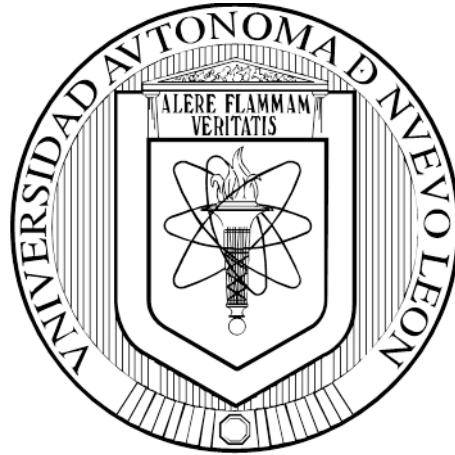


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**VALIDACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES GÉNICOS  
PARA CÁNCER CERVICOUTERINO**

**POR**

**Q.F.B. MARIEL ARACELI OYERVIDES MUÑOZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**ENERO 2014**

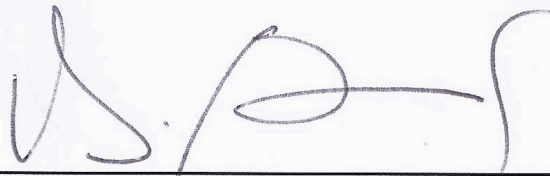
**Validación de potenciales biomarcadores génicos para cáncer cervicouterino.**

**Aprobación de Tesis:**



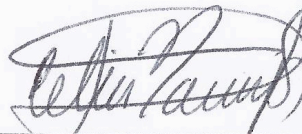
---

**Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez**  
**Directora de Tesis**



---

**Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña**  
**Co-Director de Tesis**



---

**Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez**  
**Miembro de Tesis**



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Unidad de Biotecnología Médica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En colaboración con el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) de la Secretaría de Salud del Gobierno Federal. Bajo la dirección de la Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez, la co-dirección del Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña y como miembro de la comisión la Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez.

## **Agradecimientos.**

Me es imposible expresar todo mi agradecimiento en poco espacio a las personas que me apoyaron en esta aventura llamada maestría. Gracias a todas y cada una de las personas que me acompañaron en este camino, a las que siguen y a las que ya no están, que siempre estuvieron listas para brindarme todo su apoyo, ahora me toca regresarles un poquito de todo lo que me han otorgado. Con todo mi cariño esta tesis esta dedicada a todos ustedes, si, ustedes saben quienes son.

A la Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis. Por depositar su confianza en mí, su apoyo, sus consejos, su paciencia. Y permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña por todo el apoyo brindado en este trabajo, por la confianza, sabiduría, ayuda, paciencia y lecciones brindadas en este tiempo. Fue un gusto trabajar con usted y con la Dra. Lourdes.

A la Dra. Celia por el apoyo en la elaboración de esta tesis.

Gracias al equipo de investigación que encabeza el Dr. Barrera: Iram Rodríguez, gracias por la ayuda brindada para esta tesis. Diana Pérez, gracias por toda tu ayuda y tus consejos. Oscar, Alí, Gaby, Rolando, Mauricio, gracias por su apoyo en las juntas y por los consejos.

Erick, gracias por el apoyo en las juntas, por ayudarme siempre, por tus consejos... Gracias por tu paciencia y por haberme acompañado. Gracias por el tiempo que estuviste conmigo.

Daniela Monsiváis, no tengo palabras para agradecerte todo, desde los reactivos que no me querías dar, hasta los consejos y ayuda para mi tesis. Gracias por escucharme siempre, por tu comprensión y por tus regaños... Ok y por los reactivos también.

A mi segunda familia del departamento. Normita, Juany, Ariadna, Lulú, mis segundas mamás. Gracias infinitas por todo.

A mis amigos de la facultad, gracias por hacer de esta etapa una experiencia única: Elda "Barney" Melchor, Daniel Arellanos y Angel Merino, por su amistad, apoyo y consejos. Carlos Muza, por escucharme y por tus consejos. Guillermo Guerrero, por todo tu apoyo, consejos, paciencia y por estar siempre para mí. Gracias a ti y a Muza por acompañarme al vicio.

A mis amigos de generación: Geo Calvo, Liz Martínez, Monica Tayde (mi roomie favorita), Paola Bocanegra. A seguir trabajando como levaduras.

A mi “trío de tres” Kame Galán Huerta y Alejandro “Aleikis Koskoroskos” Robles. ¿Cómo agradecerles todo lo que han hecho por mi? No cabe en unas palabras, agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de tenerlos en mi vida. Les agradezco por aceptarme en su vida, por las chocoaventuras, salidas (la mayoría por comida), por sus consejos, apoyo siempre... Si todos esos cafés de Starbucks hablaran, creo que serían los mejores testigos de esta amistad.

A mis mejores amigos: Luis Alberto Martínez, te agradezco de corazón estar siempre conmigo. Genaro, mi hermanito, gracias por todas tus porras. A mis amigos de Saltillo, siempre me esperon para verme. Nunca pasa el tiempo cuando estamos juntos: José Antonio Duarte, Saira, Mayela, José Miguel (Mime).

A los Frens renovados, que los pocos fines que nos vemos, son aventuras diferentes y juegos nuevos de fiestas. Jorge Carlos Ríos, Mariel Garza, Joel Ovalle, Alexa de la Cruz, Fernando Salinas, Victor Madrid, Sandra Rosales “Princess”, Lily, Nadia, las cuatas, Arturo, Siomi, David, Ivan, André, Yaqui.

A mis mejores amigas: Adriana “Alex” Medrano y Karina González, gracias por apoyarme, regañarme y por estar conmigo en esta etapa importante de mi vida.

A mi familia, sin ustedes no habría superado mis metas, ni logrado mis propósitos. Gracias por ayudarme a levantarme y alentarme siempre. Tía Lolis, Marlen, Aquiles, Tiki, Baloy, Marina, Lizeth, Gerardo, Luis, tía Juanis, Efraín...

A mis primos Saúl y Carmen, por recibirme por más de un año en su casa para que yo pudiera realizar mi maestría. Gracias siempre.

A las personas más importantes en mi vida: A mis padres Ernesto y Rosy, su apoyo fue vital para mi. No puedo expresar en palabras mi agradecimiento. A mi hermano Ernesto, mi cuñada Perla y a mi sobrino Netito. Gracias por su ayuda y su amor siempre. Y si, al amor de mi vida, quien siempre esperó paciente mi regreso a visitarla, “Migaja”.

Los amo a todos.

Y lo más importante, gracias a Dios por guiar mi camino y permitirme estar en la vida de cada una de estas personas. Por brindarme las oportunidades que me han llevado a este punto.

A mis abuelos...  
desaparecieron de mi camino,  
pero jamás de mi corazón.



## ÍNDICE.

Contenido	Página
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE CUADROS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII

### CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. El cáncer cervicouterino	1
1.1 Epidemiología.	1
1.2 Etiología del CaCU.	2
1.3 Síntomas.	4
1.4 Diagnóstico y detección del CaCU.	4
1.5 Clasificación del CaCU.	8
1.6 Mecanismo de infección del VPH.	11
1.7 Factores de riesgo.	12
1.8 Vacunas contra VPH.	13
1.9 Tratamiento para el CaCU.	13
1.9.1 Cirugía.	14
1.9.2 Radioterapia.	14
1.9.3 Quimioterapia.	15
1.10 Tratamiento para la infección por VPH.	15
1.11 Genotipificación de VPH.	16
1.12 Cambios genéticos en la progresión a CaCU.	17
1.13 Búsqueda de Biomarcadores oncogénicos por medio de secuenciación masiva.	18
1.14 Secuenciación masiva por medio de la plataforma de Ion Torrent.	22

### CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN

Justificación	23
---------------	----

## CAPÍTULO III: OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.	24
3.2 Objetivos Específicos.	24

## CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 Lugar de realización del estudio e instituciones participantes.	25
4.2 Material	25
4.2.1 Origen de los reactivos	25
4.2.2 Material Biológico.	26
4.3 Equipo.	26
4.4 Métodos:	27
4.4.1 Estrategia General.	27
4.4.2. Selección de muestras.	28
4.4.3. Extracción de ADN.	29
4.4.4. Control de calidad de las muestras de ADN.	30
4.4.5. Genotipificación de las muestras.	31
4.4.5.1 Estandarización de la PCR para amplificar la región L1 del VPH.	31
4.4.5.2 Visualización de los productos de PCR de la región L1 del VPH amplificados con los iniciadores GPs y secuenciados por la técnica de Sanger.	32
4.4.5.3 Genotipificación.	33
4.4.6. Secuenciación de genes candidatos para biomarcadores de CaCU.	34
4.4.6.1 Diseño de Ion Ampliseq Custom Target Selection Technology.	34
4.4.6.2 Construcción de la librería.	35
4.4.6.3 Cuantificación de las librerías amplificadas con el Bioanalizador de Agilent 2100.	41
4.4.6.4 Purificación de la librería amplificada.	41
4.4.6.5. PCR en emulsión.	45
4.4.6.6 Dilución de la librería.	46
4.4.6.7 Secuenciación en el equipo PGM de Ion Torrent.	51



4.4.7. Análisis de secuencias.	57
--------------------------------	----

## CAPÍTULO V: RESULTADOS

5.1 Selección de muestras.	59
5.2 Biobanco de ADN de tumores.	65
5.3 Control de calidad del biobanco de ADN.	65
5.3.1 Cuantificación del ADN.	65
5.3.2 Determinación de calidad del ADN extraído.	65
5.3.3 Integridad.	65
5.3.4 Control de amplificación del ADN por medio de PCR.	66
5.4 Genotipificación de las muestras.	67
5.4.1 Estandarización de la PCR para amplificar la región L1 del VPH y visualización de los productos de PCR con los iniciadores GPs.	67
5.4.2 Secuenciación Sanger.	67
5.4.3 Genotipificación.	68
5.5 Secuenciación de genes candidatos para biomarcadores de CaCU.	69
5.5.1 Diseño de “Ion Ampliseq Custom Target Selection Technology” de Ion Torrent.	69
5.5.2 Construcción de la librería templado para secuenciación masiva.	70
5.5.2.1 Cuantificación de ADN.	70
5.5.2.2 Cuantificación de la librería y su dilución.	72
5.6 Análisis de secuencias.	73

## CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

6.1 Discusión.	77
----------------	----

## CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

7.1 Conclusiones.	83
-------------------	----

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Mecanismo de infección del VPH.	11
Figura 2. Genes postulados como posibles biomarcadores y su frecuencia de mutaciones en las muestras.	21
Figura 3. Estrategia general.	28
Figura 4. Frecuencia del estado de procedencia de las pacientes de origen de los tumores analizados.	60
Figura 5. Frecuencia del estadio de las muestras.	61
Figura 6. Edad de inicio de vida sexual activa.	62
Figura 7. Frecuencia del número de parejas sexuales que las pacientes mencionaron haber tenido.	62
Figura 8. Factores de riesgo para la progresión a CaCU.	64
Figura 9. Integridad del ADN extraído.	66
Figura 10. Capacidad de amplificación del ADN de las muestras.	66
Figura 11. Producto amplificado de 150 pb de la región L1 del VPH.	67
Figura 12. Electroferograma de una secuencia de una muestra positiva para el VPH.	68
Figura 13. Frecuencia del tipo de VPH presente en las muestras tumorales.	69
Figura 14. Control de calidad de las librerías amplificadas.	73
Figura 15. Frecuencia de mutaciones de los genes candidatos a biomarcadores en las muestras.	75

## LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1: Condiciones de la reacción de PCR amplificar la región L1 del VPH empleando los iniciadores GP5+ y GP6+.	31
Cuadro 2: Programa para amplificar la región L1 del VPH.	32
Cuadro 3. Mezcla de reactivos para la amplificación de los genes blanco.	35
Cuadro 4: Condiciones de amplificación de la librería.	35
Cuadro 5. Número de ciclos para la amplificación de la librería de acuerdo al número de iniciadores que conforman al pool.	36
Cuadro 6. Condiciones para la digestión parcial de las secuencias de los iniciadores.	37
Cuadro 7. Ejemplo de mix de código de barras con adaptador para 4 reacciones.	37
Cuadro 8. Mezcla de componentes para realizar la reacción de ligación.	38
Cuadro 9. Condiciones para realizar la reacción de ligación.	38
Cuadro 10. Condiciones para la cuantificación por qPCR.	40
Cuadro 11. Condiciones para la amplificación de la librería.	41
Cuadro 12. Orden de adición de reactivos.	47
Cuadro 13. Orden de adición de reactivos.	47
Cuadro 14. Orden de adición de reactivos.	49
Cuadro 15. Orden de reactivos en la tira de microtubos.	50
Cuadro 16. Selección en cada campo del equipo de secuenciación.	52
Cuadro 17. Datos epidemiológicos de las pacientes incluidas en el estudio.	59
Cuadro 18. Diseño del panel de genes a secuenciar.	70
Cuadro 19. Cuantificaciones obtenidas por RNase P.	71

## ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIS	Adenocarcinoma endocervical <i>in situ</i>
ASC-H	Células escamosas atípicas Células escamosas atípicas de significado
ASC-US	indeterminado
CaCU	Cáncer cervicouterino
CIN	Neoplasia Intraepitelial Cervical
FFPE	Formalin Fixed Parafin Embebed
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
H2C	Captura de híbridos
HHV-6	Virus del herpes humano
ICC	Cáncer Cervical Invasivo
ISP	Ion Sphere Particles
IVSA	Inicio de vida sexual activa
L	Litros
LEEP	Loop electrosurgical excision procedure
LIEAG	Lesión Intraepitelial de Alto Grado
LIEBG	Lesión Intraepitelial de Bajo Grado
mg	microgramos
mL	mililitros
ng	nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pM	picomoles por litro
pmol	picomoles
SCC	Squamous cell carcinoma
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del Papiloma Humano
VPH-AR	Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo
VPH-BR	Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo
μl	microlitros

## RESUMEN.

Q.F.B. Mariel Araceli Oyervides Muñoz      Fecha de Graduación: Enero, 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Título del Estudio: “**VALIDACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES GÉNICOS PARA CÁNCER CERVICOUTERINO**”.

Número de páginas: 93

**Introducción.** El cáncer cérvicouterino (CaCU) es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres. El virus del papiloma humano (VPH) tipo 16 es el más común. Con la secuenciación del genoma del CaCU se publicó una lista de genes candidatos a biomarcadores. Se requieren validar en nuestra población. **Objetivo.** Validar mutaciones somáticas reveladas por el proyecto genómico del CaCU, en biopsias tumorales de pacientes mexicanas. **Materiales y Métodos.** Se recolectaron 138 muestras de ADN de biopsias de pacientes mexicanas con CaCU. Se realizó la genotipificación del VPH por PCR y secuenciación Sanger. Se secuenciaron los genes candidatos a biomarcadores por Ion Torrent. Las secuencias se analizaron con y se compararon con los reportes de la plataforma de NCBI. **Resultados.** El tipo viral más predominante fue el 16 (56%), seguido del 45 (4%) y 56 (1%). 19 muestras se secuenciaron por Ion Torrent, encontrando mutaciones que producen cambios en la estructura final de la proteína en los genes *EP300*, *HLA-A* y *HLA-B*. **Conclusiones:** El tipo viral predominante fue el 16, lo que coincide con otros reportes. La secuenciación arrojó como candidatos a los genes del sistema mayor de histocompatibilidad *HLA-A* y *HLA-B*, implicados en la presentación de antígenos, lo que pone en evidencia el significado potencial de la sinergia entre la infección por VPH y una respuesta inmune alterada en la patogénesis del CaCU.

---

Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez  
Directora de tesis

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.**

### **1. El cáncer cervicouterino.**

Las células cervicales normales crecen y se dividen formando nuevas células a medida que se requieren. Cuando éstas envejecen o se dañan, mueren y se reemplazan por células nuevas. A veces este proceso se altera de forma que pueden formarse nuevas células cuando no son requeridas, o se multiplican con mayor rapidez; aunado a esto, las células dañadas o viejas no mueren o no se eliminan normalmente por el mecanismo de apoptosis por lo que las células pueden llegar a acumularse formando una masa de tejido que es la que se denomina neoplasia o tumor[1]. El Cáncer cervicouterino (CaCU) es una alteración celular que se manifiesta inicialmente en el cuello del útero a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución en la superficie del cérvix[2]. Las lesiones no tratadas pueden llegar a invadir al cérvix ocasionando cáncer cervical invasivo. El tumor puede invadir más profundamente en el cuello uterino, o las células de éste pueden propagarse al desprenderse del tumor y viajar a través de los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos cercanos, o propagarse a través de los vasos sanguíneos e invadir otros tejidos ocasionando metástasis[3,4].

#### **1.1 Epidemiología del CaCU.**

El CaCU sigue siendo el segundo tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial[5,6], presentándose 500 mil casos nuevos y 250 mil muertes cada año, de acuerdo a las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud en el 2009[7].

En México, la incidencia del CaCU es de 10 por cada 100 mil mujeres de 15 años o más, y existe una tasa de mortalidad de 42 por cada 100 mil mujeres de 60 años o más. Se estima que en el 2008, 10,186 mujeres desarrollaron CaCU y 5,061 murieron por causas de esta enfermedad. Entre los estados con mayor incidencia se encuentra Veracruz, seguido de Coahuila y Oaxaca. De acuerdo a

las estadísticas de la Secretaría de Salud, en el 2011 Nuevo León se encontraba en el lugar número 21, con una incidencia promedio de 6.15 por cada 100 mil mujeres de 15 años o más[8].

## **1.2 Etiología del CaCU.**

Prácticamente el total de los casos de CaCU se asociaron a la infección por el virus del papiloma humano (VPH)[9,10], que es la más común del tracto reproductivo[11]. La mayoría de los adultos se infectan con este virus en algún punto de su vida[12] y se considera que la infección con VPH de alto riesgo es necesario, mas no suficiente para causar CaCU[13].

La infección por el VPH progresa a CaCU en una serie de cuatro pasos: 1) Transmisión del VPH, 2) infección aguda o transitoria de VPH, 3) infección persistente de VPH que lleva cambios precancerosos en las células y por último, 4) cáncer invasivo.

Entre el 70 y 80% de las infecciones por VPH son transitorias[14,15]; es decir que desaparecen sin necesidad de tratamiento, lo cual se ha asociado a la respuesta del huésped por sistema inmunológico[16,17]. Mientras que del 20 al 30% son infecciones persistentes y del 1 al 2% de éstas progresan a CaCU[18]. Ésta persistencia se determina cuando una paciente resulta positiva en las pruebas de detección de VPH en dos o más ocasiones. Sin embargo, esto varía dependiendo del intervalo de tiempo entre las pruebas.

Resulta problemático distinguir entre las infecciones persistentes y transitorias debido a la naturaleza del mecanismo de infección del virus, ya que es imposible deducir el tiempo de infección de la paciente antes de la toma de muestra. En algunos estudios se considera infección persistente la que es padecida por lo menos durante 6 meses. Sin embargo entre más cortos sean los intervalos de tiempo de las pruebas es más probable que la infección sea definida como persistente[19,20].

Las anomalías en el epitelio del cérvix son evidentes al poco tiempo de la primera detección del VPH, aunque hace falta determinar si las infecciones persistentes se caracterizan por la continua detección del VPH, o por el estadio

latente durante el cual el virus permanece indetectable. Sin embargo, una mujer no puede ser diagnosticada con una infección persistente sólo por resultados positivos en dos ocasiones en tiempos diferentes, ni clasificarse como alto riesgo para padecer CaCU. Una mujer que sea positiva para la presencia de un tipo de VPH específico, no necesariamente puede considerarse que se ha liberado de la infección cuando sus resultados sean negativos para el mismo tipo específico[21].

Existen más de 100 tipos de VPHs, de los cuales más de 40 pueden ser transmitidos sexualmente. Entre estos últimos se han identificado cerca de 15 tipos que son necesarios pero no suficientes para causar CaCU[22], los cuales son llamados de alto riesgo (HPV-AR)[23]. Otros VPHs conocidos como de bajo riesgo (HPV-BR) causan verrugas genitales externas que no son cancerosas[24]. Normalmente las lesiones aparecen alrededor de los genitales o en la zona anal (conocidas también como condilomas acumulados) las cuales suelen aparecer varias semanas después del contacto sexual con una persona infectada con VPH, o es posible que se tarden varios meses o años en aparecer, o que nunca aparezcan. Estas lesiones son causadas comúnmente por los tipos de VPH 6 y 11[24,25].

Los tipos 16 y 18 se han asociado a cerca del 70% de los casos de CaCU a nivel mundial[26], siendo el más frecuente el VPH 16, sin encontrarse diferencias significativas entre los distintos grados de lesión. El VPH 18 varía un poco entre citologías normales y cáncer invasivo, ya que en éste último se ha reportado que aumenta la prevalencia hasta un 15%. El VPH 45 se encuentra como el tercero más frecuente en CaCU invasivo[27]. Algunos otros HPV-AR frecuentemente encontrados en este tipo de CaCU son: 31, 33, 35, 52 y 58; mientras que los tipos menos frecuentes son: 39, 51, 56, 59 y 68[27].

Se han encontrado variaciones en la prevalencia de los tipos virales en México, siendo en la región central y sur de México donde los tipos 16 y 18 resultan los más prevalentes[28]. En cambio, en la región oeste los tipos virales más prevalentes son 16 y 58, en un porcentaje cercano al 90%. En pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) (Ver clasificación del CaCU



página 8) el VPH 58 es el segundo más prevalente seguido de los VPHs 18 y 31[29]. Estas variaciones deberían considerarse en el esquema de inmunización que se ha introducido en el país.

### **1.3 Síntomas.**

El CaCU en etapas iniciales generalmente no causa síntomas. Cuando el cáncer evoluciona, las mujeres pueden notar sangrados vaginales anormales como: sangrados entre los periodos menstruales regulares, después de tener relaciones sexuales, de un lavado vaginal o examen pélvico; periodos menstruales más prolongados y más abundantes que antes, o sangrados después de la menopausia. En algunas ocasiones se observan cambios como mayor secreción vaginal, dolor en la pelvis o dolor durante las relaciones sexuales[30]. Estos síntomas no sólo son causados por el CaCU, sino por otros problemas como las infecciones pueden causar estos síntomas[31].

### **1.4 Diagnóstico y detección del CaCU.**

Para el diagnóstico del CaCU la prueba estándar de oro es el Papanicolaou. Los exámenes selectivos de detección de CaCU incluyen dos tipos de pruebas de detección: la prueba citológica Papanicolaou o frotis de Papanicolaou y la prueba de detección del VPH[32,33].

Existen dos métodos: En el primero se realiza un raspado cervical con un cepillo y éste se frota sobre una laminilla, se fija con un spray y se tiñe para observar la citología. En el segundo, denominado citología en base líquida, se realiza la toma cervical de células cervicales con un cepillo cónico y éste se coloca en una solución conservadora, que posteriormente se centrifuga para eliminar “excipientes” que pudieran intervenir con la visualización de las células, como el moco cervical, la sangre, entre otros. Después de ambos procesos se observa en busca de células anormales, precancerosas y/o cancerosas. Cuando se observan éstas en el Papanicolaou, se procede a realizar una colposcopia para observar el tracto uterino en busca de anomalías en el cérvix[34-38]. Por ello se realiza una tinción con lugol y ácido acético para

revelar posibles lesiones intraepiteliales, ya que éstas se tiñen de color blanco. A partir de las lesiones se realiza una biopsia para observar y clasificar la lesión en LIEBG (lesión intraepitelial de bajo grado), LIEAG o en su caso el estadio de la neoplasia[35,38,39].

El propósito de la prueba de Papanicolaou es examinar las células cervicales para detectar células anormales que pueden convertirse en cáncer si no son tratadas. Esta misma prueba puede detectar estados no cancerosos, como infecciones e inflamación, así como células cancerosas. Para la obtención de las células se requiere hacer un examen pélvico, el cual permite observar la parte superior de la vagina y del cérvix. Las células se toman con un raspador de madera o de plástico o con un cepillo cervical y se preparan luego para el análisis en una de dos formas. En una prueba convencional de Papanicolaou, la muestra o frotis se pone en un portaobjetos de vidrio para microscopio y se añade un fijador. En una prueba de Papanicolaou citología líquida automatizada, las células del cérvix colectadas con un cepillo o con otro instrumento se colocan en un frasco que contiene líquido de conservación. Luego el portaobjetos o el frasco se analiza por un especialista en patología para dar el diagnóstico[40].

La prueba de citología líquida ofrece la ventaja de que la muestra de células puede ser analizada también para la presencia de tipos de VPH-AR en una prueba conjunta de Papanicolaou y de detección del genoma del VPH. Además de que se reduce la probabilidad de que una muestra no sea satisfactoria, ya que tras su filtración a través de una membrana, retiene a las células cervicales con la finalidad de impregnarlas como una monocapa en una laminilla. Un frotis de Papanicolaou logra reunir entre 600,000 y 1.2 millones de células epiteliales cervicales y menos del 20% se transfieren al portaobjeto, además de que es aleatorio y sujeto a error si las células anormales no se distribuyen de forma homogénea por toda la muestra. Otra variable es la preparación del frotis, ya que la muestra debe fijarse rápido para evitar desecación y la degeneración de las células, además debe extenderse de manera uniforme en toda la superficie del portaobjeto. Otro de los problemas es la presencia de sangre y células

inflamatorias que compiten por el área de superficie del portaobjeto, llegando a ocultar células epiteliales. La técnica del frotis en base líquida resuelve estos cinco problemas del Papanicolaou convencional: 1) Captura de la totalidad de la muestra, 2) Fijación deficiente, 3) Distribución aleatoria de células anormales, 4) interferencia por elementos perturbadores (como moco vaginal, sangre, células inflamatorias, etc) y 5) Calidad del frotis[41].

Las pruebas de detección del VPH buscan el ADN viral de diferentes VPH-AR en las células del cérvix y pueden detectar la presencia de una infección viral antes que alguna anomalía de las células se haga visible. Existen diferentes tipos de pruebas, siendo la más común la captura de híbridos, la cual detecta el ADN de los tipos de VPH de alto riesgo; sin embargo no puede identificar el tipo o los tipos específicos que están presentes. Existen otras pruebas específicas para detectar el ADN de los tipos de VPH 16 y 18, que son los que causan la mayoría de los cánceres relacionados con VPH, como el uso de sondas de tiempo real, que amplifican diferentes regiones del genoma del VPH para distinguir entre los tipos[42,43].

En marzo del 2012, la Brigada de Servicios Preventivos de los Estados Unidos (United States Preventive Services Task Force) junto con la Sociedad Americana contra el Cáncer, la Sociedad Estadounidense de Colposcopia y Patología Cervical (American Society for Clinical Pathology) publicaron pautas actualizadas respecto a los exámenes selectivos de detección[2]. Estas pautas recomiendan que la mujer se haga su primera prueba de Papanicolaou a los 21 años de edad. Aunque en las pautas anteriores se recomendaba realizar la prueba tres años después de su primera relación sexual, ahora se recomienda a los 21 años de edad porque las adolescentes tienen un riesgo muy bajo de padecer CaCU y una alta probabilidad de que las células anormales del cérvix desaparezcan por sí solas. Según las pautas actualizadas, las mujeres de 21 a 29 años de edad se deberán hacer una prueba de Papanicolaou cada tres años. Las mujeres de 30 a 65 años de edad pueden hacerse exámenes selectivos de detección cada cinco años con una prueba conjunta de

Papanicolaou y de VPH o cada tres años con una prueba de Papanicolaou solamente.

Estas pautas aconsejan que la prueba conjunta de Papanicolaou y de VPH de rutina se limite a mujeres de 30 años en adelante dado que las infecciones pasajeras por VPH son muy comunes entre las mujeres de veinte a veintinueve años. La inclusión de la prueba de detección de VPH de rutina en los exámenes selectivos de detección de CaCU en mujeres más jóvenes detectaría muchas infecciones que serán suprimidas por el sistema inmunitario y que no resultarían en cáncer. En mujeres mayores, las infecciones por VPH tienen mayor probabilidad de presentar infecciones persistentes, las cuales tienen el potencial de convertirse en CaCU si no son detectadas y tratadas. Sin embargo, la prueba del VPH puede ser utilizada para ayudar a esclarecer resultados de la prueba de Papanicolaou que no sean claros y ayudar a los médicos a decidir si es necesario hacer más evaluaciones.

Las mujeres con ciertos factores de riesgo, pueden necesitar hacerse exámenes más selectivos de detección con más frecuencia o continuar haciéndose esos exámenes incluso después de los 65 años de edad. Estos factores de riesgo incluyen tener infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), tener inmunosupresión, haber estado expuesta al dietilestilbestrol antes de nacer y haber sido tratada por lesiones precancerosas del cérvix o por CaCU. Aquellas mujeres que han tenido histerectomía (cirugía de extirpación del útero y cérvix) no necesitan hacerse exámenes selectivos de detección de CaCU, a menos que la cirugía se haya realizado para tratar una lesión precancerosa o CaCU[27,44,45].

La combinación de la prueba de Papanicolaou con la de detección del VPH tiene menor probabilidad de fallar en detectar una anomalía (índice más bajo de falsos negativos) que utilizando sólo la prueba de Papanicolaou. Además se puede mejorar también la detección de anomalías de las células glandulares, incluso el adenocarcinoma de cérvix. Las células glandulares son células que producen mucosidad que se encuentra en el canal endocervical o en el revestimiento del útero. Las anomalías en las células glandulares y el

adenocarcinoma de cérvix son mucho menos comunes que las anomalías en las células escamosas y el carcinoma de células escamosas[46].

Actualmente el diagnóstico del CaCU por la Secretaría de Salud en Nuevo León se realiza mediante una citología en las mujeres de 25 a 35 años. En caso de observar anormalidades se prosigue a realizar una colposcopia para observar el estado de la lesión cervical; mientras que a las mujeres mayores de 35 años se les realiza la prueba de captura de híbridos (H2C), la cual detecta VPHs de alto riesgo. En caso de positividad para H2C se realiza una colposcopia para observar la citología y/o estado de la lesión cervical presente o clasificación del estadio de CaCU.

De acuerdo al lugar donde se encuentre localizado el CaCU se denomina Adenocarcinoma si se encuentra en el endocérvix o Carcinoma de Células Escamosas si se encuentra en el exocervix[47].

### **1.5 Clasificación del CaCU.**

Para clasificar al CaCU se emplea la clasificación 1) FIGO de acuerdo a su localización, 2) TNM que toma como fuente el tamaño del tumor, invasión a nódulos linfáticos y si hay o no presencia de metástasis. Y por último la clasificación 3) Bethesda.

En la clasificación FIGO se determina la etapa o estadio donde se encuentra el cáncer. Estos son los estadios del cáncer invasor:

- Estadio I: Las células cancerosas sólo se encuentran en el cérvix.
- Estadio II: El tumor crece a través del cérvix e invade la parte superior de la vagina. Puede haber invadido otros tejidos cercanos, pero no la pared pélvica o la parte inferior de la vagina.
- Estadio III: El tumor ha invadido la pared pélvica o la parte superior de la vagina. Si el tumor es lo suficientemente grande para obstruir uno o ambos uréter, los resultados de laboratorio pueden indicar que los riñones no están trabajando debidamente.

- Estadio IV: El tumor invade la vejiga o el recto, o el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como los pulmones.

La terminología para reportar el espectro de anomalías en las citologías cervicales se deriva del sistema Bethesda y se categoriza en niveles incrementados de severidad de la neoplasia cervical intraepitelial (CIN) en CIN1, CIN2 y CIN3. La progresión de CIN a cáncer cervical invasivo (ICC) es lenta, y la regresión de CIN es alta[48].

Clasificación Bethesda de las anomalías celulares.

Este sistema clasifica por separado las anomalías de las células escamosas y de las células glandulares.

#### 1. Células escamosas

Las células escamosas atípicas (atypical squamous cells, ACS), son el resultado anormal más común en las pruebas de Papanicolau. El sistema Bethesda divide esta categoría en dos grupos:

- ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US). En esta clasificación las células escamosas parecen ligeramente normales sin una causa específica aparente. En algunas ocasiones estos cambios pueden estar relacionados con una infección por VPH, pero pueden ser causados también por otros factores. Para clarificar estos casos, se puede analizar una muestra de células en busca de tipos de VPH-AR. En caso de encontrarse alguno presente, se realizan pruebas de seguimiento. En caso de ser negativo para VPH se puede tener certeza de que no hay cáncer o un estado precanceroso.
- ASC-H: las células escamosas atípicas (atypical squamous cells), no pueden excluir una lesión intraepitelial escamosa de alto grado. Las células no parecen normales, y se desconoce el significado de los cambios celulares. Es posible que exista un riesgo mayor de que las ASC-H sean precancerosas en comparación con las lesiones ASC-US.

Las LIEBG en la capa de las células de la superficie del cérvix se consideran anomalías leves causadas por una infección por VPH, donde se han observado los primeros cambios en el tamaño y en la forma de las células. Las LSIL suelen clasificarse como displasias leves, o como neoplasias intraepiteliales de cérvix (CIN-1, cervical intraepithelial neoplasia)[49].

Las LIEAG, son anomalías más graves que tienen una probabilidad mayor de que se conviertan en cáncer si no son tratadas. Se presentan cambios más marcados en el tamaño y en la forma de las células anormales (precancerosas) y las células se ven muy diferentes a las células normales. Las HSIL comprenden lesiones con displasia moderada o grave y carcinoma in situ (CIS). Se clasifican como CIN-2, CIN-3 o CIN-2/3. El CIS normalmente se incluye en la categoría CIN-3[49].

El carcinoma de células escamosas (squamous cell carcinoma, SCC), es el cáncer de cérvix. En esta etapa las células escamosas anormales han invadido más profundamente el cérvix, así como otros tejidos u órganos[49].

## 2. Células glandulares.

Las anomalías de las células glandulares se dividen en las siguientes categorías:

- Células glandulares atípicas (atypical glandular cells, AGC). Las células no parecen normales y se desconoce el significado de los cambios celulares.
- Adenocarcinoma endocervical in situ (endocervical adenocarcinoma in situ, AIS). Las células precancerosas se encuentran solamente en el tejido glandular del cérvix. El adenocarcinoma incluye al cáncer endometrial, como también al cáncer extrauterino.

## 1.6 Mecanismo de infección del VPH.

El mecanismo por el que el VPH infecta a las células, es a través de lesiones en el epitelio. El virus llega a la capa basal, donde las partículas virales se replican ocasionando lesiones de bajo y alto grado, que pueden progresar a CaCU (Figura 1).

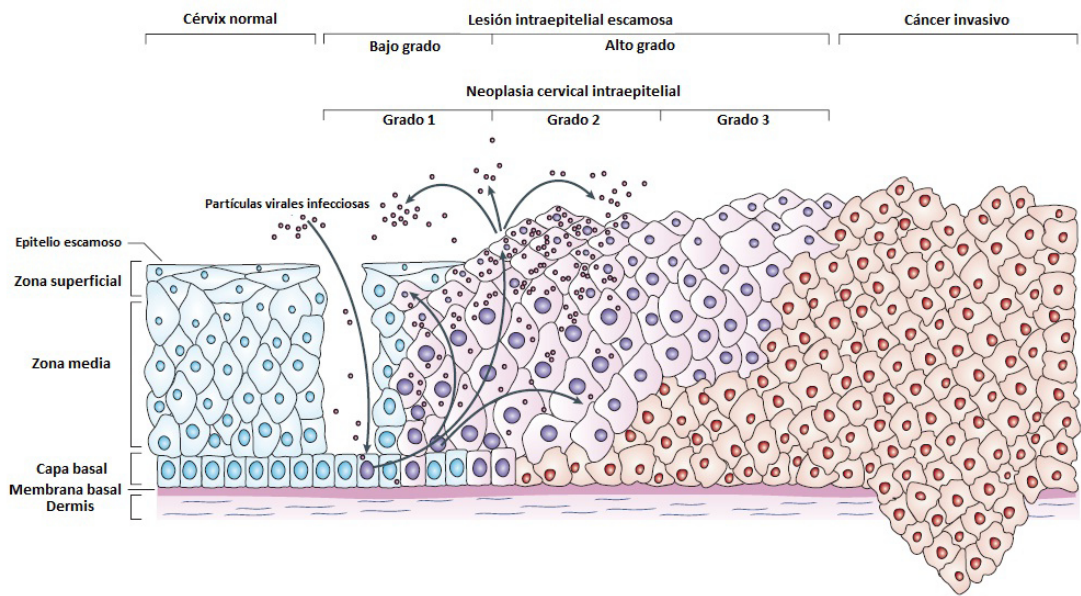


Figura 1. Mecanismo de infección del VPH. Imagen comparativa de los diferentes grados de lesión hasta llegar a cáncer invasivo, donde se observa la replicación de las partículas virales en la zona media del epitelio escamoso.

El genoma del VPH está formado por una cadena doble de ADN de 8,000 pb que posee ocho genes clasificados en E o L, de acuerdo a su expresión en la etapa temprana (E) o tardía (L) de la diferenciación del epitelio. E1, E2, E5, E6 y E7 se expresan tempranamente en la diferenciación, E4 se expresa durante todo el ciclo, mientras que L1 y L2 se expresan en las etapas finales de la diferenciación, produciendo las proteínas estructurales. El virus se mantiene en la capa basal del epitelio, donde se expresan las proteínas tempranas en bajos niveles para el mantenimiento del genoma (lo que puede aumentar la posibilidad de un estado latente) y la proliferación celular[50]. Cuando las células del epitelio comienzan a diferenciarse, se libera el virus, se expresan los genes tempranos, seguidos de los tardíos, incluyendo L1 y L2 que ensamblan la



cápside viral; el ADN viral se integra en el genoma de la célula huésped, linearizándose para integrarse, después de los genes E6 y E7, a menudo en la región E1 o E2; esta ruptura del gen E2, produce la desregulación de la síntesis de las proteínas de los oncogenes E6 y E7, cuyos productos inhiben la función de los genes supresores de tumores p53 y pRb, que regulan el ciclo celular, lo que lleva al aumento de la actividad mitótica, la proliferación celular descontrolada y consecuentemente al desarrollo del CaCU[21,51].

### **1.7 Factores de riesgo.**

La infección y/o persistencia de VPH se ha asociado a diversos factores epidemiológicos y ambientales, entre los que destacan la edad de inicio de la vida sexual activa (IVSA)[24,52,53], la historia del compañero sexual, múltiples parejas sexuales, los antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, coinfecciones con otros virus o agentes transmitidos sexualmente, un nivel socioeconómico bajo[54], el uso de anticonceptivos orales[26,55] y el tabaquismo[56]. El riesgo aumenta con el número de parejas sexuales y la edad. La coinfección con otros agentes de transmisión sexual, como *Chlamydia trachomatis*[24,57] y otros virus como el del herpes simplex, se han asociado con el riesgo de infección por VPH. Además existe una fuerte asociación entre la infección por VPH y el riesgo de adquirir VIH[58].

También se han reportado coinfecciones con el virus del herpes humano 6 (HHV-6). A pesar de que la oncogenicidad no está firmemente establecida, existen estudios donde se ha demostrado que el polipéptido resultante de marco de lectura abierto -1 (ORF-1) del HHV-6, puede unirse e inactivar al gen p53 e impedir la supresión de tumores. También el HHV-6 puede unirse y desregular miembros del complejo de proteínas NF-κB (factor nuclear kappa B), que tienen funciones relevantes en el desarrollo del cáncer, como la regulación de la inflamación y las vías apoptóticas[59]. Ratones inoculados con células de CaCU coinfectadas con VPH y HHV-6 desarrollaron tumores en la mitad de tiempo que los ratones controles inoculados con células de CaCU infectadas sólo con VPH (3 contra 6 semanas)[59].

Otros de los factores de riesgo para la infección por el VPH que puede conducir a CaCU, son el inicio temprano de vida sexual activa (IVSA), así como mujeres con múltiples parejas sexuales (3 o más). Estas últimas tienen 3.6 veces más riesgo de infectarse con este virus en comparación con aquellas mujeres que tienen sólo un compañero sexual[60].

Las mujeres previamente tratadas contra alguna lesión (CIN o CIN3) tienen 2 a 3 veces mayor riesgo de padecer CaCU en un futuro, pero no se aumenta el riesgo de morir por esta enfermedad[45].

### **1.8 Vacunas contra VPH.**

Actualmente existen dos vacunas profilácticas aprobadas para la prevención de la infección por VPH. La tetravalente (Gardasil), que protege contra los VPHs 16,18, 6 y 11, que son los tipos oncogénicos más comunes a nivel mundial (16 y 18) y los tipos no oncogénicos pero asociados a verrugas genitales (6 y 11), responsables del 70% de los casos de CaCU y del 90% de verrugas genitales respectivamente. La vacuna bivalente (Cervarix) protege contra los VPH oncogénicos 16 y 18[61].

Estas vacunas utilizan la proteína estructural L1 presente en los diferentes tipos de VPH como un antígeno blanco en una partícula tipo virus (Virus Like Particle o VLP), la cual no puede infectar a las personas vacunadas, ya que no posee el genoma del VPH, pero se comporta como una partícula viral, lo que permite la inducción de anticuerpos contra la proteína L1, que es un componente de la VLP. También están en desarrollo nuevas vacunas a base de las proteínas estructurales, las cuales ya se están probando en animales[62,63].

### **1.9 Tratamiento para el CaCU.**

En caso de encontrarse anomalías graves, como lesiones persistentes y/o de alto grado, es necesario un tratamiento adicional. Sin tratamiento estas células pueden convertirse en cáncer. Entre las opciones de tratamiento se encuentran:

- El procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa (loop electrosurgical excision procedure, LEEP). Es una cirugía en la que se usa un asa de alambre delgado que corta tejido por la que pasa una corriente eléctrica para usarse como bisturí para cortar tejido.
- Crioterapia. Destruye el tejido anormal mediante congelación.
- Terapia con láser. Emplea un rayo estrecho de luz intensa para destruir o extirpar las células anormales.
- Conización. Se extraen trozos de tejido en forma de cono mediante el uso de un bisturí, un láser o el procedimiento LEEP.

Las opciones de tratamiento para mujeres con CaCU son la cirugía, radioterapia, quimioterapia o la combinación de métodos. Pero la selección del tratamiento depende principalmente del tamaño del tumor y de si el cáncer se ha diseminado. También depende de la edad y de si la paciente desea embarazarse en un futuro.

### **1.9.1 Cirugía.**

Esta es una opción para las mujeres que se encuentren en el estadio I o II de CaCU. Si el tumor es pequeño el tipo de cirugía depende de si la paciente quiere embarazarse y tener hijos a futuro, para estos casos es común una cervicectomía radical, en la cual se extirpa solamente el cérvix, parte de la vagina y los ganglios linfáticos en la pelvis[64].

Otra opción de cirugía es la histerectomía completa, donde se extirpa el cérvix y el útero; también puede extirparse parte del tejido cercano al cérvix, parte de la vagina, las trompas de Falopio o los ovarios, e incluso los ganglios linfáticos cercanos al tumor. Sin embargo con este tipo de cirugía la paciente ya no puede embarazarse y la menopausia aparecerá de inmediato[64].

### **1.9.2 Radioterapia.**

Utiliza rayos de alta energía para destruir las células cancerosas. Es una opción para pacientes en cualquier estadio de CaCU. En pacientes con CaCU inicial se

puede utilizar este tratamiento en lugar de cirugía, o puede utilizarse después de cirugía para destruir cualquier célula cancerosa que pudiera haber quedado en el área. Las pacientes con estadios avanzados donde el cáncer se extiende más allá del cérvix, pueden recibir radioterapia y quimioterapia[65].

Existen dos tipos de radioterapia para el CaCU. En algunos casos es necesario utilizar ambos:

- Radioterapia externa: La radiación es dirigida hacia la pelvis u otras zonas con cáncer.
- Radioterapia interna (también conocida como braquiterapia o curiterapia): El tratamiento radioterapéutico donde isótopos radioactivos se colocan dentro o cerca de la zona del tumor. Se colocan en un cilindro delgado dentro de la vagina.

### **1.9.3 Quimioterapia.**

Generalmente se combina con la radioterapia para el tratamiento del CaCU. Cuando éste se ha diseminado a otros órganos, ésta puede emplearse sola[66]. Entre los más comunes se encuentran: Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel o Taxol, Topotecán, Gemcitabina o Gemzar, Docetaxel o Taxotere, Ifosfamida o Ifex, 5-fluorouracilo (5-FU), irinotecán o Camptosar y Mitomicina.

### **1.10 Tratamiento para la infección por VPH.**

No existe actualmente un tratamiento médico para las infecciones por el VPH. Las lesiones cervicales y las verrugas que pueden resultar de dichas infecciones se pueden tratar por los métodos comúnmente usados para tratar las lesiones cervicales mencionados anteriormente. Además, pueden administrarse algunos medicamentos para tratar las verrugas como Imiquimod (Aldara), Podofilina y podofilox (Condylox) que son modificadores del sistema inmune [67,68].

### **1.11 Genotipificación de VPH.**

La genotipificación del VPH es importante para los estudios epidemiológicos mundiales que evalúan las infecciones por este virus, e incluso ayuda a establecer relaciones entre los tipos de VPH con las lesiones que producen[50]. Las pruebas para detección del VPH basadas en el ADN viral, como lo son la H2C o la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), son las más utilizadas actualmente. Donde en la H2C se realiza un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con una señal de amplificación utilizando quimioluminiscencia para la detección cualitativa de 13 VPHs de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Sin embargo, esta prueba no determina qué tipo o tipos virales están presentes en la muestra.

La PCR se emplea para amplificar la región L1 de los VPHs, ya que esta región es la más conservada entre los distintos tipos virales. Existen pruebas para genotipificar los VPHs en una muestra en base a diferenciar la región L1 de los distintos tipos virales. Una muy popular utiliza tiras para hibridación reversa con sondas que pueden distinguir entre los tipos virales además de detectar coinfecciones. Los diferentes estuches comerciales para genotipificación varían en los iniciadores utilizados para amplificar la región L1. Entre dichos estuches comerciales se encuentra el Linear Array Genotyping Test de Roche®, el cual utiliza los iniciadores MY 09/11 para obtener un producto de 450 pb que al hibridarse en la tira discrimina 37 genotipos (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 y CP6108). Otro estuche de genotipificación de VPH es el SPF<sub>10</sub>-INNO LiPA HPV Genotyping Test que amplifica un fragmento de 65 pb en el que se pueden genotipificar 25 diferentes VPHs. Se han realizado estudios de comparación que concluyen que ambos estuches son altamente congruentes para detectar los genotipos de VPHs y altamente comparables en las metodologías[69]. Existen además estuches de genotipificación basados en la hibridación en chips de ADN y otros que emplean sondas TaqMan dirigidas a tipos específicos de VPHs[32,70].

La genotipificación puede realizarse tanto en muestras citológicas como en biopsias de tejido embebido en parafina (FFPE), la desventaja del uso de este último en comparación con el ADN proveniente de tejidos frescos o muestras citológicas es que el ADN se degrada por el proceso de fijación con formalina, la deshidratación de los tejidos por los alcoholes utilizados, entre otros, lo que puede resultar en que se pierda la detección de algunos tipos virales. Sin embargo hay estudios donde no se reportan diferencias significativas en la detección de los tipos virales entre ambos tipos de muestras[71].

Otros estudios reportan la reamplificación de los productos de PCR mediante el uso de los iniciadores GP5+ y GP6+, los cuales generan un producto amplificado de aproximadamente 150 pb. El uso de estos iniciadores aumenta de 10 a 100 veces más la sensibilidad, sobre todo al observar los productos en geles[72]. Una vez obtenidos los PA se procesan por secuenciación Sanger para identificar los genotipos.

### **1.12 Cambios genéticos en la progresión a CaCU.**

Es importante la búsqueda de biomarcadores para el CaCU ya que actualmente se desconocen los factores involucrados en la progresión de infecciones de VPH persistentes a CaCU. Los biomarcadores son indicadores de un estado biológico y pueden servir como nuevos blancos terapéuticos, para un monitoreo personalizado y/o una detección oportuna. Estos pueden encontrarse por medio de diferentes técnicas y actualmente una de ellas es la secuenciación masiva, la cual nos proporciona diferentes ventajas como: 1) alta sensibilidad, ya que puede revelar mutaciones de una sola célula; 2) un monitoreo de eficacia de tratamiento, 3) mejorar la comprensión de los cambios genéticos conducentes al cáncer y de sus vías oncogénicas, para distinguir entre mutaciones “conductoras” de las mutaciones “pasajeras”, 4) analizar la relevancia de la heterogenicidad intratumoral y 5) la identificación de nuevos blancos terapéuticos, así como nuevos genes asociados a cáncer, entre otros[73-75].

Los tumores evolucionan de benignos a lesiones malignas acumulando una serie de mutaciones con el tiempo, que han sido estudiadas en diferentes tipos

de cáncer como el de colon. Aquellas mutaciones que confieren una ventaja selectiva de crecimiento para las células tumorales se llaman mutaciones “conductoras”. Las mutaciones “pasajeras” son aquellas que no confieren alguna ventaja selectiva en el crecimiento celular [76].

En la mayoría de las plataformas de secuenciación se utiliza la técnica de PCR para la elaboración de las librerías a secuenciar. Esta técnica es muy adecuada para aumentar el rendimiento y con esto puede detectarse el espectro completo de los cambios genómicos presentes en el cáncer.

### **1.13 Búsqueda de Biomarcadores oncogénicos por medio de secuenciación masiva.**

La secuenciación masiva de nueva generación se ha empleado en numerosos trabajos recientes, y actualmente en la secuenciación completa del genoma de diferentes tipos de cáncer[76]. Esto ha ayudado a confirmar genes asociados al cáncer, así como mutaciones antes no descritas en genes previamente asociados y en genes que no se habían relacionado con este tipo de neoplasias.

En el 2010 Lee y cols., publicaron estudios de secuenciación del genoma de muestras tumorales y normales de pulmón de un paciente con adenocarcinoma, donde se descubrieron mutaciones somáticas en un rango de 17.7 por cada megabase de ADN secuenciado. Se lograron detectar un total de 43 variaciones estructurales y 530 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), incluyendo una en el proto-oncogen de *KRAS* y 391 en otras regiones codificantes. [77].

Otro estudio para identificar nuevos blancos moleculares en carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) de un paciente no fumador y sin antecedentes familiares de cáncer, reveló una nueva fusión de genes entre *KIF5B* y el proto-oncogen *RET* causada por la inversión pericéntrica de 10p11.22-q11.21. Esta fusión sobreexpresa en el receptor tirosin cinasa quimérico de RET induce transformación celular espontáneamente. La misma mutación se encontró en otras dos muestras de 20 adenocarcinomas de pulmón

primarios en un estudio de replicación, sugiriéndose como un blanco molecular para el diagnóstico y tratamiento personalizado de cáncer de pulmón[78].

En el 2011, Stransky y cols., secuenciaron el exoma completo de 74 tumores de pacientes con cáncer de pulmón pareados con su tejido normal. El perfil mutacional fue consistente con la exposición a tabaco. Se identificaron genes previamente asociados a esta neoplasia como *TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *PIK3CA* y *HRAS*, además de algunos genes que no se habían implicado anteriormente con esta malignidad. Por lo menos el 30% de los casos mostraron mutaciones en genes reguladores de la diferenciación escamosa como *NOTCH1*, *IRF6* y *TP53*, implicando la desregulación como un conductor de la carcinogénesis. Por lo que los resultados indican la habilidad de la secuenciación para revelar mecanismos tumorigénicos fundamentales[79].

La secuenciación masiva también se empleó para la búsqueda de nuevos mecanismos alterados en el genoma del cáncer de mama. En el trabajo de Stephens y cols., en el 2012 se secuenciaron 100 genomas de tumores para examinar los cambios somáticos en el número de copias y las mutaciones en los exones de los genes codificantes de proteínas. Ellos encontraron correlación entre el número de mutaciones, la edad de diagnóstico del cáncer y el grado histológico, observando también firmas mutacionales múltiples, incluyendo una presente en cerca del 10% de los tumores caracterizados por numerosas mutaciones de citosina en los dinucleótidos TpC. Se identificaron: 1) mutaciones conductoras en genes no descritos en cáncer de mama, como *AKT2*, *ARID1B*, *CASP8*, *CDKN1B*, *MAP3K1*, *MAP3K13*, *NCOR1*, *SMARCD1* y *TBX3*. 2) Mutaciones conductoras en al menos 40 genes y otros 73 genes mutados[80].

En otros trabajos de secuenciación del genoma de diferentes subtipos de cáncer de mama como el de Banerji y cols, se confirmaron mutaciones recurrentes en los genes previamente asociados: *PIK3CA*, *TP53*, *AKT1*, *GATA3* y *MAP3K1*. Además se descubrieron mutaciones en el gen del factor de transcripción CBFβ y deleciones en *RUNX1*. Se identificó también una fusión



entre *MAGI3-AKT3* en tumores triple negativo (con falta de expresión de ERBB2 y los receptores de estrógenos y progesterona)[81].

A la fecha los estudios de secuenciación han identificado 140 genes que cuando se encuentran alterados por mutaciones intragénicas, pueden promover o conducir a la tumorigénesis. Un tumor típico contiene de 2 a 8 de estas mutaciones en genes conductores; mientras que las demás mutaciones remanentes son pasajeras y no confieren ventajas selectivas de crecimiento. Estos genes conductores se clasifican en 12 vías que regulan 3 procesos celulares: envejecimiento celular, sobrevivencia celular y el mantenimiento genómico. Aquellos tumores que poseen más mutaciones que el promedio se les ha relacionado con la exposición a potentes mutágenos como la luz UV y el humo de cigarro, en melanomas y cáncer de pulmón, respectivamente[76].

Por todo lo anterior, se deduce que la identificación de los eventos moleculares que conducen al CaCU es esencial para el desarrollo de pruebas diagnósticas y blancos terapéuticos para mejorar el resultado clínico.

Como antecedente directo de este trabajo, la secuenciación del genoma del CaCU se concluyó en el 2013, por Ojesina *et al*[82]. Esta hazaña se logró por un equipo de investigación internacional liderado por el instituto Broad del MIT y la Universidad de Harvard al que fue invitado nuestro grupo de trabajo y el Instituto Nacional de Medicina Genómica. El proyecto abarcó la secuenciación completa genómica de 14 muestras tumorales pareadas con su muestra normal y la secuenciación del exoma de 118 muestras también pareadas. Además se obtuvieron también los datos de RNAseq. Las muestras fueron provenientes de pacientes de Noruega (n=102) y México (n=16). Se encontraron mutaciones recurrentes en genes previamente asociados a cáncer como *ELF3*, sustituciones en *MAPK1* (7%), en el 9% de las muestras mutaciones inactivadoras en el gen *HLA-B*, mutaciones en *EP300* en el 16% de las muestras, *FBXW7* (14%), *CASP8* (5%) Y *ERBB2* (5%) (Figura 2). Las muestras positivas para VPH mostraron más frecuencia de mutaciones somáticas, en especial en los dinucleótidos Tp\*C, y más variaciones en el número de copias

que en los tumores VPH negativos. Este trabajo arrojó una lista de genes con mayor frecuencia de mutaciones en las muestras, entre ellos el más frecuente fue *PIK3CA*[83], incluyendo genes que no se habían asociado con el CaCU como *FBXW7*, *MAPK1* y *EP300*. El gen *HLA-B* que no había sido asociado con este tipo de neoplasia tipo epitelial. Sin embargo, el número de muestras de pacientes mexicanas fue relativamente bajo, por lo que resultaba pertinente aumentar el número de muestras provenientes de nuestro país y validar si los genes identificados con mayor frecuencia de mutaciones en este estudio internacional se confirmaban mutados en el genoma tumoral de muestras de CaCU de pacientes mexicanas. Esto con el fin de identificar posibles biomarcadores en aras de mejorar el diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de esta enfermedad.

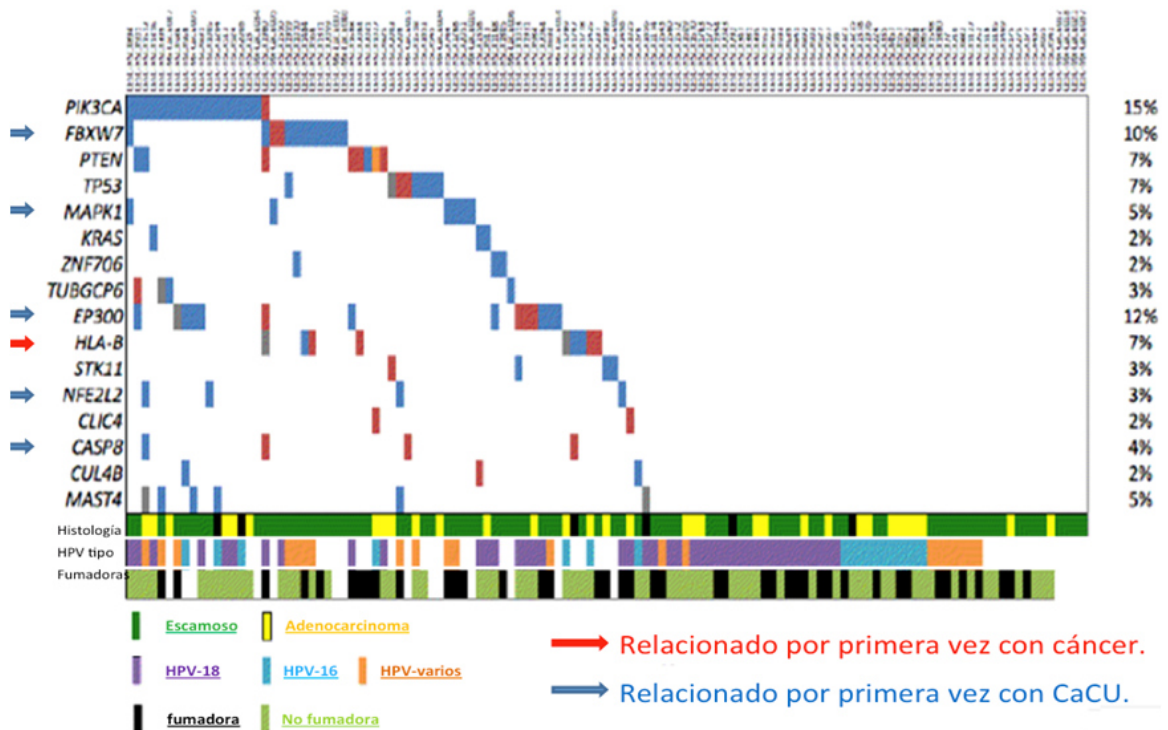


Figura 2. Genes postulados como posibles biomarcadores y su frecuencia de mutaciones en las muestras. Se muestra la clasificación de las muestras por tipo histológico, tipo de VPH y hábito de fumar de las pacientes.

#### **1.14 Secuenciación masiva por medio de la plataforma de Ion Torrent.**

La técnica de secuenciación de Ion Torren es una técnica que elimina la complejidad de la detección óptica de la mayoría de los métodos de secuenciación masiva. En este caso la secuenciación se lleva a cabo con nucleótidos sin modificar, que al incorporarse a la cadena siendo polimerizada se libera un hidrógeno y éste se detecta con un semiconductor. Aunque esta técnica tiene una baja capacidad para secuenciación en paralelo, se utiliza principalmente en segmentos de interés cortos. A pesar de que no esta exenta de errores, es la técnica de secuenciación masiva más rápida y de más bajo costo disponible y su capacidad ha ido incrementando gradualmente[84].

La tecnología de secuenciación masiva de nueva generación tiene el potencial de transformar el entendimiento de la oncogénesis, las técnicas para la investigación en cáncer y su tratamiento. Esta técnica examina los cambios presentes en el genoma del cáncer, pero requiere de una inversión considerable en el procesamiento y la recolección de las muestras, el análisis computacional y la interpretación bioinformática de los resultados. Sin embargo los avances de esta tecnología bajarán los costos de la misma y aumentarán la velocidad y la precisión del proceso, permitiendo su aplicación a especímenes más pequeños y aumentando su accesibilidad para los investigadores.

## **CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN.**

### **2. Justificación.**

Como resultado del proyecto internacional de la secuenciación del genoma del CaCU al que nuestro grupo fue invitado, se ha generado una lista de genes asociado a esta neoplasia.

Resulta necesario investigar estos posibles biomarcadores génicos en un mayor número de muestras de nuestra población, en aras de mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta neoplasia de gran impacto en nuestro país.

## **CAPÍTULO III: OBJETIVOS.**

### **3.1 Objetivo General.**

Validar mutaciones somáticas reveladas por el proyecto genómico de la iniciativa Slim en Medicina Genómica (SIGMA por sus siglas en inglés) del CaCU, en biopsias tumorales de pacientes mexicanas.

### **3.2 Objetivos Específicos.**

1. Generar un biobanco con muestras de tumores cervicouterinos e información demográfica, clínica y epidemiológica de las pacientes del noreste de México diagnosticadas con CaCU.
2. A partir del ADN recuperado de las muestras de los tumores, tipificar el genoma viral presente.
3. Rastrear en el genoma de las células tumorales, mutaciones en los genes identificados como posibles biomarcadores por el proyecto de secuenciación del genoma del CaCU.
4. Asociar las mutaciones génicas (biomarcadores) y el tipo viral encontrados, con las características clínicas y epidemiológicas de las pacientes.

## **CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **4.1 Lugar de realización del estudio e instituciones participantes.**

El desarrollo experimental del proyecto tuvo como sede la Unidad de Biotecnología Médica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Las instituciones participantes cuya colaboración hizo posible este trabajo fueron:

- El Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL.
- El Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) de la Secretaría de Salud del Gobierno Federal.

### **4.2 Material**

#### **4.2.1 Origen de los reactivos**

Los reactivos utilizados para realizar la PCR fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: la enzima DNA polimerasa Taq y el  $MgCl_2$  de Promega Corporation (Madison, WI, EUA) y los dNTPs de GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA.). Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por la compañía IDT Technologies (Coralville, IA, EUA). La extracción de ADN total a partir de tejido embebido en parafina se realizó con el estuche comercial NucleoSpin FFPE DNA extraction de MACHERY-NAGEL Inc. (Bethlem, PA, EUA). La purificación de productos de PCR se llevó a cabo con el reactivo ExoSAP-IT de Affimetrix Inc (Santa Clara, CA, EUA). La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el estuche de ciclo de secuenciación BigDye Terminator v3.1 de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). La purificación de los productos de la PCR del ciclo de secuenciación se llevó a cabo con el estuche de purificación BigDye X Terminator (Foster City, CA, EUA). Las sondas utilizadas para la cuantificación

de las muestras por PCR en tiempo real fueron sondas TaqMan Copy Number Reference Assay, RNase P, y el TaqMan Universal PCR Master Mix de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). La elaboración de las librerías se llevó a cabo con los estuches comerciales 5X Ion Ampliseq HiFi Master Mix, 2X Ion Ampliseq Primer Pool y reactivo FuPa de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). La ligación y purificación de adaptadores se emplearon los estuches Ion P1 Adapter, Ion Xpress Barcode 1-96, Solución Switch, DNA ligase, Agentcourt AMPure XP, Low TE y el Agencourt AMPure Xp Reagent de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). La cuantificación de las librerías amplificadas por el método de Qubit 2.0 Fluorometer se llevó a cabo con los reactivos Qubit dsDNA HS, buffer Qubit dsDNA HS de Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). La cuantificación de las librerías amplificadas con el Agilent Bioanalyzer se llevó a cabo con el estuche High Sensivity de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA). La PCR en emulsión se llevó a cabo con el estuche comercial Ion One Touch 2X Mix, Ion OneTouch Enzyme Mix y Ion OneTouch 200 Ion Sphere Particles de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). La secuenciación se llevó a cabo con los estuches comerciales Ion OneTouch 200 Template Kit y el Ion PGM 200 Sequencing Kit de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA).

#### **4.2.2 Material Biológico.**

Las muestras de los tejidos embebidos en parafina se recolectaron en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eluterio González” de la UANL. Todas las muestras se almacenaron a temperatura ambiente.

#### **4.3 Equipo.**

Para la realización de este trabajo se utilizó el siguiente equipo: microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, fuentes de poder ISCO 494 (ISCO, Nebraska, EUA), EC 600 (E-C Aparatus Corporation, St. Petersburg, Florida) y BRL 250 (Gibco-BRL), una centrífuga Beckman allegra™ 21R,

modelo 367570, un agitador de tubos Barnstead Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, IOWA, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un secuenciador automático Abi 3130 de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Un congelador TSU series 300A de la compañía Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA), un termomixer 5436 (Eppendorf). Para visualizar los geles de agarosa se utilizó el fotodocumentador UVITEC (Cambridge, Reino Unido). Para la cuantificación del ADN y análisis de calidad se utilizó el equipo nano Drop 2000 de la compañía Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA). Los reactivos se almacenaron en un congelador CV 16 marca Torrey (Monterrey, NL, Mex). El termociclador utilizado fue el modelo 9902 Verity Thermal Cycler de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA).

El procesamiento de los datos se realizó en computadoras Apple modelo MacBook Pro 13. Los procesadores de texto utilizados fueron: Microsoft Word for Mac 2011 versión 14.1.0 (Redmon, WA, EUA), procesadores de gráficos Microsoft Power Point para Mac 2011 Versión 14.1.0 (Redmon, WA, EUA), EndNote basic de Web Of Knowledge de Thomson Reuters. Los programas de análisis en Biología Molecular utilizados fueron: Gene coder 4 for Mac de Molecular Biology software, Ion Reporter de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), Oncotator del Broad Institute ([www.broadinstitute.org/oncotator](http://www.broadinstitute.org/oncotator)), el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) y la base de datos de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

#### **4.4 Métodos:**

##### **4.4.1 Estrategia General.**

El protocolo fue sometido al Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con la clave BI11-002 (ANEXO 1). Después de su aprobación se colectaron bloques de biopsias de tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de CaCU, en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, en los que



se marcó la zona tumoral. Se realizó extracción del ADN de las zonas tumorales. A las muestras de ADN se les realizó una PCR para amplificar la región L1 del virus de VPH y estos productos se secuenciaron por la técnica Sanger para la genotipificación del VPH. Con estas mismas muestras de ADN se realizó secuenciación masiva de los genes candidatos a biomarcadores con la plataforma de Ion Torrent. Se realizó el análisis de secuencias en búsqueda de mutaciones con el programa Oncotator, así como una comparación entre datos epidemiológicos y factores de riesgo involucrados en la progresión a CaCU con el programa estadístico SPSS (Figura 3).



Figura 3. Estrategia general.

#### 4.4.2. Selección de muestras.

Las biopsias provinieron del archivo de tejidos tumorales embebidos en parafina provenientes de pacientes con CaCU del Departamento de Anatomía Patológica y Citología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" y eran de pacientes diagnosticadas con CaCU en diferentes estadios entre el

2008 y 2011. La patóloga seleccionó muestras que contaran con un porcentaje de células tumorales igual o mayor al 90%. En cada bloque se marcó la zona tumoral y a partir de esa zona se tomó una muestra con un sacabocados de 2 mm y se colocó en un tubo eppendorff de 1.5 ml. De cada paciente se obtuvieron los datos geográficos y epidemiológicos a partir de los expedientes e historial clínico, así como de datos de interés como factores de riesgo (ANEXO 2).

#### **4.4.3. Extracción de ADN.**

A partir de la muestra tomada de la zona tumoral se realizó la extracción de ADN empleando el estuche NucleoSpin FFPE DNA extraction, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, el cual se describe a continuación:

1. Desparafinización: Se pesaron aproximadamente 15 mg de tejido. Se agregaron 400 µl del reactivo Parafin Dissolver®. Se calentó 3 minutos a 60°C en agitación (1400 rpm). Se agitó de forma mecánica por unos minutos, hasta que se observó que ya no hubiera parafina solidificada. Se dejó enfriar.
2. Lisis de la muestra: Se añadieron 100 µl de buffer de lisis y se agitó por agitación mecánica vigorosamente por 2 minutos. Fue importante la agitación para la lisis y liberación de ácidos nucleicos en este paso. Se centrifugó a 11,000 gravedades (g) por un minuto. Se descartó la fase orgánica (superior). Se agregaron 10 µl de Proteinasa K, se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente (25°C) toda la noche.
3. Reacciones cruzadas: Se añadieron 100 µl del buffer D-Link y se mezcló gentilmente. Se centrifugó la muestra a 11,000 g por 1 minuto. Se incubó a 90°C por 30 minutos.
4. Ajuste de condiciones de unión: Se añadieron 200 µl de etanol a 96° y se mezclaron. Se realizó una centrifugación a 11,000 g por 1 minuto.

5. Unión del ADN: Se tomó la fase acuosa (inferior) ~450  $\mu$ l y se colocó en el tubo con la columna. Se centrifugó a 2,000 g por 1 minuto. Hasta la elución completa del contenido. Se desechó el tubo de recolección.

6. Lavado y secado de la columna: Se añadieron 400  $\mu$ l del Buffer de lavado y se realizó una centrifugación a 11,000 rpm por 30 segundos. Se cambió el tubo de recolección y se repitió el lavado centrifugando por 2 minutos. Se desechó el tubo de recolección.

7. Elución de ADN: Se colocó un microtubo como tubo de recolección. Se añadieron a la columna de 20 a 30  $\mu$ l del Buffer de elución sin tocar la membrana y se centrifugó a 11,000 g por 30 segundos.

#### **4.4.4. Control de calidad de las muestras de ADN.**

1. Cuantificación: Se tomó una alícuota de 1  $\mu$ l de cada ADN y se le midió su absorbancia en el Nanodrop.
2. Determinación de pureza: Se tomó 1  $\mu$ l de la muestra y se evaluó su pureza con los cocientes de absorptividad 260/280 y 260/230 nm. El criterio de aceptación para el cociente 260/280 fue de 1.8-2.0 y para el cociente 260/230 fue de 2.0-2.2.
3. Integridad: Se observó la integridad de la muestra en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.
4. Control de calidad del ADN por medio de PCR: Para comprobar que el ADN extraído fuera amplificable por medio de PCR se emplearon iniciadores que generaban un producto amplificado de 149 pb, correspondientes a un fragmento del gen TNF $\alpha$  humano. Los iniciadores utilizados fueron los siguientes: Fwd AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT y Rv TTGGGGACACAAGCATCAAGG. Los productos se observaron en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio.

#### 4.4.5. Genotipificación de las muestras.

##### 4.4.5.1 Estandarización de la PCR para amplificar la región L1 del VPH.

Debido a la degradación de las muestras por los procesos de parafinización y fijación con formalina, no se les realizó la genotipificación con hibridación reversa en tiras, ya que el producto de amplificación de los PGMYS es de aproximadamente 450 pb. Por lo que se optó emplear el producto genrado con los iniciadores GPs (GP5+ [5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'] GP6+ [5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3']) el cual es de 150 pb aproximadamente. Esta región del VPH se amplificó por medio de una reacción de PCR referida como “touch down” (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1: Condiciones de la reacción de PCR amplificar la region L1 del VPH empleando los iniciadores GP5+ y GP6+.

Reactivos (concentración inicial)	Concentración final	Volumen final
Buffer 10X	1x	3
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4.8 mM	4.2
dNTP's 10 mM	0.2 mM	0.6
GP5+ 10 mM	1 µM	3
GP6+ 10 mM	1 µM	3
Taq Gold 5 U/µl	0.075 U/µl	0.45
DNA	100 ng	---
H <sub>2</sub> O	Llevar a volumen final	---
Vol. Final	30 µl	30 µl

Cuadro 2: Programa para amplificar la región L1 del VPH.

Etapa	Ciclos	Temperatura
Desnaturalización	1	94°C, 1 min
Alineamiento TD	21	50-40°C, 2 min 0.5°C/ ciclo
Alineamiento adicional	29	40°C, 2 min
Extensión		72°C, 1.5 min
Extensión final	1	72°C, 4min

#### **4.4.5.2 Visualización de los productos de PCR de la región L1 del VPH amplificados con los iniciadores GPs y secuenciados por la técnica de Sanger.**

Se observaron los productos amplificados en un gel de agarosa al 2.5%, donde el producto esperado fue de 150 pb. Para realizar la genotipificación viral del VPH se empleó el método de Sanger para secuenciar los productos de PCR obtenidos por los primers GPs. Los productos de PCR se purificaron con ExoSAP-IT de Affimetrix (Exonucleasa y Fosfatasa alcalina en buffer) donde la Exonucleasa I degrada los residuos de los iniciadores de cadena sencilla residuales y cualquier cadena de sencilla de ADN extraña producida por la PCR, mientras que la Fosfatasa Alcalina hidroliza los dNTPs no consumidos y los primers que pudieran haber quedado dentro de la reacción y que pudiera intervenir con el proceso de secuenciación. Se agregaron 3 µl de ExoSAP-IT a 7 µl del producto de PCR. Se incubaron 30 minutos a 37°C y 10 minutos a 80°C para inactivar las enzimas. Después de este proceso de purificación se dividió el producto en 2 alícuotas y a cada una se le añadió 1 µl del primer correspondiente (a una el primer Fwd GP5 y a la otra alícuota el primer Rv GP6), 3 µl de agua MilliQ y 1 µl de Big Dye Terminator de Applied Biosystems. A esta reacción se le realizó una PCR bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización: 96°C por 1 minuto. Alineamiento: 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos. Terminación: 4°C hasta la siguiente purificación.

Los productos fueron purificados con Big Dye XTerminator, el cual está diseñado para aislar los componentes del ciclo de secuenciación como sales, los nucleótidos fluoróforos no incorporados y los dNTPs para prevenir su coinyección al equipo con los productos marcados con fluoróforos. El reactivo se añade directamente a la reacción de secuenciación y se agita por agitación mecánica. Durante la agitación, los reactivos del BigDye XTerminator capturan e inmovilizan los componentes no deseados. Después de la agitación por agitación mecánica, la reacción se centrifugó para mover la fracción insoluble de la mezcla de reacción. El BigDyeXterminator Purification Kit consta de dos reactivos:

- XTerminator Solution: El cual captura los terminadores marcados y sales libres posteriores a la reacción del ciclo de secuenciación.
- SAM Solution: La cual mejora el rendimiento del reactivo de BigDye XTerminator y estabiliza la muestra después de la purificación.

La purificación con el BigDye XTerminator se llevó a cabo añadiendo a cada reacción posterior al ciclo de secuenciación 45µl de la solución SAM, procurando agitarla a máxima velocidad previamente y sin permitir una sedimentación mayor a 2 minutos. Posteriormente se añadió la solución XTerminator agitando previamente por agitación mecánica por 10 segundos hasta homogenizar. Se agregaron 10µl de esta solución a cada reacción.

Para su lectura en el analizador genético, se cubrieron las reacciones con MicroAmp Clear Adhesive Films. Posteriormente se agitaron por agitación mecánica por 30 minutos a máxima velocidad y finalmente se centrifugaron. Para posteriormente ser secuenciados en el ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer.

#### **4.4.5.3 Genotipificación.**

Se obtuvieron 2 secuencias, la cadena positiva (GP5+ Fwd primer) y la cadena negativa (GP6+ Rv primer), las cuales fueron ensambladas con los programas GeneStudio y Gene Coder, junto con las herramientas del NCBI para alinear las

secuencias con las ya reportadas en la plataforma del NCBI. De esta forma se diferenciaron los genotipos y se clasificó el tipo viral de acuerdo a la homología.

#### **4.4.6. Secuenciación de genes candidatos para biomarcadores de CaCU.**

Lo genes candidatos a biomarcadores fueron: *PIK3CA*, *FBXW7*, *KRTAP4-11*, *HLA-B*, *TP53*, *PTEN*, *ZNF706*, *TUBGCP6*, *EP300*, *MAPK1*, *RSPH6A*, *POU4F2*, *HLA-A* y *ERBB2*. Estos corresponden a una totalidad de 56.45 kb. Para el análisis de estos genes se seleccionó la plataforma de Ion Torrent.

##### **4.4.6.1 Diseño de Ion Ampliseq Custom Target Selection Technology.**

Esta plataforma se encuentra acoplada a la plataforma de secuenciación de Ion Torrent, emplea bajas cantidades de ADN y la capacidad de realización de miles de PCR multiplex en un solo tubo, llegando a analizar miles de genes blanco.

El diseño de los pools de iniciadores para amplificar los genes candidatos se realizó con la herramienta Ion Ampliseq Designer, la cual permite crear un panel personalizado sólo los genes de interés ([www.ampliseq.com](http://www.ampliseq.com)). Se genera el diseño de los iniciadores óptimos en horas. Comúnmente el diseño suele ser de 1 a 3 pools de iniciadores. Para esto se realizó un registro en la plataforma Ion Ampliseq Designer ([ampliseq.com](http://ampliseq.com)). Posteriormente se agregaron los símbolos de los genes basados en la nomenclatura HUGO y las regiones que se deseaban secuenciar. En este trabajo se decidió secuenciar las regiones codificantes y las regiones UTR de cada gen, usando el genoma de referencia hg19. En seguida se optimizó el tamaño de los amplicones deseados, en este caso al ser muestras de tejidos embebidos en parafina se seleccionó un tamaño aproximado de amplicones de 150 pb. Después se recibió la notificación de que el diseño ya se encontraba listo. El diseño cuenta con un pre-pool de pares de iniciadores y una placa donde se encuentran los pares de iniciadores de manera individual.

#### 4.4.6.2 Construcción de la librería.

**Cuantificación del ADN:** Para cuantificar el ADN se utilizaron sondas TaqMan para la detección por PCR en tiempo real del gen RNasa P, lo cual nos permite cuantificar el ADN amplificable, ya que por su naturaleza de proveniencia, otros métodos de cuantificación como la densitometría no son capaces de discriminar entre ADN y ARN y son mucho más sensibles a la detección de pequeños fragmentos de hidrolizados de ARN. Por lo que los métodos por espectrometría con Nanodrop pueden llevar a la sobreestimación de la concentración de ADN en la muestra, lo cual da como resultado una baja calidad de las librerías, baja concentración y bajos rendimientos de la librería.

**Amplificación de los genes blanco:** Se utilizaron dos pool de iniciadores que entre ambos generan 613 amplicones. Para cada combinación se agregaron los siguientes reactivos preparados en una mezcla previa (cuadro 3), en una placa óptica MicroAmp.

Cuadro 3. Mezcla de reactivos para la amplificación de los genes blanco.

Componente	Volumen (µl)
5X Ion AmpliSeq HiFi Master Mix	4
2X Ion AmpliSeq Primer Pool	10
Muestra de ADN (10 ng)	Y
Agua libre de nucleasas	(6-Y)
Total	20

Se mezcló y se llevó a cabo la reacción de PCR en el termociclador Verity 96-well de AB con el siguiente programa (Cuadro 4).

Cuadro 4: Condiciones de amplificación de la librería.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Activación de la enzima	99°C	2 min



Desnaturalización	99°C	15 seg
Alineamiento y extensión	60°C	4 min*
	10°C	α

\*4 minutos para diseños  $\leq 1536$  pares de primers por pool.

Para el número de ciclos utilizados se eligió de acuerdo al cuadro 5, la cual se basa en el diseño del panel y por la naturaleza de la muestra, el número de ciclos fue de 19.

Cuadro 5. Número de ciclos para la amplificación de la librería de acuerdo al número de iniciadores que conforman al pool.

Pares de iniciadores por pool	Número de ciclos para ADN estándar	Número de ciclos para ADN FFPE
12-24	21	24
25-48	20	23
49-96	19	22
97-192	18	21
193-384	17	20
385-768	16	19
769-1536	15	18
1537-3072	14	17
3073-6144	13	16

Los productos de PCR se guardaron a 10°C toda la noche y se procesaron al día siguiente. Para periodos más largos se guardaron a -20°C.

**Digestión parcial de las secuencias de los iniciadores:** Se removió el sello de la placa, se añadieron 2  $\mu$ l del reactivo FuPa a cada muestra amplificada. El volumen total fue de 22  $\mu$ l. Se mezcló, se selló la placa con el adhesivo MicroAmp y se colocó en el termociclador para correr el programa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Condiciones para la digestión parcial de las secuencias de los iniciadores.

Temperatura	Tiempo
50°C	10 min
55°C	10 min
60°C	20 min
10°	Mantener por más de 1 hora

**Ligación de adaptadores y purificación:** Debido a que se utilizaron diferentes muestras para secuenciar la misma colección de genes blanco o librería, se asignó a cada muestra un código de barra “X”. Se preparó un mix del “Ion P1 Adapter” y “Ion Xpress Barcode X” en una dilución de 1:4 para cada adaptador (Tabla 6). Sustituyendo 2 µl del mix del adaptador de código de barras por los adaptadores del Ion AmpliSeq. Por ejemplo, se combinaron los volúmenes indicados en el siguiente cuadro.

Nota: Para evitar contaminaciones cruzadas se cambiaron los guantes constantemente, abriendo un tubo a la vez al estar manejando los adaptadores con los códigos de barra.

Cuadro 7. Ejemplo de mix de código de barras con adaptador para 4 reacciones.

Componente	Volumen
Ion P1 Adapter	2 µl
Ion Xpress Barcode X*	2 µl
Agua libre de nucleasas	4 µl
Total	8 µl

\*X = Código de barras seleccionado.

**Montaje y realización de la reacción de ligación:** Si se observaba precipitación en la solución “Switch”, se mezcló a temperatura ambiente hasta

resuspender. Se removió el sello de la placa y a cada pozo con la muestra digerida se le añadieron los componentes de la mezcla (Cuadro 8). Mezclando previamente la solución “Switch” con los adaptadores antes de añadir.

Cuadro 8. Mezcla de componentes para realizar la reacción de ligación.

Componente	Volumen
Solución Switch	4 µl
Mix de códigos de barra diluidos	2 µl
Volumen total (incuye 22 µl de librería digerida)	28 µl

Se añadieron 2 µl de “DNA Ligase” a cada pocillo. Se mezcló, se selló la placa con adhesivo de MicroAmp y se corrió en el termociclador (Cuadro 9)

Cuadro 9. Condiciones para realizar la reacción de ligación.

Temperatura	Tiempo
22°C	30 min
72°C	10 min
10°C	Mantener

**Purificación de la librería no amplificada:** Se realizó una mezcla empleando el reactivo “Agencourt AMPure” al 1.5X, el cual se pipeteó gentilmente y previamente se mezcló por agitación mecánica para dispersar las perlas. Utilizando alcohol al 70% preparado recientemente se mezcló con agua libre de nucleasas para lograr la dilución 1.5X.

Cuidadosamente se removió el sello de la placa y se añadieron 45 µl (1.5X muestra volumen) del reactivo “Agentcourt AMPure XP” a cada librería y se mezclaron bien las perlas con el ADN. Se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se colocó la placa en un rack magnético y se incubó por 2 minutos hasta que la solución se limpió. Cuidadosamente se removió y se descartó el sobrenadante

sin tocar el sedimento o pastilla formada. Se añadieron 150  $\mu$ l de etanol al 70% recientemente preparado, y se movió la placa de lado a lado en el rack magnético para lavar las perlas, después se removió y se descartó el sobrenadante sin tocar la pastilla. Se repitió el paso 4, para realizar un nuevo lavado. Para evitar restos de etanol en los pocillos se mantuvo la placa a temperatura ambiente por 5 minutos en el rack magnético para evaporar los restos de etanol.

**Cuantificación de la librería sin amplificar por qPCR:** Primero se eluyó la librería sin amplificar de AmpliSeq, después se determinó la concentración por qPCR con el Kit de cuantificación Ion Library. Después de la cuantificación por qPCR, se diluyó la librería a  $\approx$ 20 pM previo a la preparación del templado. Esta concentración es la adecuada para la preparación del templado utilizando el kit de preparación de templado de Ion Torrent.

**Elución de la librería sin amplificar:** Se removió la placa que contenía la librería AmpliSeq del magneto, y se añadieron 50  $\mu$ l de Low TE a la pastilla para dispersar las perlas. Se mezcló y se colocó la placa en el rack magnético por lo menos otros 2 minutos. Se removieron 2  $\mu$ l del sobrenadante y se mezclaron con 198  $\mu$ l de agua libre de nucleasas para su cuantificación.

**Cuantificación de la librería por qPCR y dilución:** Las librerías sin amplificar por lo general tienen rendimientos de 100-500 pM. Se prepararon diluciones seriadas de 10 de la librería control (*E. coli* DH10B,  $\approx$ 68 pM; del kit de cuantificación de librería de Ion) a 6.8 pM, 0.68 pM, y 0.068 pM. Se prepararon las mezclas de reacción. Para cada muestra, control y estándar, se combinaron 20  $\mu$ l de 2X TaqMan Master Mix y 2  $\mu$ l del 20X Ion TaqMan Assay y se mezclaron vigorosamente. Se dispensaron alícuotas de 11  $\mu$ l en los pocillos de una placa de PCR. Se añadieron 9  $\mu$ l de la librería AmpliSeq diluida (1:100) o 9  $\mu$ l de la dilución control en cada pocillo (dos pocillos por muestra, por librería), para un volumen total de reacción de 20  $\mu$ l.

En el programa del equipo de PCR tiempo real se colocaron las concentraciones de los estándares de la librería control, seguido de la referencia pasiva el ROX Reference Dye, el volumen de reacción de 20  $\mu$ l, la selección de FAM dye/MGB como el reportero o “quencher” de TaqMan y el mix de la librería TaqMan de Ion, bajo las condiciones del cuadro 10.

Cuadro 10. Condiciones para la cuantificación por qPCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Mantener	50°C	2 min
Mantener	95°C	20 segundos
Ciclo (40 ciclos)	95°C	1 segundo
	60°C	20 segundos

Seguido de la qPCR, se calculó la concentración promedio de la librería AmpliSeq sin diluir, multiplicando la concentración determinada por qPCR por 100.

Basado en el cálculo de la concentración de la librería, se determinó qué dilución resulta en una concentración de 20 pM. Para realizar esta dilución se empleó Low TE. Previo a la combinación de las librerías y preparación del templado, se diluyó una alícuota de cada librería a una concentración de  $\approx$ 20 pM diluyendo con Low TE.

#### **4.4.6.3 Cuantificación de las librerías amplificadas con el Bioanalizador de Agilent 2100.**

La amplificación de las librerías es requisito de este método para enriquecer el material amplificable y así obtener suficiente material para llevar a cabo la cuantificación utilizando estos instrumentos. El estuche de cuantificación de librería de Ion puede utilizarse para cuantificar las librerías amplificadas.

Para eluir y amplificar la librería se utilizó el Platinum PCR SuperMix High Fidelity. Después se purificó cada librería. Después de la cuantificación, se

diluyó la librería a  $\approx 20$  pM previo a la preparación del templado. Esta concentración es la adecuada para la preparación del templado utilizando un kit apropiado para la preparación del templado de Ion.

**Elución y amplificación de librería.**

Se removió la placa que contiene la librería AmpliSeq del rack magnético y se añadieron 50  $\mu$ l del Platinum PCR SuperMix High Fidelity y 2  $\mu$ l del Library Amplification Primer Mix a cada sedimento o pastilla de perlas. El SuperMix y Primer Mix pueden combinarse antes de agregarse y se mezcló con la pipeta.

Se colocó la placa en el rack magnético nuevamente por lo menos 2 minutos, y cuidadosamente se transfirieron  $\approx 50$   $\mu$ l del sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de PCR de 96 pozos, sin tocar la pastilla o sedimento.

Se selló la placa con adhesivo MicroAmp, se colocó el MicroAmp Compression Pad en la placa, se cargó la placa en el termociclador, y se corrió el siguiente programa (Cuadro 11).

Cuadro 11. Condiciones para la amplificación de la librería.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Mantener	98°C	2 min
5 ciclos	98°C	15 seg
	60°C	1 min
Mantener	10°C	Mantener

Se procedió con la purificación de la librería.

**4.4.6.4 Purificación de la librería amplificada.**

Se realizó una purificación doble con el Agencourt AMPure Xp Reagent, el cual se mezcló por agitación mecánica para dispersar las perlas antes de su uso y se pipeteó lentamente.

- La primera purificación a 0.5X perla-muestra volumen: El ADN de alto peso molecular se une a las perlas, mientras que los amplicones y primers se quedan en la solución. Se guardó el sobrenadante
- La segunda purificación a 1.2X perla-muestra original volumen: Los amplicones se unen a las perlas y los primers permanecen en la solución. Se guardó el sedimento de perlas y se eluyeron los amplicones de las perlas.

### **Primera purificación.**

1. Se añadieron 25  $\mu$ l (0.5X volumen muestra) del Agencourt AMPure XP Reagent a cada pocillo de la placa que contiene aproximadamente 50  $\mu$ l de muestra, y se mezcló por inmersión con pipeta arriba y abajo 5 veces para mezclar fuertemente la suspensión de perlas con el ADN.
2. Se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se colocó la placa en un rack magnético por 5 minutos o hasta que la solución se encontrara completamente clara.
4. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante de cada pocillo de la placa a un pocillo de una nueva placa de 96 pozos para PCR, sin tocar el precipitado de perlas. Ya que en el sobrenadante se encuentran los amplicones deseados.

### **Segunda purificación.**

1. Al sobrenadante, se le añadieron 60  $\mu$ l (1.2X volumen original de muestra) de Agencourt AMPure XP Reagent, y se mezcló por inmersión arriba y abajo 5 veces para mezclar la suspensión de perlas con el ADN.
2. Se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se colocó la placa en el rack magnético por 3 minutos o hasta que la solución estuviera clara. Cuidadosamente se removió y se descartó el sobrenadante sin perturbar el precipitado de perlas. Ya que en éstas se encuentran unidos los amplicones deseados, por lo que se guardó el sedimento.

4. Se añadieron 150  $\mu$ l de etanol al 70% recién preparado a cada pocillo, y se movió la placa de lado a lado en el rack magnético para lavar las perlas. Se removió y se descartó el sobrenadante sin perturbar el sedimento.
5. Se repitió el paso 4, para realizar un segundo lavado.
6. Se aseguró que todas las gotas de etanol se removieron de los pocillos. Manteniendo la placa en el rack magnético, y dejando evaporar por 5 minutos a temperatura ambiente. Para evaluar la sequedad del sedimento se rotó la placa 90 grados en el rack magnético hasta que el sedimento migrara lentamente y no se secase de más.
7. Se removió la placa del rack magnético y se añadieron 50  $\mu$ l de Low TE al sedimento para dispersar las perlas. Se pipeteó la mezcla arriba y abajo 5 veces para mezclar vigorosamente.
8. Se colocó la placa en el rack magnético por lo menos 2 minutos y se analizó una alícuota del sobrenadante por Agilent Bioanalyzer, como se describe a continuación.

### **Cuantificación de la librería y dilución con el Agilent Bioanalyzer instrument.**

Se analizó 1  $\mu$ l de la librería amplificada en el Agilent Bioanalyzer con el Kit de Agilent High Sensivity DNA. Los amplicones de las librerías debían tener múltiples picos en rango de 125-300 pb de tamaño. Las librerías amplificadas tienen concentraciones de 1000-5000 pM. Si la concentración de la librería era mayor a 20000 pM, se diluyó la librería 1:10 y se repitió la cuantificación hasta obtener una medición más adecuada.

1. Se determinó la concentración de la librería amplificada utilizando el software Bioanalyzer. Se aseguró que el marcador de los picos del más alto y el más bajo se identificaran y se asignaran correctamente. Se



siguieron las instrucciones del fabricante para realizar el análisis de la región.

- a. Se seleccionó el ícono de “Data” en el panel de contexto, y se observó el electroferograma de la muestra a cuantificar.
  - b. Se seleccionó la ficha de tabla de regiones, y se insertó la región que abarcaba los picos de los amplicones deseados.
  - c. La molaridad se calculó automáticamente y se mostró en la tabla en pmol/L (pM)
2. Se determinó la dilución de la librería para obtener una concentración de 20 pM. Por ejemplo:
    - La concentración de la librería fue de 3000 pM.
    - La dilución de la librería fue de  $3000 \text{ pM} / 20 \text{ pM} = 150$ .
    - Por lo tanto, 1  $\mu\text{l}$  de la librería se mezcló con 149  $\mu\text{l}$  de Low TE (dilución 1:150) lleva a aproximadamente 20 pM.
  3. Previo a la combinación de las librerías o de la preparación del templado, se diluyeron alícuotas de cada librería a una concentración de aproximadamente 20 pM. Las librerías diluidas se guardaron a 4°C máximo 48 horas. Las librerías sin diluir a la misma temperatura, y por mayor tiempo a -20°C.

#### **Antes de la preparación del templado.**

Las librerías estuvieron listas para la preparación del templado, utilizando el kit de preparación. Estas librerías se diluyeron inmediatamente antes de la preparación del templado. En general las librerías del Ion AmpliSeq a 20 pM (o 3ng/mL) abarcan suficientes partículas monoclonales Ion Sphere (ISPs). Por lo que se realizaron diluciones de templado adicionales de 10 pM (1.5 ng/mL) y de 40 pM (6ng/mL) para optimizar la cobertura de las clonas ISPs.

#### **4.4.6.5. PCR en emulsión.**

Ion OneTouch.

El Ion OneTouch System es un sistema automatizado empleado para la generación de partículas de templado positivo Ion OneTouch 200 Ion Sphere para la secuenciación semiconductiva (ISPs).

Ion OneTouch 200 Template Kit v2

El cual incluyó los reactivos para preparar 10 reacciones de partículas templado positivas Ion Sphere (ISPs) en el Ion OneTouch System.

#### **Corrida de verificación.**

Para asegurar el uso óptimo del sistema del Ion OneTouch, se preparó una librería control enriquecida, de ISPs en el sistema.

1. Se obtuvo la librería control de *E. coli* del kit de materiales de control de Ion, y se utilizó la librería control 200 *E. coli* DH10B.
2. En un tubo de "DNA LoBind", se diluyó 1 µl de la librería control en 260 µl de agua libre de nucleasas. Se utilizaron 20 µl de la dilución en la solución de amplificación.
3. Se siguieron las instrucciones de operado para instalar y utilizar el instrumento de Ion OneTouch ES para preparar las ISPs enriquecidas.
4. Con el sistema Qubit2.0, se determinó el porcentaje de ISPs templado-positivo.
5. Se secuenció la librería control en el sistema Ion Personal Genome Machine utilizando el chip de Ion adecuado. Se montó el secuenciador Ion PGM a 260 flows. Se cargó la muestra, y después se analizaron los resultados.
6. Se confirmó el éxito de los resultados de la secuenciación con la librería control. El resultado del AQ20 fue satisfactorio para continuar con el uso del equipo.

#### **4.4.6.6 Dilución de la librería.**

Se diluyó la librería stock a la concentración óptima para obtener de un 10-30% ISPs en el instrumento del Ion OneTouch. Se cuantificó y se diluyó la librería de acuerdo a los procedimientos de cuantificación y dilución previamente descritos. Se utilizaron librerías recién diluidas. Utilizando 20 µl de la librería diluida en la solución de amplificación.

#### **Montaje del equipo.**

Cuando el equipo no se usa durante más de una semana, se realiza el protocolo de mantenimiento antes de comenzar las corridas de secuenciación, asegurando que los tubos con reactivos estén llenos con el requerimiento de volumen mínimo de Ion OneTouch Oil y de Ion OneTouch Recovery Solution, después se instaló el Ion OneTouch Cleaning Adaptor.

#### **Preparación de la solución de amplificación.**

Preparación de los reactivos:

El reactivo Ion OneTouch 2X Mix se conservó a -20°C, el cual se descongeló previamente para su uso y guardado a 2-8°C.

- Reactivo IonOneTouch 2X Mix:
  - a. Se aseguró la descongelación completa de la solución.
  - b. Se mezcló por agitación mecánica por 30 segundos antes de su uso.
  - c. Se mantuvo el mix a temperatura ambiente.
- Ion OneTouch Enzyme Mix: Se centrifugó por 2 segundos, y se colocó en hielo.
- Librería: Se mezcló por agitación mecánica la solución por 5 segundos, se realizó una centrifugación por 2 segundos, después se colocó en hielo.
- Ion OneTouch 200 Ion Sphere Particles: Se colocaron en hielo.

En un tubo de 1.5 mL LoBind a 15°-30°C, se añadieron los siguientes componentes en el orden asignado. Añadiendo cada uno y agitando por inmersión con la pipeta (Cuadro 12).

Cuadro 12. Orden de adición de reactivos.

Orden	Reactivo	Volumen
1	Agua libre de nucleasas	280 µl
2	Ion OneTouch 2X Mix	500 µl
3	Ion OneTouch Enzyme Mix	100 µl
4	Librería diluida	20 µl
	Total	900 µl

Se agitaron por agitación mecánica las ISPs a velocidad máxima por 1 minuto para resuspender las partículas, se agitaron por inmersión con la pipeta agitando arriba y abajo; se añadieron las ISPs a la solución de amplificación (Cuadro 13).

Cuadro 13. Orden de adición de reactivos.

Orden	Reactivo	Volumen
1	Solución de amplificación sin ISPs (Del paso 2)	900 µl
2	Ion OneTouch 200 Ion Sphere Particles	100 µl
	Total	1.0 mL

Se aseguró que la solución de amplificación con ISPs se encontrara de 15 a 30°C antes de comenzar.

Se cargó la solución en el Ion OneTouch Plus Reaction Filter Assembly que provee el kit Ion OneTouch 200 Template Kit v2.

Se programó el instrumento Ion OneTouch de la siguiente manera:

- a. En la pantalla se seleccionó la opción “Template Prep”
- b. Se buscó en el menú “Assisted Run” y se seleccionó “Start Run”, después la opción “Next” hasta que comenzara la corrida y la barra de progreso. La cual duró aproximadamente 4 horas.

#### Recuperación de las ISPs templado-positivas.

- a. Al final de la corrida, se aseguró que las muestras se centrifugaran (con la opción “Remove Recovery Router”) o se les dio un spin en la centrífuga.
- b. Inmediatamente después de centrifugar, se removió y se descartó el “Recovery Router”
- c. Cuidadosamente se removieron ambos tubos del instrumento.
- d. Se lavaron las ISPs templado-positivas:
  - Se etiquetó un nuevo tubo de 1.5 mL LoBind para ISPs templado positivas.
  - Utilizando una pipeta se removió el contenido procurando dejar aproximadamente 50 µl de la solución Ion OneTouch Recovery de cada tubo. Procurando no agitar el sedimento de las ISPs templado-positivas.
  - Se resuspendieron las ISPs templado-positivas en la solución Recovery remanente pipeteando el sedimento arriba y abajo hasta que el sedimento se dispersara en la solución.
  - Se transfirió cada suspensión al tubo nuevo etiquetado.
  - Se añadió 1 mL de la solución de lavado Ion OneTouch a la suspensión combinada de ISPs templado-positivas.
  - Se centrifugaron las ISPs templado-positivas por 2.5 minutos a 15,500 g.
  - Se removió la solución dejando un remanente aproximado de 100 µl de sobrenadante.
  - Se mezcló por agitación mecánica el sedimento por 10 segundos para resuspender completamente las ISPs templado-positivas.
- e. Se conservaron las muestras para evaluar la calidad y enriquecer las ISPs templado-positivas.

#### **Enriquecimiento de las ISPs templado-positivas Ion OneTouch 200.**

Se realizó la prueba de volumen en el Ion OneTouch ES. Se llenó una tira de 8 tubos, con la solución Melt-Off combinando como se muestra en el cuadro 14:

Cuadro 14. Orden de adición de reactivos.

Orden	Componente	Volumen
1	Agua libre de nucleasas	865 $\mu$ l
2	NaOH 1M	125 $\mu$ l
3	Tween 20 al 10% en agua libre de nucleasas	10 $\mu$ l
	Total	1.0 mL

Se lavaron y se resuspendieron las perlas Dynabeads MyOne Streptavidin C1 de la siguiente forma:

- a. Se añadieron 130  $\mu$ l de la solución MyOne Beads Wash a un nuevo tubo LoBind de 1.5 mL.
- b. Se agitó por agitación mecánica el contenido de las perlas Dynabeads MyOne Streptavidin C1.
- c. Se transfirieron 13  $\mu$ l de perlas Dynabeads MyOne Streptavidin C1 al tubo que contenía la solución de lavado MyOne Beads, después se pipeteó arriba y abajo 10 veces para mezclar por inmersión.
- d. Se colocó el tubo en un rack magnético por 2 minutos, y después se removió y descartó el sobrenadante.
- e. Se añadieron 130  $\mu$ l de la solución de lavado MyOne Beads a las perlas Dynabeads MyOne Streptavidin C1, y se pipeteó arriba y abajo para resuspender las perlas. Se añadieron las perlas Dynabeads MyOne Streptavidin C1 resuspendidas en los 130  $\mu$ l de la solución de lavado MyOne Beads al tubo 2 de una tira de 8 tubos.

Se aseguró que las ISPs templado-positivas del instrumento Ion OneTouch se encontraran en 100  $\mu$ l de la solución de lavado Ion OneTouch. Si las ISPs se encontraban en refrigeración de 2 a 8°C, se centrifugaron a 15,500 g por 2.5 minutos, cuidadosamente se removió el sobrenadante, después se añadió suficiente solución de lavado Ion OneTouch para llevar a un volumen de 100  $\mu$ l.

Se transfirió el volumen completo de 100 µl de las ISPs resuspendidas en la solución de lavado Ion OneTouch en el tubo 1 de la tira de 8 tubos.

Se llenaron los tubos de la tira de 8 de la siguiente manera (cuadro 15):

Cuadro 15. Orden de reactivos en la tira de microtubos.

Número de tubo	Reactivo
1	100 µl de las ISPs templado-positivas
2	130 µl de perlas Dynabeads MyOneStreptavidin C1 resuspendidas en solución de lavado MyOne Beads
3	300 µl de solución de lavado Ion OneTouch
4	300 µl de solución de lavado Ion OneTouch
5	300 µl de solución de lavado Ion OneTouch
6	Vacío
7	300 µl de solución Melt-Off recién preparada
8	Vacío

**Preparación del Ion OneTouch ES:** Se cargó una nueva puntilla en el brazo de puntilla del equipo y se insertó también un nuevo tubo de PCR de 0.2 mL en el hoyo de la base de la puntilla cargadora.

**Realización de la corrida.**

1. Se aseguró el correcto acomodo del tubo de PCR, la puntilla y la tira de 8 tubos.
2. Se pipeteó el contenido del tubo 2 arriba y abajo para resuspender las perlas antes de empezar la corrida procurando no introducir burbujas en la solución.
3. Se presionó el botón "Start/Stop". Durante la corrida del equipo que duró aproximadamente 35 minutos.
4. Inmediatamente al terminar la corrida se cerró el tubo de PCR conteniendo las ISPS enriquecidas y se removió del equipo.

#### **Lavado de las ISPs enriquecidas.**

1. Se centrifugaron las ISPs enriquecidas a 15,500 g por 1.5 minutos.
2. Se aseguró que no hubiese perlas con las ISPs enriquecidas (un sedimento color marrón). Para eliminarlas se colocó el tubo en un rack magnético por 4 minutos, y se transfirieron las ISPs enriquecidas a un nuevo tubo sin agitar el sedimento de perlas Dynabeads MyOne Streptavidin C1.
3. Se lavaron las ISPs enriquecidas con la solución de lavado Ion OneTouch de la siguiente manera:
  - a. Se removió el sobrenadante dejando aproximadamente 10  $\mu$ l sin agitar el sedimento, después se añadieron 200  $\mu$ l de la solución de lavado Ion OneTouch. Se mezcló por inmersión con la pipeta agitando 10 veces arriba y abajo para resuspender el sedimento.
  - b. Se centrifugaron las ISPs enriquecidas a 15,500 g por 15 minutos.
  - c. Se añadió suficiente solución de lavado Ion OneTouch para un volumen final de 100  $\mu$ l. Se mezcló por inmersión con la pipeta 10 veces para resuspender la pastilla.
4. Se prosiguió a la secuenciación de la librería de las ISPs enriquecidas.

#### **4.4.6.7 Secuenciación en el equipo PGM de Ion Torrent.**

Antes de comenzar la secuenciación se cargó en el Torrent Suite del Ion PGM System software el archivo .bed generado al diseñar el panel de genes que se secuenciaron, el cual contiene las secuencias referencia de estos genes para el ensamblado que realizó el equipo.

#### **Creación de una corrida planeada.**

1. Se inició sesión en el Torrent Browser para el Torrent Server conectado al Ion PGM System.
2. Se seleccionó la pestaña Plan, después se seleccionó Templates, y se seleccionó el tipo de experimento que se iba a correr, en este caso fue Ion Ampliseq, y se seleccionó Plan New Run.



3. En el asistente, en cada campo se seleccionó lo siguiente (cuadro 16):

Cuadro 16. Selección en cada campo del equipo de secuenciación.

Nombre del campo	Descripción seleccionada
Application	Se seleccionó la aplicación realizada (Ion Ampliseq)
Run Type	Se seleccionó Forward
Template Kit	Se seleccionó el Ion OneTouch 200 Template Kit v2 DL
Sequencing Kit	Se seleccionó el Ion PGM 200 Sequencing Kit
Flows	Se ingresó el número de lecturas para la longitud de lectura. En este caso 300X por cada 150 pares de bases
Barcode set	Se seleccionó "IonXpress" barcode set, el cual incluye todos los códigos de barra del Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 kits.
Monitor	Se establecieron los umbrales de carga de perlas, la secuencia útil y la señal Key. Durante una corrida en el Torrent Browser bajo la pestaña de Monitor, la pantalla del progreso de la corrida muestra una alerta si los valores de la corrida caen por debajo del umbral seleccionado.
Reference Library	Se seleccionó la librería de referencia del Torrent Server, en este caso hg19.
BED files	Se seleccionó el archivo BED en el Torrent Server
Exportar	Con el Ion Reporter instalado, se habilitó en la pantalla.
Planned Run Name	Se nombró la corrida.
Sample name	Con el Ion reporter habilitado, se ingresó el nombre de las muestras, los valores del flujo de trabajo y un ID.

4. Después de completar las selecciones, se seleccionó Plan Run al final del flujo de trabajo. El plan apareció bajo el nombre especificado.

#### **Secuenciación con el Chip Ion 314.**

1. El Chip Ion 314 utiliza sólo la mitad de volumen de las ISPs templado-positivas enriquecidas utilizando el kit templado. Se transfirió la mitad de volumen de las ISPs templado-positivas enriquecidas a un nuevo tubo de PCR de 0.2 mL (sin poliestireno) y se guardó hasta por una semana en dado casi de ser requeridas para otra corrida de secuenciación.
2. Se mezcló por agitación mecánica el Control Ion Sphere Particles y se centrifugó por 2 segundos antes de tomar alícuotas.
3. Se añadieron 5 µl del Control Ion Spheres Particles directamente a la mitad de volumen de las ISPs enriquecidas en el tubo de PCR.
4. Se añadieron 100 µl de Annealing Buffer. Se mezcló por inmersión pipeteando arriba y abajo.
5. Se centrifugaron los tubos a 15,500 g por 2 minutos.
6. Cuidadosamente se removió el sobrenadante sin tocar el sedimento, dejando 3 µl en el tubo.
7. Se añadieron 3 µl del primer de secuenciación y se confirmó que el volumen total correspondiera a 6 µl. En caso de requerir se añadió Annealing Buffer hasta completar el volumen requerido.
8. Se pipeteó la muestra arriba y abajo hasta homogenizar el sedimento.
9. Se programó un ciclo térmico de 95°C por 2 minutos, seguido de 37°C por 2 minutos.
10. Se colocó el tubo en el termociclador y se corrió el programa. Después del ciclo, la reacción permaneció en el equipo a temperatura ambiente mientras se procedía con el revisado del Chip.

### **Revisado del Chip.**

1. Se tomó un Chip nuevo y se etiquetó para su identificación durante el experimento.
2. Se colocó el chip en la placa de toma de tierra del Ion PGM Sequencer.

### **Creación de una corrida planeada.**

1. Se inició la sesión en el servidor Torrent conectado al sistema Ion PGM.
2. Se seleccionó la etiqueta Plan, después Templates, y se seleccionó el tipo de experimento, en este caso "Plan New Run".
3. Se seleccionó el experimento "Ampliseq", el tipo de corrida "Forward", El Kit de templado "Ion OneTouch 200 Template Kit v2 DL", el kit de secuenciación "Ion PGM 200 Sequencing Kit", el número de corridas (300 por cada 150 bases leídas), el juego de barcodes "IonXpress" para librerías de ADN, el monitor los umbrales de la carga de perlas, la secuencia utilizable, y la señal clave, para que durante la corrida en el servidor de ion Torrent en la pantalla del monitor se visualice una alarma en caso de que los valores de la corrida caigan por debajo de los umbrales establecidos; la librería de referencia y el archivo BED generado y cargado en el servidor Torrent (IAD35225), el plugin de la aplicación, nombre la corrida y los nombres de las muestras.
4. Después de la selección y especificación de la corrida, se seleccionó.

### **Preparación de las ISPs de templado positivas para secuenciación.**

#### **Preparación de los fragmentos de prueba Ion Sphere.**

1. Se mezcló por agitación mecánica los fragmentos de prueba del Ion Sphere del kit de controles del Ion PGM y se centrifugó por 2 segundos antes de tomar las alícuotas.
2. Se añadieron 5  $\mu$ l de los fragmentos de prueba del Ion Sphere a 100  $\mu$ l del Annealing Buffer en un tubo de PCR. Se mezcló por inmersión arriba y abajo con la pipeta.

### **Adición de las Ion Sphere™ control y el primer de secuenciación a las ISPs.**

1. El chip Ion 314 utiliza sólo la mitad del volumen de enriquecimiento, las ISPs templado positivas se prepararon usando el kit de templado. Se transfirió la mitad del volumen a un nuevo tubo de PCR.
2. Se mezcló por agitación mecánica y se centrifugaron por 2 segundos antes de tomar las alícuotas.
3. Se añadieron 5 µl de las partículas control Ion Sphere directamente a la mitad del volumen de las ISPs enriquecidas en un tubo de PCR de 0.2mL.
4. Se añadieron 100 µl del Annealing Buffer. Se mezcló rigurosamente por inmersión arriba y abajo.
5. Se centrifugó por 2 minutos a 15,500 x g.
6. Cuidadosamente se removió el sobrenadante sin tocar el sedimento, dejando 3 µl en el tubo.
7. Se añadieron 3 µl del primer de secuenciación para un volumen total de 6 µl.
8. Se mezcló por inmersión hasta deshacer el sedimento.
9. Se programó un ciclo en el termociclador de 95° C por 2 minutos y después a 37°C por 2 minutos.
10. Se colocó el tubo en el termociclador y se corrió el programa.

### **Lavado del Chip 314.**

1. Después de realizar un chequeo del chip, se colocó el Chip de Ion en una superficie plana y utilizando la puntilla de la pipeta “Rainin SR-L200F”, se pipetearon 50 µl de isopropanol al 100% en el puerto grande de cargado del chip.
2. Se añadieron 50 µl de Annealing Buffer en el puerto grande de cargado, y se removió y descartó cualquier líquido desde el otro puerto.
3. Se repitió el paso anterior una vez más para un total de 2 lavados con el Annealing Buffer.

### **Unión de la polimerasa de secuenciación a las ISPs.**

1. Después del primer de secuenciación de alineamiento, se removieron las ISPs del termociclador y se añadió 1  $\mu\text{l}$  de polimerasa de secuenciación Ion PGM 200 a las ISPs, para un volumen total de 7  $\mu\text{l}$ .
2. Se mezcló por inmersión arriba y abajo con la pipeta.
3. Se incubó la muestra a temperatura ambiente por 5 minutos.

### **Cargado del Chip.**

#### **Eliminación del líquido del chip.**

1. Se inclinó el chip 45° para que el puerto de cargado quede hacia abajo.
2. Con la puntilla de la pipeta se insertó en el puerto de cargado y se removió todo el líquido posible y se descartó.
3. Se colocó el chip hacia abajo en el adaptador de centrífuga y se centrifugó por 5 segundos para vaciar el chip. Se limpió en caso de residuos.

#### **Cargado de la muestra en el chip.**

1. Utilizando el adaptador de centrífuga del chip se colocó en una superficie estable. Después de la incubación de la polimerasa, se colectó la muestra completa (aproximadamente 7  $\mu\text{l}$ ) en la puntilla de la pipeta "Rainin SR-L10F" y se cargó firmemente en el puerto de cargado del chip.
2. Gentilmente se depositaron las ISPs aproximadamente 1  $\mu\text{l}$  por segundo, sin introducir burbujas al chip, dejando una pequeña parte de la muestra en la puntilla de la pipeta (aproximadamente 0.5  $\mu\text{l}$ ).
3. Se removió y descartó cualquier otro líquido del otro puerto del chip. Se colocó el chip hacia arriba en la centrífuga y se centrifugó por 30 segundos.
4. Se mezcló la muestra en el chip con la pipeta fija a un volumen de 5  $\mu\text{l}$ , inclinando el chip a 45° cuidando que el puerto de cargado quedara hacia abajo, colocando la puntilla en el puerto de cargado; y se pipeteó

lentamente la muestra adentro y afuera del chip 3 veces sin crear burbujas.

5. Se centrifugó el chip por 30 segundos y se repitió el paso anterior de mezclado y centrifugación.
6. Se inclinó el chip a 45 ° y se removió todo el líquido posible del puerto de cargado llenando la pipeta. Y se descartó el líquido.

#### **Selección de la corrida y realización.**

1. En el servidor se seleccionó el campo de “Planned Run” y la corrida creada, seguido de la selección “Next”.
2. Se confirmó que las configuraciones fueran las correctas.
3. Se colocó el chip en el instrumento, cuidando que no hubiera fugas antes de cerrar la cubierta.
4. Si el chip pasaba la calibración se seleccionó en la pantalla “Next” para continuar la corrida de secuenciación, en caso contrario, se seleccionó una recalibración.
5. Después se comenzó la corrida automáticamente a los 90 segundos aproximadamente.
6. Cuando la corrida estuvo lista, el equipo automáticamente regresó a la pantalla de inicio.

#### **4.4.7. Análisis de secuencias.**

Las secuencias fueron ensambladas y analizadas con el programa Ion Reporter del equipo. Los resultados se descargaron en línea. Se analizaron las variantes encontradas con el programa oncotator ([www.broadinstitute.org/oncotator](http://www.broadinstitute.org/oncotator)), en el cual se introdujo la lista de las variantes encontradas, el nombre del gen, la posición y el tipo de cambio en la secuencia. Con este programa se compararon las mutaciones o variantes encontradas con las bases de datos COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) y reportes en Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) para encontrar cambios en la estructura del gen, cambios en la proteína final, asociaciones con

enfermedades, reportes de asociaciones con algún tipo de cáncer, funciones génicas, vías afectadas etc. Este programa arrojó un cuadro, donde se verificó cada una de las mutaciones y sus características para lograr así una comparación entre las mutaciones de cada muestra tumoral. Se realizó un análisis de frecuencias de las mutaciones de todas las muestras, para encontrar aquellas que se encontraron con mayor frecuencia en todas las muestras. Se realizó un cuadro de comparación de mutaciones entre las muestras con las características epidemiológicas y factores de riesgo de cada paciente, para encontrar posibles asociaciones entre éstas y las mutaciones encontradas.

## CAPÍTULO V: RESULTADOS.

### 5.1 Selección de muestras.

Del archivo del Departamento de Anatomía Patológica y Citología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL, se recolectaron 138 tumores embebidos en bloques de parafina provenientes de pacientes con diagnóstico confirmado de CaCU. La zona tumoral fue delimitada por un médico patólogo. Se seleccionaron sólo aquellas muestras con una celularidad tumoral mayor al 90%.

De los expedientes clínicos de las pacientes de origen de los tumores, se evaluaron los factores de riesgo asociados al desarrollo de CaCU. Se analizó la edad de las pacientes al momento de la toma, la edad de menarquia, la edad de menopausia, la edad del inicio de vida sexual activa, el número de parejas sexuales, número de gestas, entre otros. El promedio de la edad de las pacientes de este estudio fue de 49.4 años ( $\pm 15.1$ ), con un rango de 23 a 92 años. La edad promedio de menarquia fue de 12.9 años ( $\pm 1.5$ ) y la de menopausia 41.8 años ( $\pm 8$ ). La edad de inicio de vida sexual activa promedio fue de 17.5 ( $\pm 3.2$ ), con un número promedio de parejas sexuales de 1.9 ( $\pm 1.3$ ). El número de gestas promedio fue de 5.1 ( $\pm 3.1$ ), predominando los partos naturales con un promedio de 4.1 ( $\pm 2.7$ ), como se muestran en el cuadro 17.

Cuadro 17. Datos epidemiológicos de las pacientes incluidas en el estudio.

Estadísticos									
	Edad	Edad de menarquia	Edad de menopausia	Edad de inicio de vida sexual activa	Número de contactos sexuales	Número de gestas	Número de partos	Número de cesáreas	Número de abortos
Media	49,4	12,9	41,8	17,5	1,9	5,1	4,1	,6	,4
Mediana	45,0	13,0	43,0	17,0	2,0	4,0	4,0	,0	,0
Desviación típica	15,1	1,5	8,0	3,2	1,3	3,1	2,7	1,2	,9
Rango	69,0	8,0	58,0	15,0	10,0	17,0	12,0	9,0	6,0
Mínimo	23,0	10,0	2,0	13,0	,0	1,0	,0	,0	,0
Máximo	92,0	18,0	60,0	28,0	10,0	18,0	12,0	9,0	6,0



Las pacientes de origen de los tumores analizados provenían en su mayoría de la región noreste del país. El estado predominante de procedencia de las pacientes fue Nuevo León (50.7%), seguido de Tamaulipas (18.1%), San Luis Potosí (9.4%) y Coahuila (5.1%) (Figura 4).

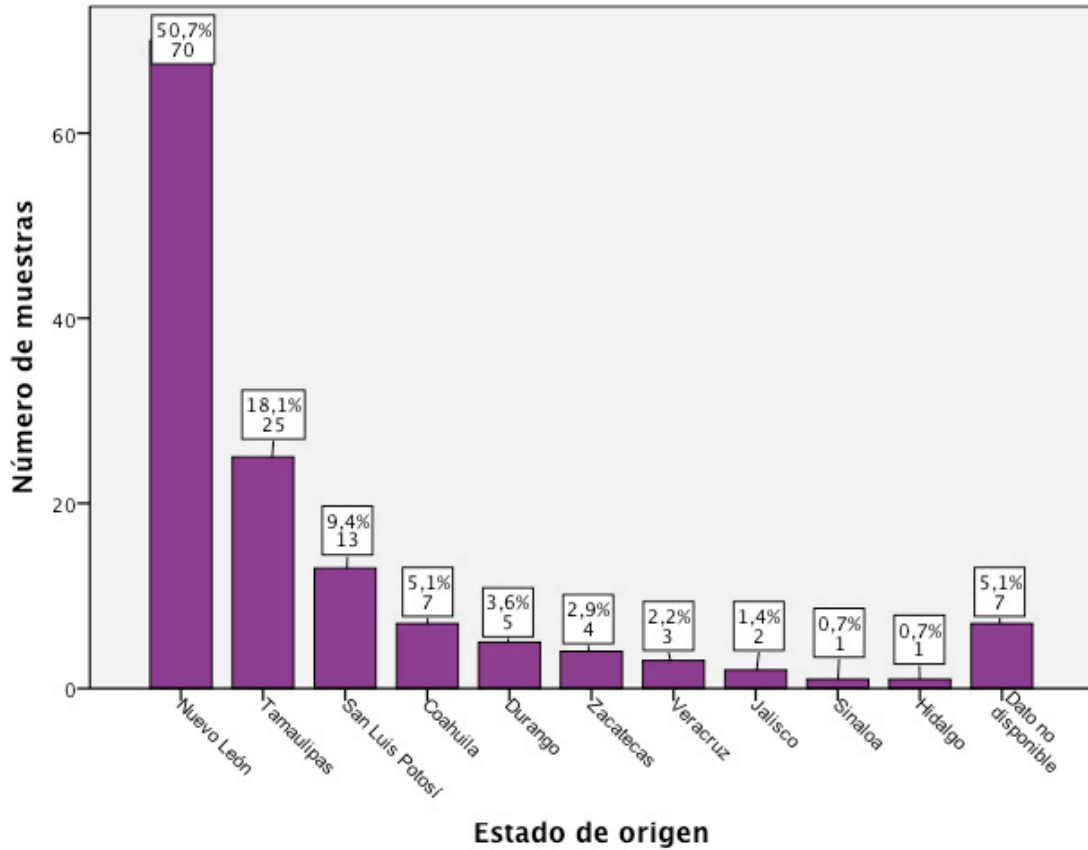


Figura 4. Frecuencia del estado de procedencia de las pacientes de origen de los tumores analizados.

Las 138 muestras provenían de pacientes con diferentes estadios de CaCU, predominando el estadio IIB (19.6%), seguido del IIIB (15.9%) y carcinoma *in situ* (15.9%). El estadio con menor frecuencia en las pacientes fue el IA2. No se pudieron obtener los datos del estadio en 6.5% de las muestras de las pacientes (Figura 5).

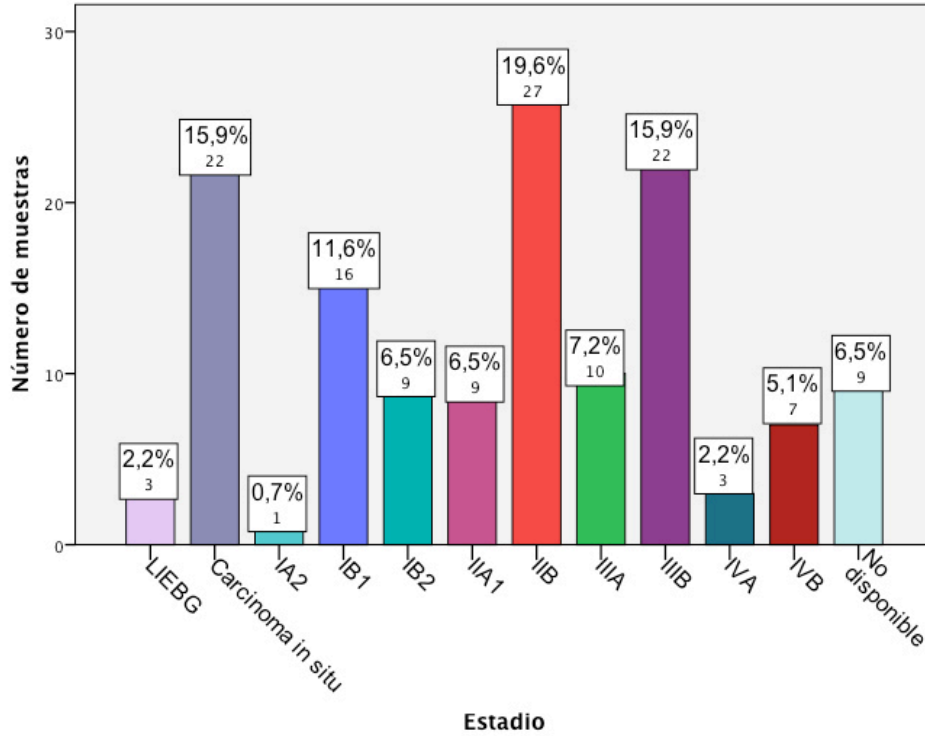


Figura 5. Frecuencia del estadio de las muestras.

Entre los datos obtenidos como factores de riesgo ese encontró que la mayoría de las pacientes mencionó haber iniciado su vida sexual activa a una edad temprana (menores a 18 años).

Otro de los factores de riesgo analizados fue el número de contactos sexuales. La mayoría de las pacientes mencionaron haber tenido parejas sexuales entre 1 y 4 (59 pacientes, 42.8%) con una media de 1.9 ( $\pm 1.3$ ) parejas sexuales. Este factor de riesgo se obtuvo de una n=129, ya que de 9 pacientes no se contaba con este dato (Figura 7).

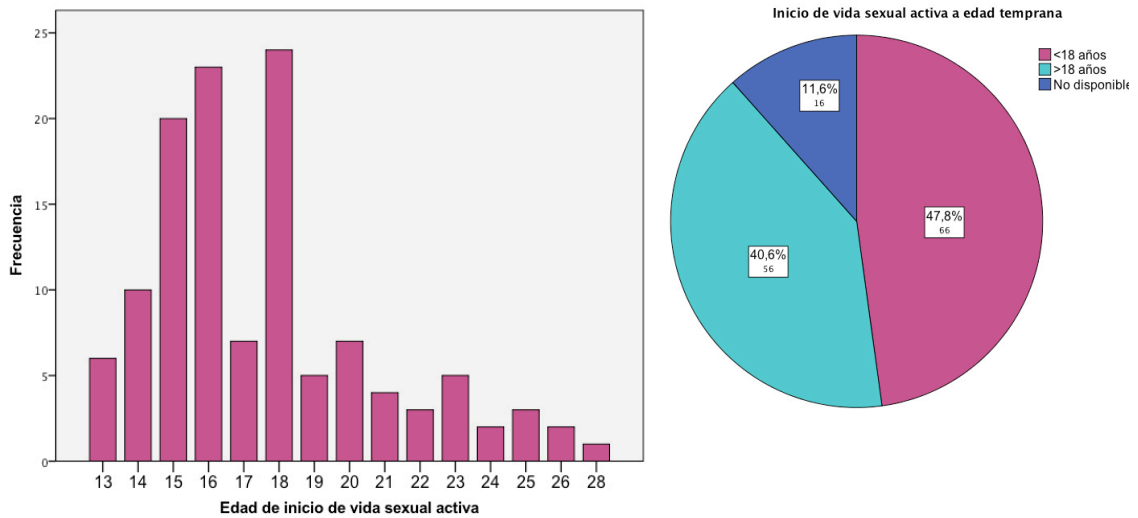


Figura 6. Edad de inicio de vida sexual activa. Se muestra la frecuencia de la edad (izquierda) en que las pacientes que mencionaron haber iniciado su vida sexual activa. En la derecha el porcentaje de las pacientes que iniciaron su vida sexual activa a edad temprana (antes de los 18 años) (47.8%).

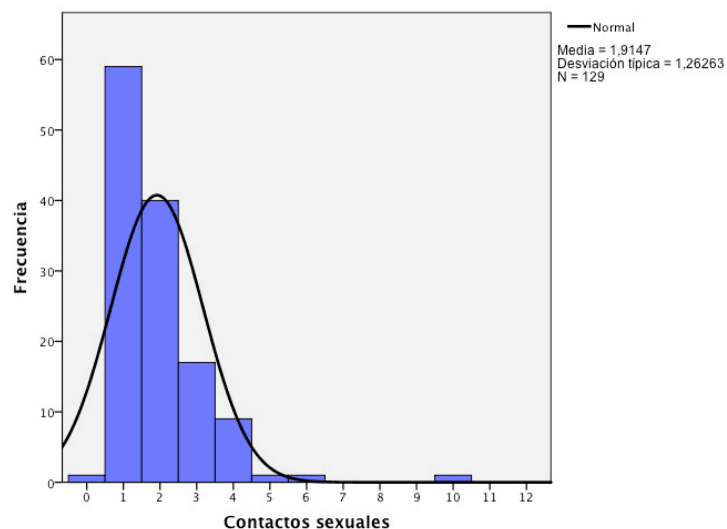


Figura 7. Frecuencia del número de parejas sexuales que las pacientes mencionaron haber tenido. Se observa una distribución de 1 a 4 parejas sexuales.

También se analizaron los factores de riesgo asociados a hábitos de la pacientes, como el tabaquismo. El 25% de las pacientes mencionó tener o haber tenido el hábito de fumar o exposición al humo de tabaco (Figura 8). Otro de los hábitos analizados como factor de riesgo fue el consumo de alcohol. Sólo

el 12.3% de las pacientes (17) mencionó tener el hábito de tomar bebidas alcohólicas ocasionalmente (Figura 8).

El uso de anticonceptivos orales se analizó como factor de riesgo asociado a la infección por el VPH y progresión de la lesión hacia CaCU. El 20.4% de las pacientes mencionó que utilizaban anticonceptivos orales como método de planificación familiar (Figura 8).

Un factor de riesgo importante para la infección por VPH analizado fue el antecedente epidemiológico de otras enfermedades de transmisión sexual. La mayoría de las pacientes (87.6%) mencionó no padecer o haber padecido alguna enfermedad de transmisión sexual, sin embargo sólo el 8% de las pacientes si lo reconoció (Figura 8).

Los antecedentes familiares de cáncer se analizaron como factor de riesgo asociado a la progresión a CaCU. Al considerar únicamente los antecedentes de cáncer de familiares directos, 48 de las pacientes (34.8%) tenían antecedentes de cáncer en la familia (Figura 8).

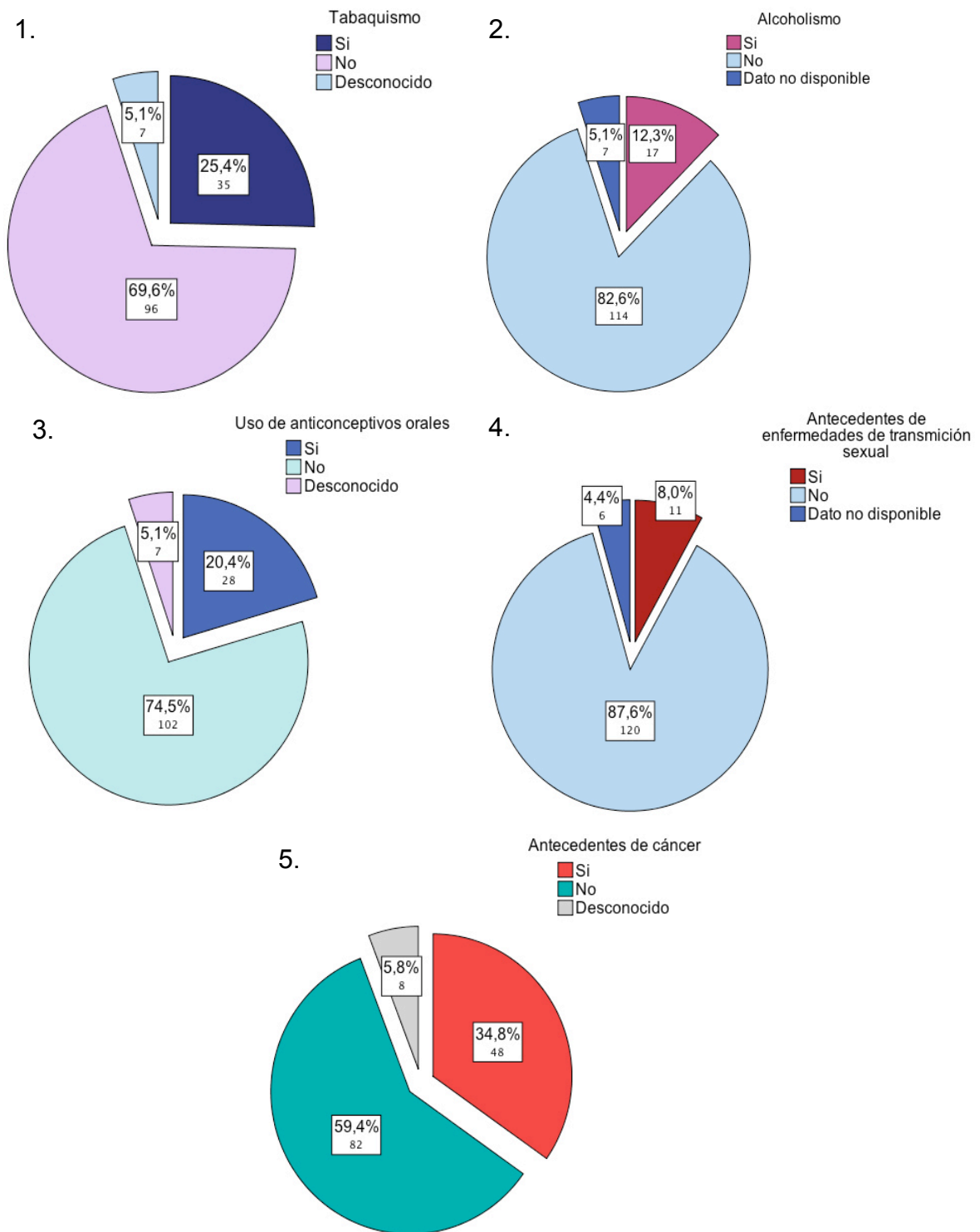


Figura 8. Factores de riesgo para la progresión a CaCU. 1) Pacientes con hábito de fumar. 2) Frecuencia de pacientes con alcoholismo. 3) Uso de anticonceptivos orales como método de planificación familiar en las pacientes. 4) Porcentaje de pacientes con antecedentes de enfermedades de transmisión sexual. 5) Antecedentes familiares de cáncer.

## **5.2 Biobanco de ADN de tumores.**

Se realizó la extracción de ADN de 138 tumores embebidos en bloques de parafina, los cuales provenían de pacientes internadas en el hospital universitario “Dr. José Eleuterio González” en el periodo del 2008 al 2011.

## **5.3 Control de calidad del biobanco de ADN.**

### **5.3.1 Cuantificación del ADN.**

Se cuantificó el ADN contenido en una alícuota de un  $\mu\text{l}$  de muestra, por absorbancia con el equipo del Nanodrop. Esta concentración se multiplicó por su factor de dilución (1:20) y se obtuvo un rendimiento promedio de 4.2 mg de ADN por cada 15 mg de muestra de tejido embebido en parafina.

### **5.3.2 Determinación de calidad del ADN extraído.**

Se obtuvo una pureza promedio de 1.92 de relación 260/280, y 2.77 de relación 260/230.

### **5.3.3 Integridad.**

Se valoró la integridad de los ADNs del biobanco resolviéndoles por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 9). Todos los ADNs presentaron degradación como se esperaba por este tipo de muestras. El tamaño promedio de los ADNs osciló entre 100 a 500 pb.

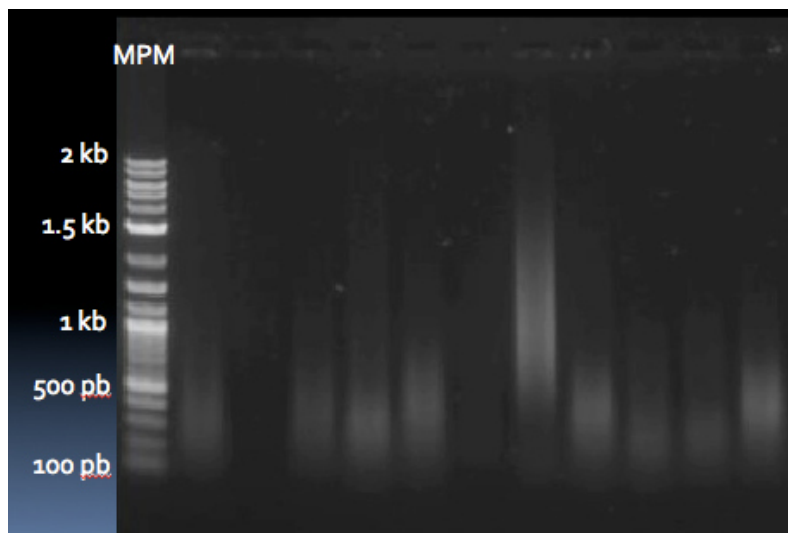


Figura 9. Integridad del ADN extraído. El tamaño de los ADNs extraídos osciló entre 100 y 500 pb.

#### 5.3.4 Control de amplificación del ADN por medio de PCR.

Se realizó la amplificación del gen humano TNF $\alpha$  de las 138 muestras y se obtuvo el producto esperado de 150 pb (Figura 10) en todas ellas, lo cual indica que las muestras son de suficiente calidad para amplificar con otras variaciones de la PCR como qPCR o la realización de librerías para secuenciación masiva.

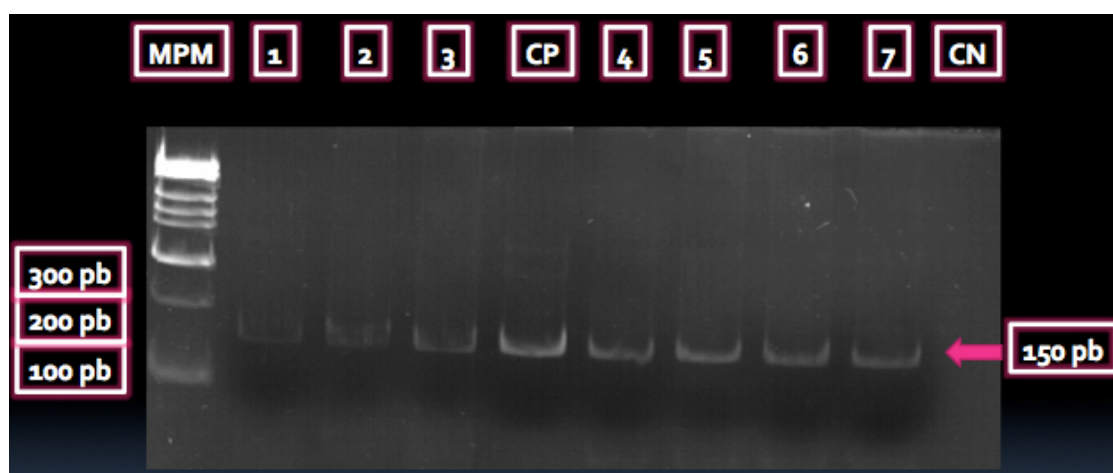


Figura 10. Capacidad de amplificación del ADN de las muestras. La PCR resultó en un producto esperado de 150 pb para el gen humano TNF $\alpha$  usado como gen control íntegro para calidad.

## 5.4 Genotipificación de las muestras.

### 5.4.1 Estandarización de la PCR para amplificar la región L1 del VPH y visualización de los productos de PCR con los iniciadores GPs.

Se realizó una PCR utilizando los iniciadores GPs, cuyo producto es de 150 pb (Figura 11). Para estandarizar las condiciones se realizó una PCR hot start para evitar la amplificación de productos no deseados y con condiciones touchdown para amplificar el producto aunque existan bases desapareadas en la secuencia.



Figura 11. Producto amplificado de 150 pb de la región L1 del VPH. Obtenido con una PCR con las condiciones “hot start” y “touchdown”.

### 5.4.2 Secuenciación Sanger.

De 138 muestras analizadas, 120 amplificaron. A 120 amplicones se les realizó secuenciación mediante un equipo de electroforesis capilar. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Gene Coder (Figura 12), donde se verificó la pureza de las secuencias y se descartaron 29 secuencias que presentaron traslapes de bases, lo que indicó que había más de un producto amplificado, por lo tanto, una coinfección con otro tipo de VPH que la propia secuenciación de Sanger no permitía discernir.



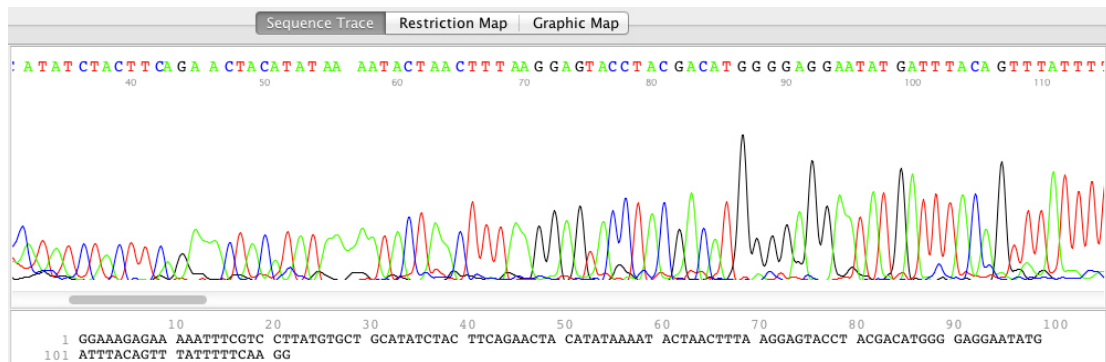


Figura 12. Electroferograma de una secuencia de una muestra positiva para el VPH. Se observa una secuencia clara con poco ruido de fondo.

### 5.4.3 Genotipificación.

Utilizando la plataforma de NCBI, se utilizó la herramienta BLAST para alinear las secuencias obtenidas con las secuencias reportadas de VPH en esta plataforma. De acuerdo al porcentaje de similitud entre las secuencias, se determinó el tipo viral presente en la muestra. El tipo viral predominante en las muestras fue el VPH 16, seguido del VPH 45 y 56. Sin embargo el 21% de las muestras presentó más de un tipo de VPH, por lo que no se pudo determinar con este método qué otros tipos virales estaban presentes en las muestras con coinfecciones. No se logró detectar presencia de VPH en 18 muestras (13%) (Figura 13).

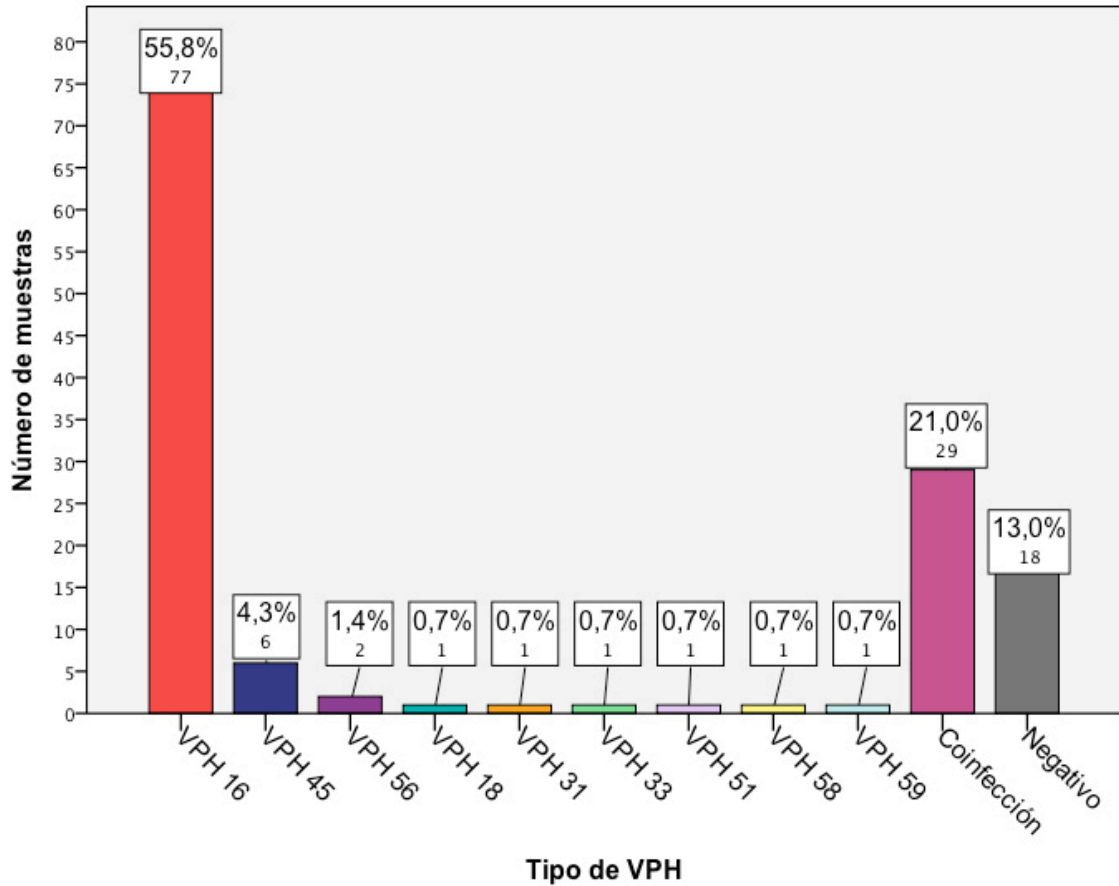


Figura 13. Frecuencia del tipo de VPH presente en las muestras tumorales.

### 5.5 Secuenciación de genes candidatos para biomarcadores de CaCU.

Se seleccionaron los genes: *PIK3CA*, *FBXW7*, *KRTAP4-11*, *HLA-B*, *TP53*, *PTEN*, *ZNF706*, *TUBGCP6*, *EP300*, *MAPK1*, *RSPH6A*, *POU4F2*, *HLA-A* y *ERBB2*.

#### 5.5.1 Diseño de “Ion Ampliseq Custom Target Selection Technology” de Ion Torrent.

En el siguiente cuadro se muestra el diseño final del panel de genes a secuenciar por la plataforma de Ion Torrent.

Cuadro 18. Diseño del panel de genes a secuenciar.

Gen	Nombre * (CDS+UTR)	Blanco (kb)	Bases no cubiertas (pb)	Cobertura (%)
1	<i>PIK3CA</i>	3.709	58	98.44
2	<i>FBXW7</i>	4.709	0	100
3	<i>KRTAP4-11</i>	1.173	313	73.32
4	<i>HLA-B</i>	1.572	0	100
5	<i>TP53</i>	3.319	615	81.47
6	<i>PTEN</i>	5.547	290	94.77
7	<i>ZNF706</i>	3.071	613	80.04
8	<i>TUBGCP6</i>	6.019	26	99.57
9	<i>EP300</i>	8.761	250	97.15
10	<i>MAPK1</i>	6.206	441	92.89
11	<i>RSPH6A</i>	2.484	0	100
12	<i>POU4F2</i>	3.141	125	96.02
13	<i>HLA-A</i>	1.611	0	100
14	<i>ERBB2</i>	5.127	108	97.89

\* Fuente UCSC.

Las zonas de los genes que no fueron cubiertas por la plataforma de Ion Torrent, fue debido a que las bases repetitivas no se detectan confiablemente por esta metodología, por lo que en este diseño no se cubren para evitar así errores en la secuenciación.

## 5.5.2 Construcción de la librería templado para secuenciación masiva.

### 5.5.2.1 Cuantificación de ADN.

La cuantificación de ADN por qPCR para amplificar el gen *RNase P*, no coincidió con la obtenida por el Nanodrop ya que fue menor que esta última. Las cuantificaciones obtenidas por qPCR se muestran en el cuadro 19.

Las muestras mostraron un rendimiento desde 20 a 420 ng por cada 15 mg de muestra de tejido. Para la construcción de las librerías se requirieron 20 ng de

ADN para cada pool de iniciadores. Las muestras con concentración menor a 20 ng/μl se llevaron a un volumen final de 6 μl, para alcanzar la concentración mínima requerida en cada reacción de amplificación de las librerías.

El promedio del rendimiento de ADN obtenido mediante el cálculo de la concentración obtenida por qPCR del gen *RNAse P* fue menor (60 ng por cada 15 mg de muestra), en comparación con la cuantificación por absorción con Nanodrop que fue de 4.2 mg por cada 15 mg de muestra.

Cuadro 19. Cuantificaciones obtenidas por RNAse P.

Muestra	Quantity Mean	ng/ul	Rendimiento ng/15 mg de muestra
103	0.292	3	60
114	0.076	1	20
115	0.072	1	20
116	0.217	2	40
117	0.129	1	20
118	0.057	1	20
119	0.420	4	80
120	2.106	21	420
104	0.441	4	80
105	0.157	2	40
110	0.405	4	80
108	0.736	7	140
111	0.605	6	120
109	0.616	6	120
113	1.475	15	300
112	0.364	4	80
59	0.081	1	20
32	0.054	1	20

37	0.056	1	20
----	-------	---	----

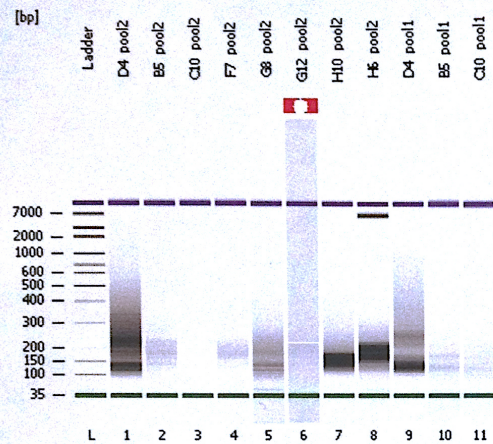
### 5.5.2.2 Cuantificación de la librería y su dilución.

Se logró realizar la librería de 19 muestras. Como control de calidad se empleó el Bioanalyzer de Agilent, para cuantificar y observar los productos amplificados por el pool de iniciadores diseñados en el panel. Los productos esperados debían oscilar entre 100 y 300 pb de tamaño. Esto se observó en aquellos electroferogramas (Figura 14) donde se mostró una curva entre 100 y 300. En aquellos pool de librerías donde no se tuvieron los tamaños esperados, se volvió a realizar la amplificación de la librería, para asegurar la amplificación completa de los genes. Los pool de librerías que pasaron el control de calidad (color azul) se prepararon para ligarse a los adaptadores y a los códigos de barra (barcode), para cargarse en el chip de secuenciación (Figura 14). En las muestras D4 y B5, ambos pool de librerías amplificaron correctamente los tamaños esperados, en las muestras G8, H10, H6 y C10 sólo uno de los pool de iniciadores amplificó correctamente. Se observó que en los pool (2) de librerías de las muestras C10, F7 y G12 no hubo amplificación.

Assay Class: High Sensitivity DNA Assay  
 Data Path: E:\...qh Sensitivity DNA Assay DE34903975 2013-07-12 12-23-55.xad

Created: 12/07/2013 12:23:55  
 Modified: 17/07/2013 10:45:20

**Electrophoresis File Run Summary**



**Instrument Information:**

Instrument Name: DE34903975      Firmware: C.01.069  
 Serial#: DE34903975      Type: G2938C

**Assay Information:**

Assay Origin Path: C:\Documents and Settings\Administrator\Desktop\assays\dsDNA\High Sensitivity DNA v01  
 Assay Class: High Sensitivity DNA Assay  
 Version: 1.0  
 Assay Comments: Copyright © 2003-2009 Agilent Technologies

**Chip Information:**

Chip Lot #:   
 Reagent Kit Lot #:   
 Chip Comments:

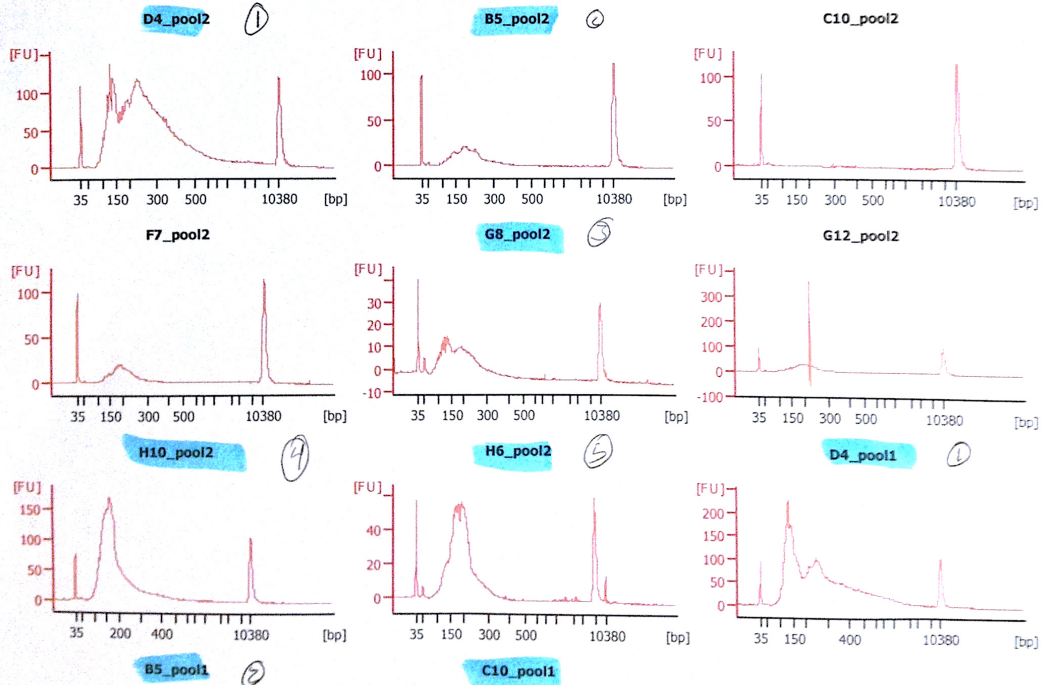


Figura 14. Control de calidad de las librerías amplificadas. Se muestran las gráficas reportadas por el Bioanalyzer.

**5.6 Análisis de secuencias.**

Se analizaron las secuencias y las mutaciones de 19 muestras arrojadas por el Ion Reporter. En la Figura 15 se muestran las mutaciones encontradas por

medio de la secuenciación masiva en código de colores en cada uno de los genes secuenciados. Las muestras se clasificaron de acuerdo al estadio, el tipo de VPH presente en la muestra y el factor de riesgo del hábito del tabaco, esto con la finalidad de encontrar patrones de mutaciones parecidos asociados a las características de las muestras. El estadio varió en las muestras secuenciadas, desde cáncer *in situ* hasta el estadio IIIB, sólo en una de las muestras no se logró determinar el estadio de la paciente. Los tipos de VPH de las muestras variaron, predominando el VPH 16, seguido de 5 muestras que presentaban coinfecciones de VPH. Sólo 3 muestras provenían de pacientes fumadoras.

Aquellos cambios de una sola base o SNPs (azul claro) se encontraron a lo largo de todas las muestras, mientras que aquellos que produjeron un cambio en la estructura de la proteína final se enlistan en color azul oscuro. Se encontraron cambios importantes ya que en algunas muestras se encontraron deleciones de bases (rojo) e inserciones (verde) en genes como *HLA-B*, *FBXW7*, *PTEN* y *KRTAP4-11*. Los genes que se encontraron mutados con mayor frecuencia fueron *HLA-B*, *EP300* y *HLA-A*, ya que todas las muestras presentaron mutaciones en estos tres genes. El gen *TP53* se encontró mutado en el 94% de las muestras, sólo la muestra infectada con el VPH 56 no presentó mutaciones en este gen.

El gen que se encontró mutado con menor frecuencia a lo largo de las muestras fue el gen *RSPH6A*, sólo 4 muestras tuvieron mutaciones en este gen y estas mutaciones producen cambios en la estructura final de la proteína.

El gen *HLA-B* presentó cambios en la estructura de la proteína en 18 de 19 muestras. El gen que presentó el mayor número de deleciones de pb en las muestras fue el gen *HLA-A*, ya que 10 muestras presentaron este tipo de mutación.

En los genes *MAPK1* y *ZNF706* se encontraron variantes de una sola base como SNPs, que no producen cambios en la estructura final de la proteína.

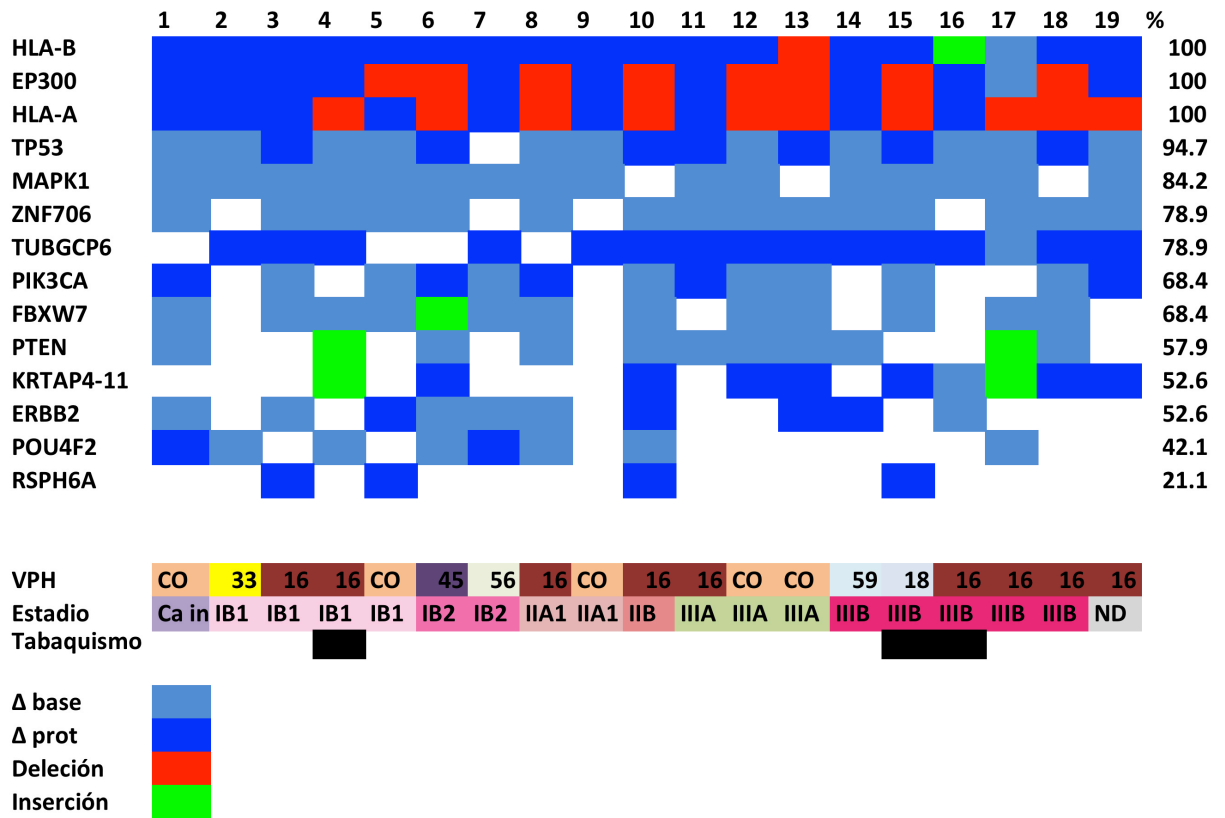


Figura 15. Frecuencia de mutaciones de los genes candidatos a biomarcadores en las muestras. Se muestran los 14 genes secuenciados en 19 muestras, el tipo de VPH y el tabaquismo como factor de riesgo. Además se muestra el porcentaje de frecuencia de mutaciones en orden descendiente y el tipo de mutaciones encontradas.

Las mutaciones que se encontraron con mayor frecuencia (en 18 de las muestras) fue g.chr22:41568480T>C del gen *EP300*, que no produce algún cambio en la estructura de la proteína y g.chr22:41551039T>A que produce el cambio p.T1061T en la proteína. En este mismo gen la mutación g.chr22:41548008A>G que produce el cambio p.I997V se encontró en 16 muestras.

En el gen *TP53* se encontró la mutación g.chr17:7578645C>T en 17 de las muestras, aunque esta no produce ningún cambio en la proteína.

En el gen *HLA-A* 15 muestras mostraron las mutaciones g.chr6:29913078A>G, g.chr6:29913074A>G y g.chr6:29913042C>T, donde última produce el cambio



p.S359S. La mutación g.chr6:31323233A>G produjo cambio en la estructura de la proteína (p.T252T) en 15 muestras.

La delección más predominante en las muestras fue en el gen EP300 (g.chr22:41574969\_41574972TGTA>T) (8 muestras).

La delección g.chr6:29912227\_29912230TGGA>T del gen *HLA-A*, se encontró en 6 muestras.

Se encontró la delección g.chr22:41575884\_41575898TCACACACACACACA>T en 4 muestras, en el gen EP300.

En el ANEXO 3 se encuentran las condiciones obtenidas de la corrida de secuenciación y en el ANEXO 4 las variantes que se encontraron en más de una muestra.

## CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.

### 6.1 Discusión.

Todas las pacientes estudiadas mostraron al menos uno de los factores de riesgo que se han reportado en la progresión a CaCU. La edad de inicio de vida sexual activa a edad temprana predominó en casi la mitad de las pacientes reclutadas para este estudio, con una media promedio de 17.5 años. Lo que concuerda con otros estudios como el de Sui, S y cols.,[60] donde este factor de riesgo es determinante para la infección por el VPH.

Otro factor en el que se aumenta el riesgo de infectarse por este virus es el número de parejas sexuales, como también lo refiere Sui, S y cols., en donde el tener tres o más parejas sexuales aumenta el riesgo de infectarse con el VPH. En este trabajo predominó la frecuencia entre 1 y 4 parejas sexuales, siendo el promedio de 1.9 ( $\pm 1.3$ ). Algunos estudios han asociado el número de gestas a la infección por VPH, sin embargo en este estudio donde la media de este factor fue de 5.1 ( $\pm 3.1$ ), no fue posible comparar con un grupo control.

El estadio de la enfermedad predominante en este muestreo fue el IIB, en otros estudios como el de Illades-Aguilar y cols.,[28] los estadios de inicio fueron los predominantes (LIEAG y/o cáncer in situ).

Un factor de riesgo importante para la infección por el VPH es la coinfección con otros virus y los antecedentes de enfermedades de transmisión sexual como lo reportado con Cassell y cols. y Amirian y cols.[58,59] En este trabajo sólo el 8% de las pacientes reclutadas tenían antecedentes de enfermedades de transmisión sexual.

El consumo de alcohol, el tabaquismo y el uso de anticonceptivos orales son otros factores de riesgo que se han asociado a la adquisición de esta infección viral, como en los trabajos de Vesco y cols. y de Appleby y cols., se reporta[26,56]. En este trabajo no se realizó la comparación con controles, sin embargo encontramos un porcentaje considerable (12.3%, 25.4% y 20.4%) para

el uso o consumo de alcohol, el tabaquismo y anticonceptivos orales, respectivamente.

Otro de los factores de riesgo importante en el desarrollo del CaCU, son los antecedentes familiares de cáncer, ya que gran parte de las mutaciones de línea germinal pueden llegar a ser conductoras del desarrollo a cáncer. En este trabajo el 34.8% de las pacientes reclutadas mencionaron que tenían antecedentes de cáncer en la familia.

Para este trabajo se utilizaron muestras de tejidos embebidos en parafina y debido a la naturaleza de la muestra se realizó una PCR de un gen humano como control de calidad del ADN, esto con el fin de analizar la capacidad de amplificación. Encontramos evidencia de degradación del ADN tumoral en los geles de agarosa, en donde se observaron fragmentos con tamaños menores a los 500 pb en la mayoría de las muestras de ADN. Se midió la capacidad de amplificación del ADN con una PCR para el gen *TNF $\alpha$* , cuyo producto es relativamente pequeño (150 pb) y el cual corresponde al mínimo requerido para los productos de secuenciación masiva del panel diseñado de la plataforma de Ion Torrent. Se obtuvo amplificación para este fragmento en todas las muestras analizadas.

Se logró detectar el VPH utilizando una PCR hot start y touchdown, obteniendo un producto de 150 pb. No se logró detectar la presencia del virus en el 13% de las muestras, en comparación con otros reportes donde la detección es hasta en el 99% de las muestras. Para lograr aumentar el número de muestras positivas, sería necesario utilizar métodos más sensibles como PCR anidado para lograr la detección y genotipificación de VPH.

El tipo viral predominante en las muestras tumorales de CaCU a nivel mundial es el VPH 16, en nuestro trabajo y en otros reportes del país también se encontró el mismo resultado, donde en la mayoría de las muestras de este estudio (55.8%) se detectó este tipo viral.

El segundo tipo viral predominante a nivel mundial es el 18, en comparación con el 33 en el sureste del país reportado en el trabajo de Illadéz-Aguilar y cols., en el 2010[28] y en el trabajo de Peralta-Rodríguez y cols.,[29] En este trabajo el

VPH 18 se encontró en el lugar numero 4, mientras que el VPH 33 se encontró en la misma frecuencia que el VPH 18. Siendo en este trabajo el segundo tipo viral predominante el 45, seguido del 56.

Además se detectó que el 21% de las muestras analizadas presentaban coinfección de VPHs. Debido a la técnica utilizada para la genotipificación (secuenciación Sanger), no fue posible determinar los tipos virales presentes en esas muestras, por lo que se reportaron solo como coinfecciones. Para determinar el genotipo es menester utilizar métodos discriminatorios como lo son la hibridación reversa con el estuche iNNO-LiPa, el cual amplifica un producto de 65 pb por PCR y distingue entre 25 tipos de VPH o RT-PCR con sondas específicas para cada tipo viral.

Cuando se realizó el control de calidad para realizar la secuenciación masiva, la concentración del ADN detectada por medio de qPCR fue mucho menor a la reportada por el nanodrop. Esto debido a que la medición con nanodrop detecta todos los ácidos nucleicos presentes en la muestra (como RNA, miRNA, DNAs pequeños, fragmentos cortos de DNA, oligonucleótidos, etc). Mientras que la técnica de RNase P detecta el número de copias de ADN funcionales para genotipificación. En este caso, la técnica de RNase P fue el método más sensible utilizado para determinar la cantidad necesaria para realizar la secuenciación masiva. Sin embargo a pesar de ser un método muy sensible para cuantificar, el uso del nanodrop es necesario debido a que la cuantificación con RNase P no determina la pureza y la calidad de la muestra. Por este método hubo una gran diferencia en el promedio del rendimiento de la extracción (60 ng por cada 15 mg de muestra de tejido) en comparación con la medición realizada por nanodrop (4.2 mg por cada 15 mg de muestra).

En el trabajo de Ojesina y cols., [82] el gen con mayor frecuencia de mutaciones fue el gen *PIK3CA* (15%) seguido del gen *FBXW7* (10%). Sin embargo en nuestro trabajo fueron los genes *HLA-B*, *EP300* y *HLA-A* (100%), donde encontramos cambios en la estructura de la proteína que en su mayoría ya habían sido reportados.

El gen *HLA-B* presentó cambios en la estructura de la proteína en 18 de las muestras, con las cuales se afectan sus funciones como procesador de antígenos y la presentación de antígenos por el complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*) clase I, así como la vía de señalización mediada por interferón gamma. Mutaciones en este gen han sido asociadas a melanoma familiarizado y a esclerosis Lichen atrófica familiar. Con el trabajo de Ojesina y cols., es la primera vez que se asocia el gen *HLA-B* al cáncer tipo epitelial como lo es el CaCU[85,86].

El gen con mayor frecuencia de mutaciones, incluyendo mayor número de deleciones que involucra cambios en la estructura de la proteína, fue el *HLA-A*. Se encontró mutado en todas las muestras secuenciadas hasta ahora y se encontraron deleciones en 10 muestras. Mutaciones en este gen afectan el procesamiento del antígeno y la presentación del antígeno mediada por *MHC* clase I y la vía de señalización mediada por interferón gamma. Se ha reportado que mutaciones en este gen se asocian a enfermedades como melanoma familiarizado, esclerosis atrófica de Lichen, osteosarcoma familiar, entre otras[85-87]. En el estudio como antecedente a este trabajo de Ojesina y cols., este gen también se asoció por primera vez con cáncer tipo epitelial como en el caso del cervicouterino.

En el trabajo de Ojesina y cols., el gen con mayor frecuencia de mutaciones fue *MAPK1*. En nuestro trabajo las variantes encontradas no han sido reportadas como variantes que cambien la estructura de la proteína. Lo mismo ocurrió con el gen *ZNF706*, en donde sólo se encontraron variantes que no tienen reportes de cambios estructurales en la proteína. Entre la mayoría de estas variantes se encontraron cambios de una sola base, como SNPs.

Las mutaciones encontradas en el gen *EP300* afectan principalmente las funciones de apoptosis, el ciclo celular, la respuesta al daño del ADN, la señal de transducción mediada por p53 la cual resulta en apoptosis, acetilación de histonas (H4), así como interacción con otras especies. Algunas mutaciones encontradas en este trabajo se han asociado previamente a otros tipos de cáncer como el colorectal, mama, páncreas, leucemia mieloide aguda (AML),

leucemia linfocítica aguda (ALL), y Linfoma Difuso de células B grandes (DLBCL)[88-91].

El gen con menos frecuencia de mutaciones fue el *RSPH6A*, ya que sólo 4 muestras presentaron mutaciones en este gen (21%). Cabe destacar que todas las mutaciones encontradas en este gen confirieron cambios estructurales en la proteína.

Con este número de muestras no es posible realizar asociaciones contundentes entre el estadio y el número de mutaciones. Aunque se observa que en estadios más avanzados se presentan mayor número de deleciones en algunos genes. Habría que aumentar el número de muestras para observar diferencias significativas.

Lo mismo sucede con aquellas muestras que presentan coinfecciones o algún tipo de VPH como el 16. Sin embargo no se observan diferencias significativas entre el tipo viral presente en la muestra y el número de mutaciones observadas.

Tampoco hay diferencias entre el número de mutaciones si la paciente tenía el hábito de fumar, ya que sólo tres muestras provenían de pacientes que fumaban.

En este estudio hubo mutaciones y variantes que se repiten a lo largo de las muestras. La mutación g.chr22:41568480T>C del gen *EP300* se encontró en 18 de las muestras, aunque no produce algún cambio en la proteína. Otra mutación con el mismo número de repeticiones en las muestras encontrada en el mismo gen g.chr22:41551039T>A que produce el cambio en la proteína p.T1061T, se ha asociado a los mismos tipos de cáncer. Otra mutación de este gen (g.chr22:41548008A>G) que produce el cambio p.I997V (mutación de sentido erróneo) se encontró en 16 muestras.

En *TP53* se encontró un SNP (g.chr17:7578645C>T) en 17 de las muestras, el cual ya ha sido reportado en cáncer de mama, colorectal, pulmón, sarcoma, adrenocortical, glioma, y otros múltiples tipos de tumor, además de asociarse también a cáncer hereditario como el adrenocortical, endometrial, mama y ovario no asociado a *BRCAs*, entre otros.

En 15 muestras se encontraron las siguientes mutaciones en el gen *HLA-A*: g.chr6:29913078A>G, g.chr6:29913074A>G y g.chr6:29913042C>T, donde ésta última produce un cambio en la estructura de la proteína (p.S359S). Mientras que en 15 muestras la mutación g.chr6:31323233A>G produjo un cambio en la estructura de la proteína (p.T252T).

La delección más predominante en las muestras fue g.chr22:41574969\_41574972TGTA>T en el gen EP300, la cual se encontró en 8 muestras. El cambio que produce esta delección aún no ha sido reportado ni asociado a alguna patología. Si esta mutación se encuentra en un mayor número de casos de CaCU podría reportarse por primera vez en esta enfermedad.

Otra delección importante fue la encontrada en el gen *HLA-A* (g.chr6:29912227\_29912230TGGA>T), la cual se encontró en 6 muestras, de la cual no se tienen reportes de asociación de esta delección a alguna patología.

En 4 muestras, se encontró una delección en el gen EP300 (g.chr22:41575884\_41575898TCACACACACACACA>T) que previamente se ha relacionado con cáncer de mama, colorectal, páncreas, AML, ALL y DLBCL. No se tienen reportes de una posible asociación con CaCU. La cual podría ser asociada con esta neoplasia en caso de encontrarse en un mayor número de muestras.

Finalmente, es de gran relevancia el hallazgo de mutaciones en dos genes del sistema mayor de histocompatibilidad (*HLA-A* y *HLA-B*), ambos con una tasa alta de mutaciones en este tipo de neoplasia.

Ambos genes están implicados en la presentación de antígenos y estos datos ponen en evidencia el significado potencial de la sinergia entre la infección por VPH y una respuesta inmune alterada en la patogénesis del CaCU.

## CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES.

### 7.1 Conclusiones.

En este trabajo todas las pacientes mostraron al menos un factor de riesgo de los previamente reportados para la progresión a CaCU,.

Se logró detectar al VPH en el 87% de las muestras, siendo el tipo predominante el VPH 16, seguido del VPH 45 y 56 en esta región del país.

Se encontró que el 21% de las muestras contenían más de un tipo de VPH, sin embargo no se pudo determinar qué tipos se encontraban mezclados en las muestras.

Se lograron secuenciar los genes blancos de interés en las 19 muestras con la plataforma Ion Torrent. Los genes que se encontraron mutados con mayor frecuencia fueron el *HLA-B*, *EP300* y *HLA-A*. Todas las muestras presentaron variantes en estos genes.

El gen con más mutaciones que producen cambios de estructura de la proteína fue el *HLA-B*. El gen *HLA-A* tuvo un mayor número de deleciones entre las muestras (10 muestras).

Todas la variantes encontradas en los genes *MAPK1* y *ZNF706*, no se habían asociado previamente a cambios en la estructura de la proteína. La mayoría de estas variantes son SNPs.

El gen con menor frecuencia de mutaciones fue el *RSPH6A*, aunque todas resultan en cambios estructurales de la proteína.

Las mutaciones que se encontraron con más frecuencia fueron g.chr22:41568480T>C y g.chr22:41551039T>A, seguidas de la mutación g.chr22:41548008A>G del gen *EP300*.

La segunda mutación encontrada con mayor frecuencia fue g.chr17:7578645C>T en el gen *TP53*, encontrada en 17 muestras.

En 15 muestras se encontraron las mutaciones g.chr6:29913078A>G, g.chr6:29913074A>G y g.chr6:29913042C>T en el gen *HLA-A*.



La delección encontrada con mayor frecuencia en las muestras fue g.chr22:41574969\_41574972TGTA>T en el gen *EP300*. Se encontró en 8 muestras.

Para confirmar estos potenciales biomarcadores de CaCU es importante aumentar el número de muestras.

Las mutaciones encontradas en genes implicados en la presentación de antígenos como *HLA-A* y *HLA-B* en todas las muestras, ponen en evidencia la sinergia entre la infección por el VPH y la respuesta inmune alterada en la progresión a CaCU. Lo que podría implicar la postulación de éstos como biomarcadores para este tipo de neoplasia.

## **Bibliografía.**

1. Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J (2013) Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology* 62: 161-175.
2. (2014) Cervical Cancer Home Page - National Cancer Institute.
3. Robert J (2013) [Biology of cancer metastasis]. *Bull Cancer* 100: 333-342.
4. Sethi N, Kang Y (2011) Unravelling the complexity of metastasis — molecular understanding and targeted therapies. *Nature Reviews Cancer* 11: 735-748.
5. Song JY, Bae HS, Koo do H, Lee JK, Jung HH, et al. (2012) Candidates for tumor markers of cervical cancer discovered by proteomic analysis. *J Korean Med Sci* 27: 1479-1485.
6. Mosavi-Jarrahi A, Kliewer EV (2013) Cervical cancer incidence trends in Canada: a 30-year population-based analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 35: 620-626.
7. (2013) OMS | Salud de la mujer. WHO.
8. (2014) Direccion General de Epidemiologi-a.
9. Liao S, Deng D, Zhang W, Hu X, Wang W, et al. (2013) Human papillomavirus 16/18 E5 promotes cervical cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro and accelerates tumor growth in vivo. *Oncol Rep* 29: 95-102.
10. Saavedra ALp, Soberón ML (2006) Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Revista INCan: Instituto de Cancerología*. pp. 31-55.
11. Reuschenbach M, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M (2011) [HPV-associated carcinomas of the female genital tract. Molecular mechanisms of development]. *Pathologe* 32: 451-460.
12. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, et al. (2012) Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *Jama* 307: 693-703.
13. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 189: 12-19.
14. Mant C, Kell B, Rice P, Best JM, Bible JM, et al. (2003) Buccal exposure to human papillomavirus type 16 is a common yet transitory event of childhood. *J Med Virol*

71: 593-598.

15. Telesheva LF, Dolgushina VF, Abramovskikh OS, Zotova MA, Mezentseva EA, et al. (2012) [Cytokine status of cervical mucus in women with transitory and persistent course of papillomavirus infection]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*: 118-121.

16. Bernal-Silva S, Granados J, Gorodezky C, Alaez C, Flores-Aguilar H, et al. (2013) HLA-DRB1 Class II antigen level alleles are associated with persistent HPV infection in Mexican women; a pilot study. *Infect Agent Cancer* 8: 31.

17. Andersen AS, Koldjaer Solling AS, Ovesen T, Rusan M (2013) The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*.

18. Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S (2012) Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother* 18: 807-815.

19. Trottier H, Ferreira S, Thomann P, Costa MC, Sobrinho JS, et al. (2010) Human papillomavirus infection and reinfection in adult women: the role of sexual activity and natural immunity. *Cancer Res* 70: 8569-8577.

20. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, et al. (2013) Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *Int J Cancer* 133: 1271-1285.

21. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer* 7: 11-22.

22. Carter JR, Ding Z, Rose BR (2011) HPV infection and cervical disease: a review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 51: 103-108.

23. Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, Dillner J, Clifford G (2013) A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 445: 224-231.

24. Chelimo C, Woulde TA, Cameron LD, Elwood JM (2013) Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *66*: 207-217.

25. Poynten IM, Waterboer T, Jin F, Templeton DJ, Prestage G, et al. (2013) Human

papillomavirus types 6 and 11 seropositivity: risk factors and association with ano-genital warts among homosexual men. *J Infect* 66: 503-511.

26. Vesco KK, Whitlock EP, Eder M, Burda BU, Senger CA, et al. (2011) Risk Factors and Other Epidemiologic Considerations for Cervical Cancer Screening: A Narrative Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *155*: 698-705.

27. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, Sanjosé Sd, et al. (2012) Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women

A meta-analysis from cervical infection to cancer, *International Journal of Cancer* Volume 131, Issue 10. *International Journal of Cancer*. pp. 2349-2359.

28. Illades-Aguiar B, Alarcon-Romero Ldel C, Antonio-Vejar V, Zamudio-Lopez N, Sales-Linares N, et al. (2010) Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol* 117: 291-296.

29. Peralta-Rodriguez R, Romero-Morelos P, Villegas-Ruiz V, Mendoza-Rodriguez M, Taniguchi-Ponciano K, et al. (2012) Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. *Infectious agents and cancer* 7: 34.

30. Stapley S, Hamilton W (2011) Gynaecological symptoms reported by young women: examining the potential for earlier diagnosis of cervical cancer. *Fam Pract* 28: 592-598.

31. Issah F, Maree JE, Mwinituo PP (2011) Expressions of cervical cancer-related signs and symptoms. *Eur J Oncol Nurs* 15: 67-72.

32. Eide ML, Debaque H (2012) HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. *Ann Pathol* 32: e15-23, 401-409.

33. Cuschieri K, Hardie A, Hovland S, Hoaas B, Karlsen F, et al. (2013) Comparison of the sensitivities of three commercial assays for detection of the high risk HPV types 16, 18 and 45. *J Virol Methods* 193: 147-150.

34. Giorgi Rossi P, Bisanzì S, Paganini I, Di Iasi A, Angeloni C, et al. (2010) Prevalence of HPV high and low risk types in cervical samples from the Italian general population: a population based study. *BMC Infect Dis* 10: 214.

35. Argyri E, Papaspyridakos S, Tsimplaki E, Michala L, Myriokefalitaki E, et al. (2013) A cross sectional study of HPV type prevalence according to age and cytology. *BMC Infectious Diseases* 13: 53.
36. Moscicki A, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh T, Powers A, et al. (2010) Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol* 116: 1373 - 1380.
37. Harper D, Franco E, Wheeler C, Moscicki A, Romanowski B, et al. (2006) HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 367: 55 - 1247.
38. Panotopoulou E, Tserkezoglou A, Kouvousi M, Tsiaousi I, Chatzieleftheriou G, et al. (2007) Prevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, 18, 31, and 33 in a cohort of Greek women. *J Med Virol* 79: 1898 - 1899.
39. Stamataki P, Papazafiropoulou A, Elefsiniotis I, Giannakopoulou M, Brokalaki H, et al. (2010) Prevalence of HPV infection among Greek women attending a gynecological outpatient clinic. *BMC Infect Dis* 15: 10 - 27.
40. Bansal M, Austin RM, Zhao C (2011) Correlation of histopathologic follow-up findings with vaginal human papillomavirus and low-grade squamous intraepithelial lesion Papanicolaou test results. *Arch Pathol Lab Med* 135: 1545-1549.
41. Ricci A P, Perucca P E, Koljanin V J, Baeriswyl T E (2004) CITOLOGÍA DE BASE LÍQUIDA: REVISIÓN DE LA HISTORIA Y LOS ESTUDIOS AL RESPECTO. *Revista chilena de obstetricia y ginecología* 69: 256-262.
42. Mills A, Balasubramaniam R, Longacre TA, Kong CS, Pinsky BA (2013) Laboratory-developed L1 sequencing and type-specific, real-time polymerase chain reaction for the detection and typing of human papillomaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Arch Pathol Lab Med* 137: 50-54.
43. Quddus MR, Manna P, Sung CJ, Kerley S, Steinhoff MM, et al. (2013) Prevalence, distribution, and viral burden of all 15 high-risk human papillomavirus types in adenocarcinoma of the uterine cervix: a multiplex real-time polymerase chain reaction-based study. *Hum Pathol*.

44. Chapman Lambert CL (2013) Factors influencing cervical cancer screening in women infected with HIV: a review of the literature. *J Assoc Nurses AIDS Care* 24: 189-197.
45. Kalliala I, Dyba T, Nieminen P, Hakulinen T, Anttila A (2010) Mortality in a long-term follow-up after treatment of CIN. *Int J Cancer* 126: 224-231.
46. Missaoui N, Trabelsi A, Landolsi H, Jaidaine L, Mokni M, et al. (2010) Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among Tunisian women. *Asian Pac J Cancer Prev* 11: 777-780.
47. Vale DB, Braganca JF, Morais SS, Zeferino LC (2014) Protection Against Squamous Cell Carcinoma and Cervical Adenocarcinoma Afforded by Cervical Cytology Screening: A Cross-Sectional Study. *Int J Gynecol Cancer*.
48. (2014) Clasificación de FIGO de los carcinomas cervicouterinos.
49. Mukhopadhyay S, Ray S, Dhar S, Bandyopadhyay R, Sinha SK (2013) Evaluation of the category high-grade squamous intraepithelial lesion in The Bethesda System for reporting cervical cytology. *J Cytol* 30: 33-35.
50. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* 370: 890-907.
51. Scholl SM, Kamal M, De Koning L, Kereszt A, Jordanova ES, et al. (2013) HPV pathway profiling: HPV related cervical dysplasia and carcinoma studies. *Curr Pharm Des* 19: 1379-1394.
52. Castaneda-Iniguez MS, Toledo-Cisneros R, Aguilera-Delgadillo M (1998) [Risk factors for cervico-uterine cancer in women in Zacatecas]. *Salud Publica Mex* 40: 330-338.
53. (2013) Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *66*: 207-217.
54. Lee M, Park EC, Chang HS, Kwon JA, Yoo KB, et al. (2013) Socioeconomic disparity in cervical cancer screening among Korean women: 1998-2010. *BMC Public Health* 13: 553.
55. Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST, et al. (2013) The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 128: 265-270.

56. Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, Colin D, Franceschi S, et al. (2006) Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 118: 1481-1495.
57. Bhatla N, Puri K, Joseph E, Kriplani A, Iyer VK, et al. (2013) Association of Chlamydia trachomatis infection with human papillomavirus (HPV) & cervical intraepithelial neoplasia - a pilot study. *Indian J Med Res* 137: 533-539.
58. Cassell JA (2013) Highlights from this issue. *Sexually Transmitted Infections* 89: 341-341.
59. Amirian ES, Adler-Storthz K, Scheurer ME (2013) Associations between human herpesvirus-6, human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Lett* 336: 18-23.
60. Sui S, Jiao Z, Niyazi M, S S, Lu P, et al. (2013) Genotype distribution and behavioral risk factor analysis of human papillomavirus infection in uyghur women. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 5861-5865.
61. Asiaf A, Ahmad ST, Mohammad SO, Zargar MA (2013) Review of the current knowledge on the epidemiology, pathogenesis, and prevention of human papillomavirus infection. *Eur J Cancer Prev*.
62. Han KT, Sin JI (2013) DNA vaccines targeting human papillomavirus-associated diseases: progresses in animal and clinical studies. *Clin Exp Vaccine Res* 2: 106-114.
63. Villa LL (2012) Cervical cancer in Latin America and the Caribbean: the problem and the way to solutions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21: 1409-1413.
64. Reade CJ, Eiriksson LR, Covens A (2013) Surgery for early stage cervical cancer: how radical should it be? *Gynecol Oncol* 131: 222-230.
65. Kasuya G, Ogawa K, Iraha S, Nagai Y, Hirakawa M, et al. (2013) Postoperative radiotherapy for uterine cervical cancer: impact of lymph node and histological type on survival. *Anticancer Res* 33: 2199-2204.
66. Zhang R, Li B, Bai P, Li HJ, Li SM, et al. (2011) [Neoadjuvant chemotherapy with paclitaxel and cisplatin or carboplatin for patients with locally advanced uterine cervical cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 33: 616-620.

67. Saitoh T, Kuramochi K, Imai T, Takata K, Takehara M, et al. (2008) Podophyllotoxin directly binds a hinge domain in E2 of HPV and inhibits an E2/E7 interaction in vitro. *Bioorg Med Chem* 16: 5815-5825.
68. Stern PL, van der Burg SH, Hampson IN, Broker TR, Fiander A, et al. (2012) Therapy of Human Papillomavirus-Related Disease. *Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases* 30, Supplement 5: F71-F82.
69. Hamont Dv, Ham MAPCv, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG (2006) Evaluation of the SPF10-INNO LiPA Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Test and the Roche Linear Array HPV Genotyping Test.
70. Sias C, Garbuglia AR, Piselli P, Cimaglia C, Lapa D, et al. (2013) Comparison of the Abbott RealTime High Risk HPV with Genomica HPV Clinical Array for the detection of human papillomavirus DNA. *Apmis* 121: 1054-1063.
71. Donà MG, Ronchetti L, Giuliani M, Carosi M, Rollo F, et al. (2013) Performance of the Linear Array HPV Genotyping Test on Paired Cytological and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Cervical Samples. *15*: 373-379.
72. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76 ( Pt 4): 1057-1062.
73. Rizzo JM, Buck MJ (2012) Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* 5: 887-900.
74. Hert DG, Fredlake CP, Barron AE (2008) Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis* 29: 4618-4626.
75. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 21: 1794-1805.
76. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Jr. LAD, et al. (2013) Cancer Genome Landscapes.
77. Lee W, Jiang Z, Liu J, Haverty PM, Guan Y, et al. (2010) The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature* 465: 473-477.



78. Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee S, Bleazard T, et al. (2012) A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res* 22: 436-445.
79. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, et al. (2011) The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333: 1157-1160.
80. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, et al. (2012) The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 486: 400-404.
81. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, et al. (2012) Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 486: 405-409.
82. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Pedamallu CS, Imaz-Rosshandler I, et al. (2013) Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*.
83. Wright AA, Massachusetts DFCIDoMOB, Massachusetts HMSB, Massachusetts DFCICfOaPRaPEaORB, Howitt BE, et al. Oncogenic mutations in cervical cancer. *Cancer* 119: 3776-3783.
84. Daniels M, Goh F, Wright CM, Sriram KB, Relan V, et al. (2012) Whole genome sequencing for lung cancer. 4.
85. Mendez R, Aptsiauri N, Del Campo A, Maleno I, Cabrera T, et al. (2009) HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol Immunother* 58: 1507-1515.
86. Aslanian FM, Marques MT, Matos HJ, Pontes LF, Porto LC, et al. (2006) HLA markers in familial Lichen sclerosis. *J Dtsch Dermatol Ges* 4: 842-847.
87. Trieb K, Lechleitner T, Lang S, Windhager R, Kotz R, et al. (1998) Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma. *Pathol Res Pract* 194: 679-684.
88. Kim MS, Lee SH, Yoo NJ (2013) Frameshift mutations of tumor suppressor gene EP300 in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability. *Hum Pathol* 44: 2064-2070.

89. Chung YR, Schatoff E, Abdel-Wahab O (2012) Epigenetic alterations in hematopoietic malignancies. *Int J Hematol* 96: 413-427.
90. Andersen CL, Asmar F, Klausen T, Hasselbalch H, Gronbaek K (2012) Somatic mutations of the CREBBP and EP300 genes affect response to histone deacetylase inhibition in malignant DLBCL clones. *Leuk Res Rep* 2: 1-3.
91. Bedford DC, Brindle PK (2012) Is histone acetylation the most important physiological function for CBP and p300? *Aging (Albany NY)* 4: 247-255.

# ANEXO 1



**DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA**

Investigador Principal  
Departamento de Bioquímica  
Presente.-

Estimado Dr. Barrera:

Le informo que nuestro **Comité de Ética** de la Facultad de Medicina de la UANL y Hospital Universitario "José Eleuterio González", ha **evaluado y aprobado** el siguiente protocolo de investigación titulado "**Genoma del Cáncer: Capítulo México: Búsqueda de biomarcadores en cáncer cervicouterino**", participando además la Dra. en C. María de Lourdes Garza Rodríguez y el Dr. Lezmes Dionicio Valdez Chapa como Co-Investigadores.

Su proyecto quedó registrado en esta Subdirección con la clave **BI11-002**. Este número es necesario para la autorización de los servicios de apoyo a la investigación

Le pedimos mantenernos informados del avance o terminación de su proyecto.

Sin más por el momento, me despido de usted.

Atentamente,  
"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey N.L., a 10 de Agosto del 2011

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



**DR. JOSÉ GERARDO GARZA LEAL**

COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Secretario de Investigación Clínica  
Presidente del Comité de Ética y Comité de Investigación

**SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN**

Edificio de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. planta baja.  
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Dr. E. Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, C.P. 64460 Monterrey, N.L. México  
Tel./Fax (+52) 8329 4050 Ext. 2871 al 2874. Correo Electrónico: [sinvestigacion@hu.uanl.mx](mailto:sinvestigacion@hu.uanl.mx)

# ANEXO 2

Folio:

Muestra:

Paciente:

Dirección:

Teléfono:

Origen:

Tipo:

Estadio:

Estado civil:

Ocupación:

Escolaridad:

FUM:

Menarquia:

IVSA:

CS:

G: P: C: A:

ETS:

Antecedentes personales.

Tabaco: Alcohol:

Drogas:

ACO:

Síntomas:

Sangrado transvaginal:

Sangrado Post coito:

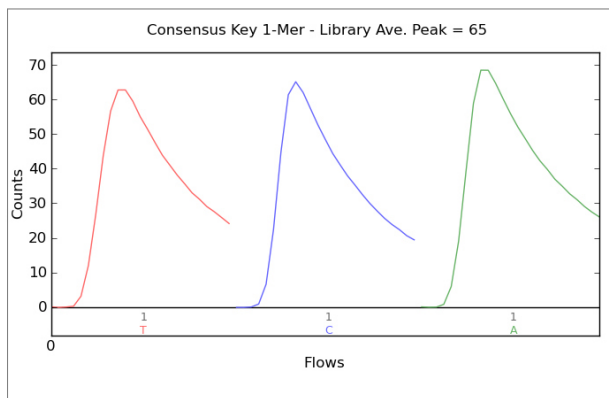
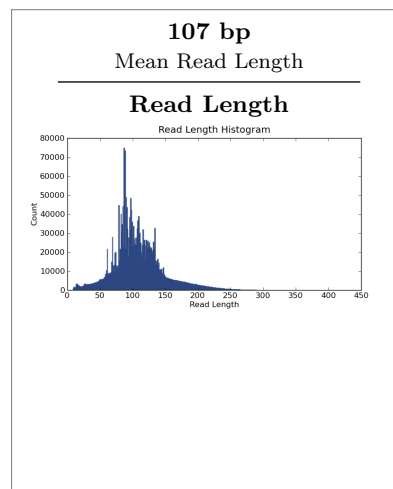
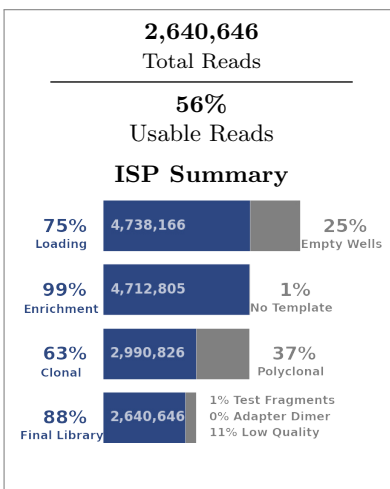
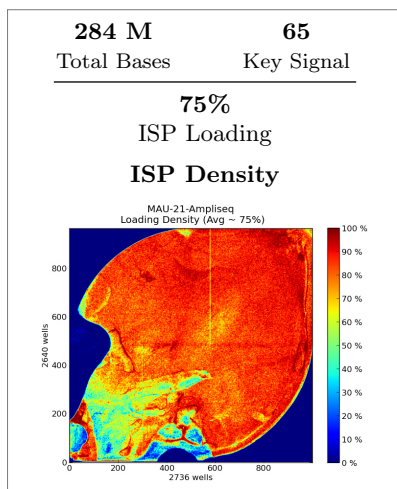
Dolor pélvico:

AHF:

Antecedentes cáncer:

# ANEXO 3

## Run Summary



<b>Addressable Wells</b>	<b>6,348,229</b>
With ISPs	4,738,166 74.6%
Live	4,712,805 99.5%
Test Fragment	15,092 00.3%
Library	4,697,713 99.7%
<b>Library ISPs</b>	<b>4,697,713</b>
Filtered: Polyclonal	1,721,979 36.7%
Filtered: Low Quality	332,254 07.1%
Filtered: Primer Dimer	2,834 00.1%
<b>Final Library ISPs</b>	<b>2,640,646 56.2%</b>

Barcode Name	Sample	Bases	$\geq Q20$	Reads	Mean Read Length
No barcode	None	12,006,000	9,246,654	126,646	94 bp
IonXpress_037	31	19,297,284	17,204,404	168,045	114 bp
IonXpress_038	9	17,865,129	15,813,423	152,912	116 bp
IonXpress_039	26	15,539,079	13,775,275	136,279	114 bp
IonXpress_040	28	23,797,980	21,122,920	231,696	102 bp
IonXpress_043	119	20,825,875	18,208,657	181,244	114 bp
IonXpress_044	120	9,730,753	8,745,474	97,554	99 bp
IonXpress_045	104	23,770,400	21,077,387	208,386	114 bp
IonXpress_046	105	29,682,911	26,446,878	291,408	101 bp
IonXpress_047	110	5,670,328	4,982,741	45,879	123 bp
IonXpress_048	108	22,545,030	20,292,591	232,144	97 bp
IonXpress_049	111	13,386,086	12,049,262	139,899	95 bp




## Run Report for AmpliSeq

---

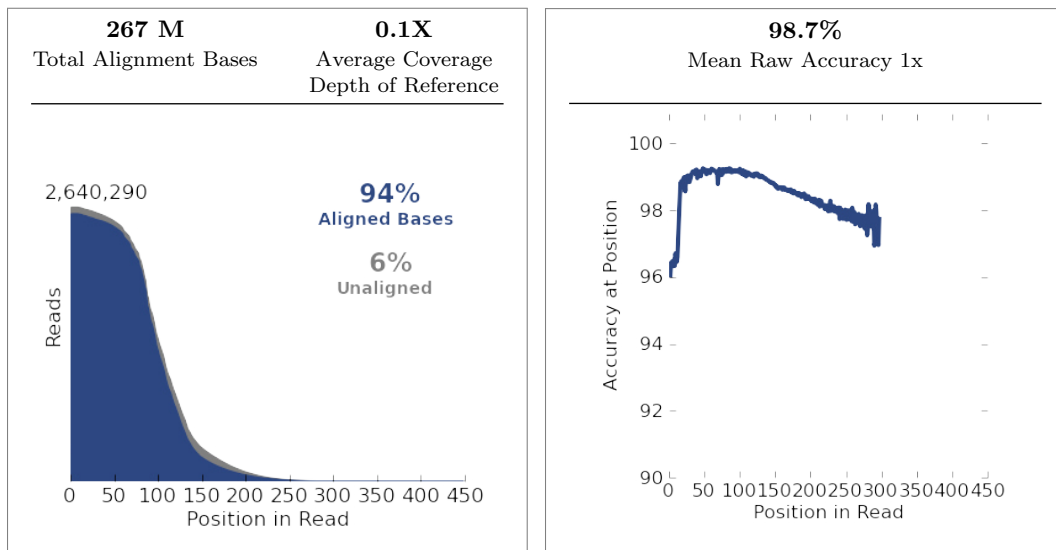
IonXpress_050	109		23,549,119	21,044,344	224,601	104 bp
IonXpress_051	113		29,639,949	26,152,979	251,906	117 bp
IonXpress_052	112		16,952,838	14,894,314	151,690	111 bp

---

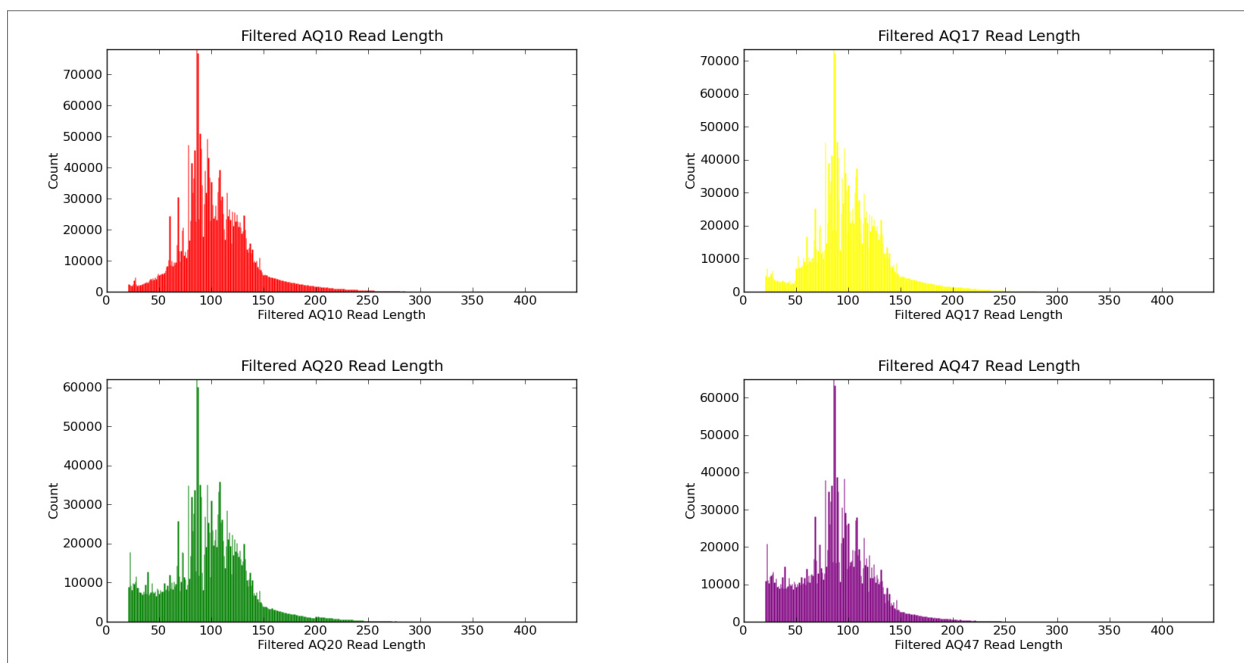
Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Read Length Histogram
<b>TF_A</b>	<b>14,662</b>	<b>95%</b>	

---

## Alignment Summary *(aligned to Homo sapiens)*



	AQ17	AQ20	Perfect
<b>Total Number of Bases [Mbp]</b>	232 M	204 M	179 M
<b>Mean Length [bp]</b>	102	97	88
<b>Longest Alignment [bp]</b>	355	342	329
<b>Mean Coverage Depth</b>	0.1	0.1	0.1



coverageAnalysis

**Barcode Summary Report**

<u>Barcode ID</u>	<u>Mapped Reads</u>	<u>On Target</u>	<u>Mean Depth</u>	<u>Uniformity</u>
<a href="#">lonXpress_037</a>	146,996	93.43%	224.8	84.13%
<a href="#">lonXpress_038</a>	152,114	94.58%	225.4	82.55%
<a href="#">lonXpress_039</a>	135,031	61.47%	119.4	62.10%
<a href="#">lonXpress_040</a>	229,318	22.98%	73.59	52.19%
<a href="#">lonXpress_043</a>	179,871	47.17%	121.7	51.46%
<a href="#">lonXpress_044</a>	96,956	90.45%	125.8	71.38%
<a href="#">lonXpress_045</a>	206,849	8.50%	24.45	44.89%
<a href="#">lonXpress_046</a>	289,472	70.23%	292.5	40.75%
<a href="#">lonXpress_047</a>	45,603	0.48%	0.316	100.00%
<a href="#">lonXpress_048</a>	230,197	88.86%	292.1	62.75%
<a href="#">lonXpress_049</a>	138,931	94.48%	188.1	53.00%
<a href="#">lonXpress_050</a>	223,049	86.06%	283.8	55.34%
<a href="#">lonXpress_051</a>	250,311	40.46%	151.2	66.88%
<a href="#">lonXpress_052</a>	150,502	25.39%	54.22	60.57%

sampleID

**Barcode Summary Report**

<u>Barcode ID</u>	<u>Sample ID</u>	<u>Reads On-Target</u>	<u>Read Depth</u>	<u>20x Coverage</u>	<u>100x Coverage</u>
<a href="#">lonXpress_037</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_038</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_039</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_040</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_043</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_044</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_045</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_046</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_047</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_048</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_049</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_050</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_051</a>	N/A	1	0.0	0.0%	0.0%
<a href="#">lonXpress_052</a>	N/A	0	0.0	0.0%	0.0%

## variantCaller

Library type: AmpliSeq  
 Targeted regions: IAD35225\_Designed  
 Hotspot regions: None  
 Configuration: Germ Line - High Stringency  
 Download all barcodes: [\[VCF.ZIP\]](#) [\[XLS.ZIP\]](#)

Barcode Name	Sample Name	Variants	Download Links
<a href="#">IonXpress_037</a>	31	96	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_038</a>	9	125	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_039</a>	26	64	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_040</a>	28	55	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_043</a>	119	32	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_044</a>	120	92	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_045</a>	104	18	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_046</a>	105	57	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_047</a>	110	0	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_048</a>	108	88	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_049</a>	111	58	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_050</a>	109	64	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_051</a>	113	56	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>
<a href="#">IonXpress_052</a>	112	26	<a href="#">[VCF.GZ]</a> <a href="#">[VCF.GZ.TBI]</a> <a href="#">[XLS]</a>

## Analysis Details











































<b>Run Name</b>	R_2013_12_11_12_18_39_user_MAU-21-Ampliseq
<b>Run Date</b>	Dec. 11, 2013, 12:18 p.m.
<b>Run Flows</b>	600
<b>Projects</b>	Ampliseq
<b>Sample</b>	104, 105, 26, 31, 28, 120, 108, 109, 116, 110, 113, 112, 9, 111, 103, 119
<b>Reference</b>	
<b>PGM</b>	MAUL
<b>Flow Order</b>	TACGTACGTCTGAGCATCGATCGATGTACAGC
<b>Library Key</b>	TCAG
<b>TF Key</b>	ATCG
<b>Chip Check</b>	Passed
<b>Chip Type</b>	316D
<b>Chip Data</b>	single
<b>Barcode Set</b>	IonXpress
<b>Analysis Name</b>	AmpliSeq
<b>Analysis Date</b>	Dec. 12, 2013, 1:43 p.m.
<b>Analysis Flows</b>	600
<b>runID</b>	6BIZF

## Software Version




<b>Torrent_Suite</b>	3.6.2
<b>host</b>	ion-torrent-server
<b>ion-alignment</b>	3.6.3-1
<b>ion-analysis</b>	3.6.39-1
<b>ion-dbreports</b>	3.6.52-1
<b>ion-gpu</b>	3.6.5-1
<b>ion-pipeline</b>	3.6.25-1
<b>ion-plugins</b>	3.6.45-1
<b>ion-torrentr</b>	3.6.9-1
<b>Script</b>	21.3.1
<b>LiveView</b>	519
<b>DataCollect</b>	447
<b>OS</b>	20
<b>Graphics</b>	32

# ANEXO 4

Gen	Frecuencia	Cromosoma	Clasificación	Tipo	Referencia	Tumor
EP300	18	22	Intron	SNP	T	C
EP300	18	22	Silent	SNP	T	A
TP53	17	17	Intron	SNP	C	T
EP300	16	22	Missense_M	SNP	A	G
HLA-B	15	6	Silent	SNP	A	G
HLA-A	15	6	Intron	SNP	A	G
HLA-A	15	6	Intron	SNP	A	G
HLA-A	15	6	Silent	SNP	C	T
HLA-A	14	6	3'UTR	SNP	T	G
MAPK1	14	22	3'UTR	SNP	C	G
ZNF706	13	8	3'UTR	SNP	A	T
HLA-B	13	6	Silent	SNP	T	C
TUBGCP6	12	22	Missense_M	SNP	A	G
HLA-B	11	6	3'UTR	SNP	G	A
HLA-A	11	6	3'UTR	SNP	G	T
HLA-A	11	6	Intron	SNP	T	C
HLA-B	10	6	Intron	SNP	C	G
HLA-A	10	6	Silent	SNP	C	T
HLA-A	10	6	Missense_M	SNP	T	C
ERBB2	9	17	Intron	SNP	C	T
HLA-B	9	6	Silent	SNP	C	T
HLA-A	9	6	Missense_M	SNP	A	T
HLA-A	9	6	Silent	SNP	T	C
HLA-A	9	6	Intron	SNP	T	C
HLA-A	9	6	Missense_M	SNP	T	C
HLA-A	9	6	Missense_M	SNP	G	A
PIK3CA	8	3	Intron	SNP	C	A
EP300	8	22	3'UTR	DEL	TGTA	T
HLA-B	8	6	5'Flank	SNP	T	C
HLA-B	8	6	5'Flank	SNP	A	G
HLA-B	8	6	5'Flank	SNP	G	C
HLA-B	8	6	Silent	SNP	A	G
HLA-A	8	6	Intron	SNP	G	A
HLA-A	8	6	Intron	SNP	T	C
HLA-A	8	6	Missense_M	SNP	C	A
HLA-A	8	6	Intron	SNP	C	T
MAPK1	8	22	3'UTR	SNP	C	G
MAPK1	8	22	3'UTR	SNP	T	C
PTEN	7	10	3'UTR	SNP	C	T
TUBGCP6	7	22	Intron	SNP	A	G
KRTAP4-11	7	17	Missense_M	SNP	C	T

KRTAP4-11		7	17 Missense_M	SNP	G	C
HLA-B		7	6 5'UTR	SNP	C	T
HLA-B		7	6 Missense_M	SNP	A	C
HLA-B		7	6 Missense_M	SNP	T	G
HLA-B		7	6 Missense_M	SNP	C	G
HLA-B		7	6 Silent	SNP	A	C
HLA-A		7	6 Silent	SNP	C	A
HLA-A		7	6 Intron	SNP	G	C
TP53		7	17 Missense_M	SNP	G	C
FBXW7		6	4 Intron	SNP	T	A
EP300		6	22 Intron	SNP	C	T
HLA-B		6	6 5'Flank	SNP	G	A
HLA-B		6	6 5'Flank	SNP	G	A
HLA-B		6	6 Missense_M	SNP	A	G
HLA-B		6	6 Missense_M	SNP	G	C
HLA-A		6	6 3'UTR	SNP	C	G
HLA-A		6	6 Intron	SNP	T	C
HLA-A		6	6 Intron	SNP	G	C
HLA-A		6	6 Missense_M	SNP	C	T
HLA-A		6	6 Intron	DEL	TGGA	T
HLA-A		6	6 Intron	SNP	C	T
HLA-A		6	6 Intron	SNP	C	A
HLA-A		6	6 Missense_M	SNP	G	T
HLA-A		6	6 Silent	SNP	G	C
HLA-A		6	6 Missense_M	SNP	A	T
HLA-A		6	6 Silent	SNP	C	T
MAPK1		6	22 3'UTR	SNP	C	T
FBXW7		5	4 5'UTR	SNP	A	G
HLA-B		5	6 Intron	SNP	G	A
HLA-B		5	6 3'UTR	SNP	C	A
HLA-B		5	6 3'UTR	SNP	A	G
HLA-B		5	6 3'UTR	SNP	A	C
HLA-B		5	6 Intron	SNP	C	T
HLA-A		5	6 3'UTR	SNP	A	G
HLA-A		5	6 3'UTR	SNP	C	A
HLA-A		5	6 3'UTR	SNP	G	A
HLA-A		5	6 3'UTR	SNP	G	A
HLA-A		5	6 Intron	SNP	G	A
HLA-A		5	6 Missense_M	SNP	G	C
HLA-A		5	6 Missense_M	SNP	A	G
HLA-A		5	6 Silent	SNP	G	A
HLA-A		5	6 Intron	SNP	T	C



HLA-A		5	6 Silent	SNP	C	T
HLA-A		5	6 Silent	SNP	G	T
EP300		4	22 3'UTR	DEL	TCACACACA(T	

Genome_Change	Protein_Change
g.chr22:41568480T>C	
g.chr22:41551039T>A	p.T1061T
g.chr17:7578645C>T	
g.chr22:41548008A>G	p.I997V
g.chr6:31323233A>G	p.T252T
g.chr6:29913078A>G	
g.chr6:29913074A>G	
g.chr6:29913042C>T	p.S359S
g.chr6:29913542T>G	
g.chr22:22115004C>G	
g.chr8:102209357A>T	
g.chr6:31323215T>C	p.R258R
g.chr22:50664612A>G	p.L567S
g.chr6:31321807G>A	
g.chr6:29913344G>T	
g.chr6:29913067T>C	
g.chr6:31322470C>G	
g.chr6:29912368C>T	p.A329A
g.chr6:29910558T>C	p.F33S
g.chr17:37868715C>T	
g.chr6:31322996C>T	p.P300P
g.chr6:29912856A>T	p.T345S
g.chr6:29912852T>C	p.S343S
g.chr6:29912830T>C	
g.chr6:29912280T>C	p.L300P
g.chr6:29911114G>A	p.R138Q
g.chr3:178922274C>A	
g.chr22:41574969_41574972TGTA>T	
g.chr6:31325030T>C	
g.chr6:31325028A>G	
g.chr6:31324996G>C	
g.chr6:31322888A>G	p.S336S
g.chr6:29913192G>A	
g.chr6:29913191T>C	
g.chr6:29911154C>A	p.N151K
g.chr6:29910527C>T	
g.chr22:22116202C>G	
g.chr22:22115498T>C	
g.chr10:89727414C>T	
g.chr22:50658053A>G	
g.chr17:39274518C>T	p.R17Q

g.chr17:39274069G>C	p.R167G
g.chr6:31324953C>T	
g.chr6:31324931A>C	p.L2R
g.chr6:31323958T>G	p.K202T
g.chr6:31323953C>G	p.E204Q
g.chr6:31323945A>C	p.A206A
g.chr6:29910604C>A	p.A48A
g.chr6:29910522G>C	
g.chr17:7579472G>C	p.P72R
g.chr4:153333100T>A	
g.chr22:41550954C>T	
g.chr6:31325049G>A	
g.chr6:31325004G>A	
g.chr6:31324925A>G	p.M4T
g.chr6:31323960G>C	p.D201E
g.chr6:29913449C>G	
g.chr6:29913197T>C	
g.chr6:29913070G>C	
g.chr6:29912333C>T	p.L318F
g.chr6:29912227_29912230TGGA>T	
g.chr6:29912204C>T	
g.chr6:29911344C>A	
g.chr6:29911119G>T	p.D140Y
g.chr6:29911115G>C	p.R138R
g.chr6:29911069A>T	p.Y123F
g.chr6:29910538C>T	p.S26S
g.chr22:22115886C>T	
g.chr4:153456102A>G	
g.chr6:31323012G>A	
g.chr6:31322026C>A	
g.chr6:31321856A>G	
g.chr6:31321685A>C	
g.chr6:31321623C>T	
g.chr6:29913526A>G	
g.chr6:29913518C>A	
g.chr6:29913495G>A	
g.chr6:29913468G>A	
g.chr6:29912796G>A	
g.chr6:29912386G>C	p.K335N
g.chr6:29912297A>G	p.I306V
g.chr6:29912281G>A	p.L300L
g.chr6:29912188T>C	

g.chr6:29912147C>T                      p.L290L  
g.chr6:29911319G>T                      p.T206T  
g.chr22:41575884\_41575898TCACACACACACA>T