres J, Aacutelvarez B, Mendoza I, Flores M, Sandoval L, Loeza F, Ramos I, et al. Characterization of mtDNA Haplogroups in 14 Mexican Indigenous Populations. *Hum Biol* 2007; 79: 313-20.
- Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006; 208: 152-64.
- Pett M, N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?. *J Pathol* 2007; 212: 356-67.
- Posada D, K. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* 2001; 16: 37-45.
- Raj K, S, Southern S, Doorbar J, Beard P. E1^{E4} Protein of Human

- Papillomavirus Type 16 Associates with Mitochondria. *J Virol* 2004; 78: 7199-207.
- Relethford J, M, Gaskill S, Hazuda H. Social class, admixture, and skin color variation in Mexican-Americans and Anglo-Americans living in San Antonio, Texas. *Am J Phys Anthropol* 1983; 61: 97-102.
 - Saitou N, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406 - 25.
 - Salas A, M, Lareu MV, Scozzari R, Coppa A, Torroni A, Macaulay V, A. C. The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 454-65.
 - Salas A, J, Iglesias VA-, Carracedo A. Gender bias in the multiethnic genetic composition of central Argentina. *J Hum Genet* 2008; 53: 662-74.
 - Salas A, V, Álvarez-Iglesias M, Cerezo C, Phillips MV, Carracedo LÁ. The mtDNA ancestry of admixed Colombian populations. *Am Journal Hum Biol* 2008; 20: 584-91.
 - Salas A, Y-G, Macaulay V, Vega A, Carracedo Ñn, Bandelt H-Jr. A Critical Reassessment of the Role of Mitochondria in Tumorigenesis. *PLoS Med* 2005; 2: e296.
 - Salas A, V, Calafell F, Bertranpetit J, Carracedo A. mtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8: 964-74.
 - Salzano. FM. variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Ciênc* 2002; 74: 223-63.

- Santos. M, R. D-loop mtDNA deletion as a unique marker of Chibchan Amerindians. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 413-4.
- Schlecht NF, RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JCM, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. Human Papillomavirus Infection and Time to Progression and Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1336-43.
- Schlecht NF, S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Persistent Human Papillomavirus Infection as a Predictor of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *JAMA* 2001; 286: 3106-14.
- Schneider S, L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 1999; 152: 1079-89.
- Serrano C. y Características Físicas de la Población Mexicana. *Arqueología Mexicana* 2004; XI: 64-7.
- Serrano C. e Historia de la Población en México (Con un esbozo antropológico de los lacandones de Chiapas). In: Martin A, Garcia P. Polimorfismo Génico (HLA) en Poblaciones Hispanoamericanas. Madrid: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 1996.
- Shim JH, KH, Cho YS, Choi HS, Song EY, Myung PK, Kang JS, Suh SK, Park SN, Yoon DY. Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene. *Amino Acids* 2008; 34: 135-41.

- Singh H, M, Mittal B. MMP-7 (-181A>G) promoter polymorphisms and risk for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008; 110: 71-5.
- Smith M. *The Oxford Encyclopedia of Mesoamerican Cultures. The Civilizations of Mexico and Central America ed., vol. 3: Oxford Univ Pr, 2001: 290-4.*
- Smith JS, L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer* 2007; 121: 621-32.
- Soares P, L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Röhl A, Salas A, Oppenheimer S, Macaulay V, Richards MB. Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 740-59.
- Solaini G, G, Baracca A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta- Bioenergetics* 2010; In Press, Corrected Proof.
- Steenbergen RDM, Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2005; 32: 25-33.
- Stewart J, C, Aagaard P, Wilson M, Isenberg A, Polansky D, Pokorak E, DiZinno J, Budowle. B. Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region. *J Forensic Sci* 2001; 46: 862-70.

- Sun, T., Y., Li, H., Han, X., Shi, Y., Wang, L., Miao, X., Tan, W., Zhao, D., Zhang, X., Guo, Y. y Lin, D. FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med* 2005; 202: 967-974.
- Sutovsky P, RD, Ramalho-Santos Jo, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos. *Biol Reprod* 2000; 63: 582-90.
- Sutovsky P, Leyen K, McCauley T, Day BN, Sutovsky M. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 24-33.
- Swire J, OP, Burt A. Mitochondrial Genetic Codes Evolve to Match Amino Acid Requirements of Proteins. *J Mol Evol* 2005; 60: 128-39.
- Tajima F. analysis of DNA polymorphism. *Jap J Genet* 1993; 68:567-95.
- Tamm E, T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martinez-Labarga C, Khusnutdinova EK, Fedorova SA, Golubenko MV, et al. Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLoS ONE* 2007; 2: e829.
- Tanaka M, VM, GonzÁlez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo L-J, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K-i, Umetsu K, et al. Mitochondrial Genome Variation in Eastern Asia and the Peopling of Japan. *Genome Res* 2004; 14: 1832-50.

- Taskiran, C., D., Yigit-Celik, N., Alikasifoglu, M., Yuce, K., Tuncbilek, E. y Ayhan, A. CYP1A1 gene polymorphism as a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 101: 503-6.
- Templeton AR, KA, Sing CF. A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. III. Cladogram Estimation. *Genetics* 1992; 132: 619-33.
- Templeton. Haplotype and modern human origins. *Am J Phys Anthropol* 2005; Suppl 41:33-59.
- Templeton. Out Africa? What do genes tell us? *Curr Opin Genet Dev* 1997 7:841-7.
- Torroni A, TG, Yang CC, Szathmary EJE, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM, Wallace DC. Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates That the Amerind and the Nadene Populations Were Founded by Two Independent Migrations. *Genetics*. 1992; 130: 153-62.
- Torroni A, T, Cabell M, Brown M, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet*. 1993; 53: 563-90.
- Torroni A, Y, Semino O, Santachiara-Beneceretti A, Scott C, Lott M, Winter M, Wallace D. mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four Native American populations from southern Mexico. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 303-18.

- Torroni A, K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. Classification of European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations. *Genetics*. 1996; 144: 1835-50.
- Torroni A, JV, Barrantes R, Schurr TG, Wallace DC. Mitochondrial DNA Clock for the Amerinds and Its Implications for Timing their Entry into North America. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 1158-62.
- Trottier H, EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006; 24: S4-S15.
- Turchi C, L, Previderè C, Grignani P, Brandstätter A, Achilli A, Parson W, Tagliabracci A, Ge FIG. Italian mitochondrial DNA database: results of a collaborative exercise and proficiency testing. *Int J Legal Med* 2008; 122: 199-204.
- Valdés de L. La población indígena. Hacia la expansión demográfica de los grupos étnicos. *DEMOS* 1989; 2: 17-8.
- Vargas-Alarcón G, J, Rodríguez-Pérez JM, Parga C, Pérez-Hernández N, Rey D, Zuñiga Jn, Arnaiz-Villena A. Distribution of HLA Class II Alleles and Haplotypes in Mexican Mestizo Population: Comparison with Other Populations. *Immunol Invest* 2010; 39: 268-83.
- Singh KK, Kulawiec M. Mitochondrial DNA Polymorphism and Risk of Cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 471: 291-303.
- Vigilant L, M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 1991; 253: 1503-7.

- Vivekanandan P, H, Yeh MM, Torbenson M. Mitochondrial mutations in hepatocellular carcinomas and fibrolamellar carcinomas. *Mod Pathol* 2010; 23: 790-8.
- Walboomers JM Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
- Wallace DC, W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion* 2010; 10: 12-31.
- Wang L, WR, de Andrade M, Boardman LA, Cunningham JM, Thibodeau SN, Petersen GM. Mitochondrial Genetic Polymorphisms and Pancreatic Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1455-9.
- Wang SS, A. Chapter 5: Viral and Host Factors in Human Papillomavirus Persistence and Progression. *JNCI Monographs* 2003; 2003: 35-40.
- Wang SS, P, Yu K, Porras C, Li Q, Safaeian M, et al. Common Genetic Variants and Risk for HPV Persistence and Progression to Cervical Cancer. *PLoS ONE*; 5: e8667.
- Wang YUE, VWS, Ngan HYS, Nagley P. Frequent Occurrence of Mitochondrial Microsatellite Instability in the D-Loop Region of Human Cancers. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042: 123-129.

- Wang, SS, CM, Hildesheim, A, Schiffman, M, Herrero, R, Bratti, M.C, Sherman, M.E, Alfaro, M, Hutchinson, M.L, Morales, J, Lorincz, A, Burk,R.D, Carrington, M, Erlich, H.A, y Apple, R.J. Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia: results from a population-based study in Costa Rica. *J Infect Dis* 2001; 184: 1310-4.
- Wank, R., D.J., Thomssen, C. HLA antigens and cervical carcinoma. *Nature* 1992; 356: 22-3.
- Wanrooij S, M. The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochim Biophys Acta– Bioenergetics* 2010; 1797: 1378-88.
- Whittam T, A, Stoneking M, Cann R. Allelic variation in human mitochondrial genes based on patterns of restriction site polymorphism. *Proc Nati Acad Sci USA* 1986; 83: 9611-5.
- Woodman CBJ, SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 11-22.
- Yao Y-G, Q-P, Bandelt H-J, Kivisild T, Zhang Y-P. Phylogeographic Differentiation of Mitochondrial DNA in Han Chinese. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 635-51.
- Ye C, X, Pierce L, Wen W, Courtney R, Gao Y-T, Zheng W, Cai Q. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119: 431-6.
- Yong Ji Qing Song X, Zhe Jia Z, Hai Yu L, Jung Bin L. Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region I, II and III in northeast China Han. *Forensic Sci Int* 2005; 149: 267-9.

- Zelmanowicz et al. Family history as a co-factor for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix: Results from two studies conducted in Costa Rica and the United States. *Int J Cancer* 2005; 116: 599-605.

Muestra	Caso/Control	Haplotipo
C001	Control	16153A 16223T 16240G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C002	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309C 315.1C
C003	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C004	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C005	Control	16223T 16298C 16301T 16325C 16327T 73G 215G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C006	Control	16111T 16223T 16284G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C008	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16295T 73G 152C 263G 310C 309C 315.1C
C009	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 152C 153G 195C 235G 263G 309.1C 315.1C
C010	Control	16051G 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.2C 315.1C
C012	Control	16111T 16136C 16223T 16247G 16257T 16274A 16290T 16319A 16344T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C014	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 185A 263G del 290-291 309C 315.1C
C015	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309C 315.1C
C016	Control	16075C 16111T 16172C 16223T 16239T 16286T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C018	Control	16153A 16223T 16240G 16263C 16266T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 225T 235G 263G 309.1C 315.1C
C019	Control	16223T 16294T 16298C 16325C 16327T 73G 203A 204C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C020	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C023	Control	16126C 16292T 16294T 73G 146C 152C 252C 263G 279C 309C 315.1C
C024	Control	16092C 16111T 16136C 16223T 16257T 16290T 16311C 16319A 16344T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C025	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C026	Control	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C027	Control	16111T 16223T 16290T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C028	Control	16051G 16094C 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C030	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C031	Control	16183C 16189C 16217C 16259T 16357C 73G 146C 152C 263G 309C 315.1C
C032	Control	16051G 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 195C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C034	Control	16153A 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C035	Control	16111T 16136C 16223T 16290T 16299G 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 198T 215G 235G 263G 309C 315.1C
C038	Control	16092C 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 153G 235G 263G 309C 315.1C
C039	Control	16172C 16182C 16183C 16184T 16189C 16217C 73G 263G 309.1C 315.1C
C040	Control	16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C041	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16259T 16357C 16362C 73G 263G 309C 315.1C
C042	Control	16223T 16325C 16362C 73G 147A 188G 234G 263G 309.2C 315.1C
C043	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16342C 73G 146C 152C 263G 309delC 315.1C
C044	Control	16086C 16111T 16209C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C045	Control	16111T 16223T 16284G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C046	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C048	Control	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309C 315.2C
C049	Control	16092C 16182C 16183C 16189C 16217C 16344T 73G 263G 309.1C 315.1C
C050	Control	16104T 16183C 16189C 16217C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
C051	Control	16111T 16129A 16213A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C052	Control	16183C 16189C 16217C 16323C 73G 263G 267C 309C 315.1C
C053	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 73G 146C 150T 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C056	Control	16223T 16274A 16325C 73G 263G 309.1C 315.1C
C057	Control	16183C 16189C 16217C 16323C 73G 263G 267C 309.1C 315.1C
C058	Control	16187T 16223T 16232T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C059	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16291T 73G 195C 263G 309.2C 315.1C
C061	Control	16075C 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 150T 199C 204C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C062	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.2C 315.1C
C063	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C064	Control	16111T 16136C 16172C 16223T 16247G 16257T 16274A 16290T 16319A 16344T 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C065	Control	16051G 16223T 16278T 16318G 16362C 73G 263G 309C 315.1C
C066	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 16362C 73G 215G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C068	Control	16093C 16111T 16136C 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C069	Control	16111T 16223T 16234T 16239T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 238G 263G 309.1C 315.1C
C070	Control	16051G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C073	Control	16086C 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C077	Control	16172C 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 143A 195C 260A 263G del 290-291 309C 315.1C
C079	Control	16051G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G 310C del 290-291 309C 315.1C
C089	Control	16111T 16223T 16274A 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 263G 309.1C 315.1C
C092	Control	16111T 16223T 16290T 16362C 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
C094	Control	16140C 16183C 16189C 16217C 16270G 16278T 73G 146C 248G 263G 309.2C 315.1C
C095	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C097	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C100	Control	16213A 16224C 16311C 73G 146C 263G 309C 315.1C
C103	Control	16093C 16223T 16325C 16362C 73G 146C 263G 309C 315.1C
C105	Control	16111T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.2C 315.1C
C106	Control	16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C107	Control	16124C 16223T 16278T 16362C 73G 263G 309C 315.1C
C108	Control	16223T 16325C 16362C 73G 200G 263G 309.1C 315.1C
C109	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16319A 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
C110	Control	16111T 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 199C 235G 263G 309.2C 315.1C
C111	Control	16111T 16183C 16189C 16217C 16223T 16239T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 226C 228A 235G 263G 309.2C 315.1C
C112	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C115	Control	16223T 16325C 16362C 73G 211G 263G 309.1C 315.1C
C116	Control	16111T 16124C 16175G 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
C117	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16319A 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
C118	Control	16173T 16183C 16189C 16217C 16311C 16352C 73G 263G 309C 315.1C
C119	Control	16111T 16136C 16223T 16290T 16319A 16324C 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C120	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C121	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16278T 73G 146C 263G 309.1C 315.1C
C122	Control	16069T 16126C 16294T 73G 152C 185A 228A 263G 295T 309C 315.1C
C123	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 215G 263G del 290-291 309C 315.1C
C124	Control	16164G 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.1C 315.1C
C125	Control	16111T 16223T 16284G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C126	Control	16183C 16189C 16217C 16316G 73G 263G 309.1C 315.1C

Muestra	Caso/Control	Haplotipo
C127	Control	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309C 315.1C
C128	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16278T 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
C129	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16325C 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C130	Control	16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C131	Control	263G 309.1C 315.1C
C132	Control	16213A 16223T 16290T 16319A 16325C 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C133	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16295T 73G 146C 152C 263G 309.2C 315.1C
C134	Control	16111T 16223T 16265C 16290T 16319A 16330C 73G 103A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C135	Control	16164G 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.2C 315.1C
C137	Control	16136C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C138	Control	16111T 16223T 16234T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C139	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C140	Control	16126C 16259T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 75A 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C141	Control	16093C 16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C142	Control	16092C 16111T 16183C 16189C 16217C 16325C 73G 228A 263G 309.1C 315.1C
C143	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.2C 315.1C
C144	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.2C 315.1C
C145	Control	16223T 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C146	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C147	Control	16153A 16223T 16240G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C148	Control	16051G 16188T 16204A 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 263G del 290-291
C149	Control	16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
C150	Control	16111T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.2C 315.1C
C153	Control	16111T 16241G 16290T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C154	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C155	Control	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
C156	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C157	Control	16129A 16172C 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 152C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C158	Control	16051G 16188T 16204A 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C159	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16344T 16362C 73G 146C 235G 263G 309C 315.1C
C160	Control	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 200G 235G 263G 309.1C 315.1C
C161	Control	16240G 152C 263G 309.1C 315.1C
C162	Control	16095T 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C163	Control	16183C 16189C 16217C 16278T 73G 234G 263G 309.2C 315.1C
C164	Control	16111T 16223T 16234T 16290T 16319A 16360T 16362C 97A 146C 153G 235G 263G del 106-111 309.1C 315.1C
C165	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 143A 152C 153G 185A 263G 309C 315.1C
C166	Control	16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.1C 315.1C
C168	Control	16111T 16223T 16234T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C169	Control	16223T 16240G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 195C 235G 263G 309.1C 315.1C
C170	Control	16209C 16223T 16311C 73G 150T 189G 200G 263G 309.1C 315.1C
C171	Control	16192T 16270T 16319A 73G 263G 309C 315.1C
C172	Control	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C173	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C174	Control	16183C 16189C 16200G 16217C 16219C 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
C175	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C176	Control	16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C177	Control	16129A 16142T 16192T 16223T 16264T 16265G 16325C 16362C 73G 146C 263G 324A 309.1C 315.1C
C178	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.1C 315.1C
C179	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 93G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
C180	Control	16086C 16223T 16295T 16298C 16319A 16325C 16327T 73G 194T 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C181	Control	16189C 16192T 16270T 16319A 73G 150T 263G 309C 315.1C
C182	Control	16093C 16136C 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C183	Control	16111T 16176T 16223T 16239T 16290T 16298C 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C184	Control	16051G 16129C 16189C 16256T 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
C185	Control	16051G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 150T 194T 263G del 290-291 309C 315.1C
C186	Control	16186T 16223T 16293G 16298C 16325C 16327T 73G 146C 174T 199C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C187	Control	16111T 16223T 16290T 16362C 73G 146C 153G 193G 235G 263G 309.1C 315.1C
C188	Control	16223T 16325C 16362C 73G 211G 263G 309.1C 315.1C
C189	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16270G 16278T 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
C190	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 320T 309.2C 315.1C
C191	Control	16092C 16168T 16223T 16290T 16296T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C192	Control	16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C193	Control	16140C 16183C 16189C 16217C 16270G 16278T 73G 146C 248G 263G 309.2C 315.1C
C194	Control	16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 200G 235G 263G 309.1C 315.1C
C195	Control	16129A 16172C 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 152C 263G del 290-291 309.2C 315.1C
C196	Control	16111T 16182C 16183C 16189C 16217C 16294T 73G 93G 228A 263G 309.2C 315.1C
C197	Control	16051G 16093C 16188T 16204A 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C198	Control	16104A 16111T 16189C 16192T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C199	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 16354T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
C200	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C201	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C202	Control	16183C 16189C 16217C 73G 114G 263G 309C 315.1C
C203	Control	16051G 16188T 16204A 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
C204	Control	16051G 16188T 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
C205	Control	16111T 16183C 16189C 16223T 16239T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 226C 228A 235G 263G 309.1C 315.1C
C207	Control	16181C 16182C 16183C 16189C 16217C 16362C 73G 146C 182T 263G 309C 315.1C
C208	Control	16181G 16223T 16292T 16298C 16325C 16327T 73G 234G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C209	Control	16129A 16223T 16224C 16234T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C210	Control	16111T 16172C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C211	Control	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C212	Control	16223T 16325C 73G 150T 185A 263G 309.1C 315.1C
C213	Control	16111T 16290T 16319A 73G 146C 235G 263G 309.2C 315.1C
C214	Control	16111T 16223T 16274A 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 182T 235G 263G 309.1C 315.1C
C215	Control	16144C 16182C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309C 315.1C
C216	Control	16187T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 320T 309.1C 315.1C

Muestra	Caso/Control	Haplotipo
C217	Control	16086C 16172C 16181G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
C218	Control	16111T 16223T 16274A 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C219	Control	16126C 16294T 73G 263G 309.2C 315.1C
C220	Control	16111T 16223T 16274A 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C221	Control	16179A 16183C 16189C 16217C 16278T 73G 263G 309.2C 315.1C
C223	Control	16223T 16274A 16325C 16362C 73G 263G 309C 315.1C
C224	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 150T 263G 308T 309.2C 315.1C
C225	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16325C 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C226	Control	16111T 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C228	Control	16111T 16131C 16134T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 75A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C229	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16360T 16362C 146C 153G 235G 263G del 106-111 309.2C 315.1C
C230	Control	16111T 16172C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C231	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C232	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 16362C 73G 146C 153G 263G 310C 309C 315.1C
C233	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C234	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C235	Control	16183C 16189C 16217C 16270G 16278T 73G 143A 146C 263G 309.1C 315.1C
C238	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C239	Control	16093C 16223T 16325C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
C240	Control	16111T 16182C 16183C 16189C 16217C 16294T 73G 93G 228A 263G 309.2C 315.1C
C241	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C242	Control	16181G 16223T 16261T 16292T 16298C 16325C 16327T 73G 234G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C243	Control	16111T 16136C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C244	Control	16183C 16189C 16217C 16232A 16278T 16362C 73G 263G 309.2C 315.1C
C245	Control	16129A 16172C 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 152C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C246	Control	16223T 16292T 16325C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
C247	Control	16051G 16188T 16204A 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 200G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C248	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 215G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C249	Control	16181G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 151T 263G del 290-291 309C 315.1C
C250	Control	16167T 16223T 16290T 16311C 16319A 16352C 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C251	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C252	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C254	Control	16111T 16223T 16239T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 151T 152C 153G 215G 235G 263G 335G 309.1C 315.1C
C255	Control	16092C 16182C 16183C 16189C 16217C 16335G 16362C 73G 94A 263G 324G 309.1C 315.1C
C256	Control	16189C 16223T 16325C 16362C 73G 263G 324G 309.1C 315.1C
C258	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 203A 204C 263G del 290-291 309.2C 315.1C
C260	Control	16111T 16129A 16223T 16234T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C263	Control	16111T 16223T 16290T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C264	Control	16111T 16223T 16284G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C265	Control	16051G 16188T 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C266	Control	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C268	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309C 315.1C
C269	Control	16189C 16192T 16223T 16245T 16278T 16294T 16309G 73G 143A 146C 152C 195C 263G 309C 315.1C
C270	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
C272	Control	16111T 16223T 16258G 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C273	Control	16111T 16136C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C275	Control	16069T 16126C 16215T 73G 185A 188G 228A 263G 295T 309.1C 315.1C
C278	Control	16137G 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C279	Control	16223T 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
C281	Control	16192T 93G 95C 263G 309C 315.1C
C282	Control	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C283	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16295T 73G 146C 152C 263G 309.2C 315.1C
C287	Control	16093C 16298C 263G 309C 315.1C
C288	Control	16092C 16111T 16136C 16223T 16257T 16290T 16311C 16319A 16344T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C289	Control	16111T 16223T 16239T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C290	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C292	Control	16111T 16223T 16234T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C293	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C294	Control	16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
C297	Control	315.1C
C298	Control	16111T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
C299	Control	16179T 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C300	Control	16111T 16223T 16239T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C302	Control	16086C 16223T 16295T 16298C 16319A 16325C 16327T 16362C 73G 194T 263G del 290-291 309C 315.1C
C303	Control	16298C 16325C 16327T 73G 215G 263G del 290-291 309C 315.1C
C304	Control	16183C 16189C 16217C 16278T 73G 263G 309.1C 315.1C
C305	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 94A 150T 263G 309T del 290-291 309.1C 315.1C
C307	Control	16111T 16223T 16265G 16290T 16293G 16311C 16319A 16362C 73G 90C 98T 146C 153G 195C 235G 263G 309.1C 315.1C
C311	Control	16111T 16223T 16274A 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C312	Control	16111T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.2C 315.1C
C313	Control	16111T 16189C 16223T 16239T 16290T 16319A 16325C 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C314	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.2C 315.1C
C318	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16360T 16362C 146C 153G 235G 263G del 106-111 309.2C 315.1C
C319	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 97A 146C 153G 235G 263G del 106-111 309C 315.1C
C320	Control	16092C 16153A 16223T 16240G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C322	Control	16183C 16189C 16217C 16278T 73G 263G 309.2C 315.1C
C323	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C325	Control	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C328	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C329	Control	16142T 16223T 16274A 16325C 16362C 73G 146C 263G 309.1C 315.1C
C330	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16357C 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 295T 309C 315.1C
C332	Control	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C333	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 16362C 73G 146C 153G 263G 310C 309C 315.1C
C334	Control	16111T 16129A 16189C 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 215G 235G 263G 309.1C 315.1C

Muestra	Caso/Control	Haplotipo
C335	Control	16129A 16220C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C336	Control	16051G 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C337	Control	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C338	Control	16093C 16148T 16183C 16185T 16217C 73G 146C 263G 309C 315.1C
C339	Control	16069T 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
C341	Control	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
C343	Control	16069T 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C345	Control	16223T 16270T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 214G 235G 263G 309C 315.1C
C346	Control	16111T 16124C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 151T 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C347	Control	16129A 16145A 16183C 16187T 16189C 16217C 16323C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C
C348	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 195C 235G 263G 309.1C 315.1C
C349	Control	16111T 16129A 16223T 16260T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 151T 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
C350	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
C351	Control	16182C 16183C 16189C 16217C 16250G 73G 182T 263G 309.1C 315.1C
C353	Control	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
C354	Control	16093C 16111T 16136C 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R001	caso	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
R002	caso	16298C 16325C 16327T 73G 215G 263G 309C 315.1C
R004	caso	16183C 16189C 16217C 16278T 16362C 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
R005	caso	16183C 16189C 16217C 16278T 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
R006	caso	16223T 16325C 16362C 73G 152C 217C 263G 309C 315.1C
R007	caso	16111T 16223T 16288C 16290T 16319A 16348T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R008	caso	16213A 16223T 16290T 16319A 16325C 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R009	caso	16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.2C 315.1C
R010	caso	16223T 16241G 16301T 16342C 16362C 73G 152C 263G 309.1C 315.1C
R011	caso	16111T 16183C 16189C 16223T 16239T 16288C 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 204C 235G 263G 309.2C 315.1C
R012	caso	16223T 16320T 73G 150T 152C 195C 263G 309C 315.1C
R013	caso	16111T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.2C 315.1C
R014	caso	16075C 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 150T 204C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R015	caso	16240G 152C 263G 309.1C 315.1C
R019	caso	16144C 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 248G 263G del 290-291 309C 315.1C
R020	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R021	caso	16183C 16189C 16217C 73G 207A 263G 309.1C 315.1C
R022	caso	16092C 16111T 16134T 16223T 16247C 16256T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 215G 235G 263G 309.1C 315.1C
R023	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R024	caso	16092C 16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R028	caso	16223T 16274A 16298C 16319A 16325C 16327T 73G 214G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R029	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R032	caso	16181G 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R033	caso	16182C 16183C 16189C 73G 263G 309.2C 315.1C
R036	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16295T 73G 146C 152C 226C 263G 309.2C 315C
R037	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R040	caso	16092C 16111T 16136C 16223T 16257T 16290T 16311C 16319A 16344T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R043	caso	16092C 16183C 16189C 16217C 16243C 73G 114G 146C 263G 309C 315.1C
R044	caso	16183C 16189C 16217C 16298C 73G 114G 146C 263G 309C 315.1C
R046	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16360T 16362C 73G 146C 153G 195C 263G 310C 309C 315.1C
R047	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 16362C 73G 146C 153G 195C 263G 310C 309C 315.1C
R048	caso	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R053	caso	16181G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 150T 263G del 290-291 309C 315.1C
R056	caso	16223T 16316G 16325C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
R057	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R058	caso	16092C 16182C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309C 315.1C
R059	caso	16114T 16154C 16182C 16183C 16189C 16217C 16298C 16344T 73G 114G 263G 309.2C 315.1C
R060	caso	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
R061	caso	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309C 315.1C
R062	caso	16183C 16189C 16217C 16323C 73G 263G 309.2C 315.1C
R064	caso	16183C 16189C 16217C 16323C 73G 263G 267C 309C 315.1C
R065	caso	16091G 16098G 16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R066	caso	16111T 16215G 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 185A 188G 263G 309.1C 315.1C
R067	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R069	caso	16104T 16129A 16223T 16240G 16274A 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R070	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R072	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R073	caso	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309C 315.1C
R074	caso	16223T 16240G 16290T 16319A 16344T 16362C 73G 146C 153G 195C 204C 235G 263G 309.1C 315.1C
R075	caso	16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 95C 263G 309.1C 315.1C
R077	caso	16172C 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 146C 152C 153G 195A 235G 263G 309.1C 315.1C
R080	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R081	caso	16189C 16217C 16241G 16287T 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
R082	caso	16111T 16223T 16259T 16290T 16300G 16319A 16362C 73G 146C 153G 215G 235G 263G 309.1C 315.1C
R086	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 111G 146C 153G 195C 235G 263G 309.1C 315.1C
R087	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R088	caso	16086C 16104T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R090	caso	16153A 16209C 16223T 16240G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R092	caso	16111T 16145A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R093	caso	16111T 16223T 16234T 16239T 16274A 16290T 16294T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R095	caso	16129A 16182C 16183C 16189C 16217C 16259T 16357C 73G 263G 309C 315.1C
R096	caso	16172C 16181G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
R097	caso	16223T 16290T 16319A 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
R098	caso	16111T 16223T 16239T 16242T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 204C 235G 263G 309.1C 315.1C
R100	caso	16175G 16223T 16298C 16325C 16327T 16352C 73G 204C 263G 272G del 290-291 309C 315.1C
R101	caso	16256T 16270T 73G 263G 309C 315.1C
R103	caso	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309.2C 315.1C
R104	caso	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309C 315.1C

Muestra	Caso/Control	Haplotipo
R106	caso	16111T 16223T 16290T 16291T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R107	caso	16051G 16188T 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 263G del 290-291 309.2C 315.1C
R108	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R109	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16319A 73G 125C 127C 146C 263G 309.1C 315.1C
R110	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R112	caso	16184T 16223T 16261T 16298C 16325C 73G 152C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R113	caso	16111T 16136C 16223T 16290T 16319A 16355T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R114	caso	16153A 16223T 16298C 16320T 16325C 16327T 73G 195C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R115	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 195C 263G 309.2C 315.1C
R116	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R117	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 143A 195C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R119	caso	16129A 16172C 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 152C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R120	caso	16111T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.2C 315.1C
R122	caso	16111T 16223T 16290T 16299G 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R123	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16295T 73G 152C 263G 310C 309C 315.1C
R124	caso	16181G 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R125	caso	16129A 16145A 16183C 16187T 16189C 16193insC 16217C 16319A 16323C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C
R126	caso	16129A 263G 309.1C 315.1C
R127	caso	16213A 16223T 16290T 16304C 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R128	caso	16111T 16223T 16272G 16287G 16288C 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 208C 235G 263G 309.2C 315.1C
R131	caso	16086C 16172C 16181G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
R132	caso	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309C 315.1C
R133	caso	16104T 16183C 16189C 16217C 16362C 16366A 73G 146C 150T 263G 309.1C 315.1C
R134	caso	16086C 16104T 16129A 16223T 16240G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 195C 235G 263G 309C 315.1C
R137	caso	16111T 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R139	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16278T 73G 263G 309.2C 315.1C
R140	caso	16256T 16270T 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R141	caso	16140C 16183C 16189C 16217C 16270G 16278T 73G 146C 248G 263G 309.2C 315.1C
R142	caso	16223T 16325C 16362C 73G 214G 263G 267C 309.1C 315.1C
R143	caso	16086C 16104T 16129A 16189C 16223T 16240G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R144	caso	16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R145	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16295T 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
R147	caso	16183C 16189C 16217C 16259T 16357C 73G 263G 309.2C 315.1C
R148	caso	16183C 16189C 16217C 16274A 16278T 16362C 73G 263G 309.2C 315.1C
R149	caso	16111T 16223T 16234T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 310C 309C 315.1C
R150	caso	16111T 16223T 16234T 16239T 16290T 16294T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R151	caso	16153A 16223T 16240G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R153	caso	16183C 16189C 16217C 16259T 16290T 16357C 73G 263G 309.1C 315.1C
R155	caso	16223T 16274A 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R156	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16270G 16278T 16362C 16366A 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
R157	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16319A 73G 125G 146C 228A 263G 287G 309.2C 315.1C
R158	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R160	caso	16051G 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R161	caso	16111A 16182C 16183C 16189C 16217C 73G 216C 263G 309.2C 315.1C
R163	caso	16223T 16325C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
R164	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16278T 73G 146C 263G 309.1C 315.1C
R166	caso	16183C 16189C 16217C 16278T 73G 263G 309C 315.1C
R168	caso	16086C 16111T 16129A 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 199C 235G 263G 309.1C 315.1C
R169	caso	16221T 16223T 16325C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
R170	caso	16086C 16111T 16129A 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 199C 235G 263G 309.2C 315.1C
R171	caso	16092C 16182C 16183C 16189C 16214T 16217C 73G 263G 309.1C 315.1C
R172	caso	16182C 16183C 16188T 16189C 16217C 16243C 16295T 73G 146C 263G 309.1C 315.1C
R173	caso	16182C 16183C 16188T 16189C 16217C 16243C 16295T 73G 152C 182T 234G 263G 309C 315.1C
R174	caso	16111T 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R175	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
R176	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
R177	caso	16111T 16223T 16284G 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R178	caso	16299G 263G 309.2C 315.1C
R179	caso	16223T 16270T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R180	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 143A 152C 153G 185A 263G 309C 315.1C
R181	caso	16179T 16182C 16183C 16189C 16217C 16296T 16327A 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
R182	caso	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 146C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R183	caso	16223T 16290T 16319A 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R184	caso	16111T 16223T 16239T 16290T 16319A 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R187	caso	16092C 16111T 16136C 16223T 16257T 16290T 16311C 16319A 16344T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R188	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 146C 207A 263G 303A 310C 309C 315.1C
R189	caso	16111T 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R190	caso	16111T 16223T 16274A 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R191	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R192	caso	16183C 16189C 16223T 16269G 16298C 16325C 16327T 16357C 73G 263G 310C 309C 315.1C
R193	caso	16129A 16172C 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 152C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R194	caso	16213A 16223T 16290T 16319A 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R195	caso	263G 309C 315.1C
R196	caso	16086C 16129A 16148T 16183C 16189C 16217C 16294T 73G 146C 150T 195C 263G 309C 315.1C
R198	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309C 315.1C
R200	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16278T 73G 146C 263G 309.1C 315.1C
R201	caso	16111T 16136C 16223T 16247G 16257T 16274A 16290T 16319A 16344T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R202	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 152C 263G 309DELCC 315.1C
R203	caso	16051G 16188T 16204A 16223T 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R204	caso	16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 204C 235G 249G 263G 309.1C 315.1C
R205	caso	16183C 16189C 16217C 16270G 16278T 73G 146C 263G 309.2C 315.1C
R207	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 131C 263G 309.1C 315.1C
R208	caso	16181G 16223T 16292T 16298C 16325C 16327T 16362C 73G 263G 309.1C 315.1C
R209	caso	16183C 16189C 16217C 16270G 16278T 73G 146C 263G 309.2C 315.1C

Muestra	Caso/Control	Haplotipo
R211	caso	16092C 16111T 16136C 16223T 16247G 16257T 16278T 16290T 16319A 16344T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R213	caso	16223T 16290T 16319A 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
R214	caso	16111T 16223T 16239T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R215	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R216	caso	16111T 16223T 16272G 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R217	caso	16111T 16189C 16190T 16193insC 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 226C 235G 263G 309.2C 315.1C
R218	caso	16172C 16185T 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 228A 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R219	caso	16051G 16093C 16223T 16264T 16311C 73G 150T 263G 309C 315.1C
R220	caso	16223T 16298C 16325C 16327T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
R222	caso	16086C 16183C 16189C 16217C 73G 139C 263G 309C 315.1C
R223	caso	16104T 16186T 16223T 16293G 16298C 16325C 16327T 73G 199C 263G del 290-291 309C 315.1C
R224	caso	16223T 16298C 16325C 16327T 16354T 73G 263G del 290-291 309C 315.1C
R226	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 263G 309.2C 315.1C
R227	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 73G 146C 153G 263G 310C 309C 315.1C
R228	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16278T 16354A 73G 263G 309.2C 315.1C
R229	caso	16183C 16189C 16217C 16256T 73G 152C 198T 263G 309C 315.1C
R230	caso	16223T 16259G 16298C 16319A 16325C 16327T 73G 204C 215G 263G del 290-291 309C 315.1C
R231	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16295T 73G 146C 152C 263G 309.2C 315.1C
R232	caso	16129A 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 214G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R233	caso	16051G 16188T 16204A 16223T 16325C 16327T 16362C 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R234	caso	16182C 16183C 16189C 16217C 16259T 16362C 73G 263G 309.2C 315.1C
R235	caso	16223T 16320T 73G 150T 195C 198T 263G 309.2C 315.1C
R236	caso	16223T 16320T 73G 150T 152C 194T 195C 263G 309.1C 315.1C
R237	caso	16129A 16172C 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 146C 152C 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R239	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 16362C 73G 146C 153G 263G 310C 309C 315.1C
R241	caso	16181G 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T 73G 263G 309.2C 315.1C
R242	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16335G 16362C 73G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R243	caso	16223T 16274A 16298C 16319A 16325C 16327T 73G 214G 263G del 290-291 309.1C 315.1C
R244	caso	16093C 16111T 16136C 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R245	caso	16213A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
R246	caso	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 103A 146C 153G 195C 235G 263G 309.2C 315.1C
R247	caso	16111T 16223T 16241G 16290T 16362C 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
R248	caso	16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 235G 263G 309.2C 315.1C
R249	caso	16223T 16278T 16316G 16325C 16362C 73G 195C 263G 309.1C 315.1C
R250	caso	16111T 16223T 16271C 16290T 16319A 16325C 16362C 73G 143A 146C 153G 235G 246insA 263G 309.2C 315.1C