



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
ZACATECAS  
"Francisco García Salinas"

UACQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO  
PROFESIONALES  
DE LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"

## ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEOTIDO (SNP P72R) DEL GEN TP53 CON LA PRESENCIA DE VPH

Galván Martínez Dax Humberto<sup>1</sup>, Del Rio Robles Jorge Eduardo<sup>1</sup>, Reyes López Adrián<sup>1</sup>, López Saucedo Adrián<sup>2</sup>, Hernández Barrales Marisa<sup>1</sup>, Ayala Luján Jorge Luis<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad Académica de Ciencias Químicas

<sup>2</sup>Unidad Académica de Medicina Humana

Laboratorio de Patología Oncológica Zacatecas  
Universidad Autónoma de Zacatecas

### RESUMEN

La proteína supresora de tumores p53 es codificada por el gen TP53. Se han identificado varios Polimorfismos de un Solo Nucleotido (SNP's) del gen TP53, entre ellos el SNP P72R (C>G) que se ha asociado con la susceptibilidad a desarrollar distintos tipos de neoplasias. En infecciones por Virus del Papiloma Humano (VPH) hay una expresión de las oncoproteínas E6 y E7 que son los factores virales responsables de la iniciación y progresión de Cáncer Cervicouterino (CaCu). Diversos estudios sugieren que el alelo CC favorece la degradación de p53 por parte de E6 en comparación con el alelo GG. Se analizaron 95 muestras citológicas de cérvix de las cuales 46.31% resultaron positivas a VPH. El análisis del SNP mostró una relación entre los genotipo del SNP P72R con la presencia de VPH, siendo así que en pacientes homocigotos para el alelo G tienen un riesgo mayor (OR:7.292) a adquirir una infección por VPH en comparación con el grupo control.

### INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública a nivel nacional e internacional. De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), desde el año 2012 el CaCu ocupa el cuarto lugar a nivel mundial como neoplasia más frecuente en mujeres, con aproximadamente 528,000 nuevos casos diagnosticados y 266,00 muertes<sup>1</sup>; en México es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años<sup>2</sup>.

La infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), es la enfermedad de transmisión sexual viral más frecuente a nivel mundial<sup>3</sup>. Se conocen más de 100 genotipos de VPH, de los cuales aproximadamente 40 son capaces de infectar la mucosa del tracto anogenital y, 12 de ellos representan más del 99.8% de tipos virales asociados a CaCu; debido a que la integración del genoma viral en la



FORMANDO  
PROFESIONALES  
DE LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



célula hospedadora conduce a una inhibición de la apoptosis, y, posteriormente a una transformación celular que conduce a lesiones epiteliales que podrían considerarse pre-malignas<sup>2,3</sup>.

Diversos estudios han definido algunos factores de riesgo para el desarrollo de CaCu (el genotipo, carga y persistencia de VPH; co-infección por *Chlamydia trachomatis*, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH); consumo de anticonceptivos orales, de alcohol y drogas de abuso; el sistema inmune de la paciente; y factores genéticos) y marcadores moleculares que predicen el comportamiento de una lesión pre-maligna asociada a VPH, como la pérdida de la función de genes supresores de tumores debido a la presencia de las oncoproteínas virales E6 y E7<sup>4</sup>.

El gen TP53, localizado en 17p13.1, codifica para una fosfoproteína de 53 kDa (p53) que en condiciones normales se encarga de preservar la estabilidad genómica como respuesta a estímulos causantes de estrés celular<sup>5</sup>. En un 60% de procesos neoplásicos existen mutaciones en el gen TP53. El SNP en el codón 72 del exón 4 de TP53 (P72R) se ha asociado con la susceptibilidad a distintos tipos de cáncer como: cáncer de mama, gástrico, de ovario, colon, laringe, de piel, de próstata, CaCu, entre otros<sup>6</sup>.

El SNP P72R es un cambio C>G en la secuencia CCC, que codifica a una Prolina (P72), a CGC que codifica para Arginina (R72); lo que resulta en un cambio estructural en la proteína p53, afectando su función apoptótica<sup>6</sup>. Durante el proceso de infección por VPH, hay expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 que son los factores virales responsables de la iniciación y la preogresión de CaCu; la oncoproteína viral E6 se une a p53 y la conduce a su degradación a través de la vía de la ubiquitina. Algunos estudios sugieren que E6, tanto de los genotipos de bajo y alto riesgo de VPH, tiene una mayor afinidad por el alelo G comparado con el alelo C; de este modo, un individuo homocigoto C tiene un riesgo genético mayor a desarrollar CaCu por infección de VPH<sup>7</sup>.

El objetivo de este estudio fue conocer la relación alélica del SNP P72R del gen TP53 con la presencia de VPH en muestras de Citología Base Líquida de pacientes en el Estado de Zacatecas.

## METODOLOGÍA

*Recolección de las muestras.* Se recolectaron muestras de raspado cervical preservadas en fijador citológico. Las muestras provienen de un grupo de pacientes que acudieron a revisión rutinaria en diferentes centros de salud del Estado de Zacatecas, clínica del ISSSTE y de consultorios privados de la capital del estado.

*Extracción y análisis de integridad del ADN.* Con los kits comerciales High Pure PCR Template Preparation Kit de ROCHE® Life Science y Ambion's MagMax® Viral Isolation Kit, se realizó la extracción de ADN; el cual se cuantificó mediante espectrofotometría UV-Vis. La integridad de nuestro material genético



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
ZACATECAS  
"Francisco García Salinas"

UACQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO  
PROFESIONALES  
DE LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"

extraído se evaluó amplificando una región del gen  $\beta$ -globina por PCR punto final, el cual se expresa constitutivamente, con los primers PCO4 (5' CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TAC-CC 3') y KM29 (5' GGT-TGG-CCA-ATC-TAC-TCC-CAG-G 3'); con un volumen final de 25  $\mu$ l. Los amplicones obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.2% utilizando Bromuro de Etidio (BrEt) como agente intercalante.

*Detección de VPH.* Se realizó amplificando una región del gen L1 viral por PCR punto final utilizando los primers GP5+ (5' GAA-AAA-TAA-ACT-GTA-AAT-CAT-ATT-C 3') y GP6+ (5' CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC 3'), en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l. Los amplicones se caracterizaron en gel de agarosa al 2% con BrEt. Se utilizó ADN de las líneas celulares Siha y Caski como control positivo.

*Genotipificación del SNP P72R.* Por medio de PCR convencional se amplificó un segmento del gen TP53 de 279 pb, en donde se encuentra el SNP P72R, utilizando la secuencia de primers 72F (5' TCC-CCC-TTG-CCG-TCC-CAA 3') y 72R (5' CGT-GCA- AGT-CAC-AGA-CTT 3'); ajustando el volumen final con agua libre de nucleasas a 25  $\mu$ l. La identificación del SNP se realizó mediante la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), sometiendo a digestión los amplicones con la endonucleasa BstUI (USBiological®) por 2 horas a 37°C. Los productos de las digestiones se revelaron en gel de agarosa al 2.5% con BrEt para la identificación de los genotipos del SNP P72R.

*Análisis estadístico de los datos.* Se realizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para evaluar el equilibrio genotípico y alélico, la prueba de bondad y ajuste Chi y, la razón de momios (OR); las diferencias se consideran significativas cuando  $p < 0.05$ .

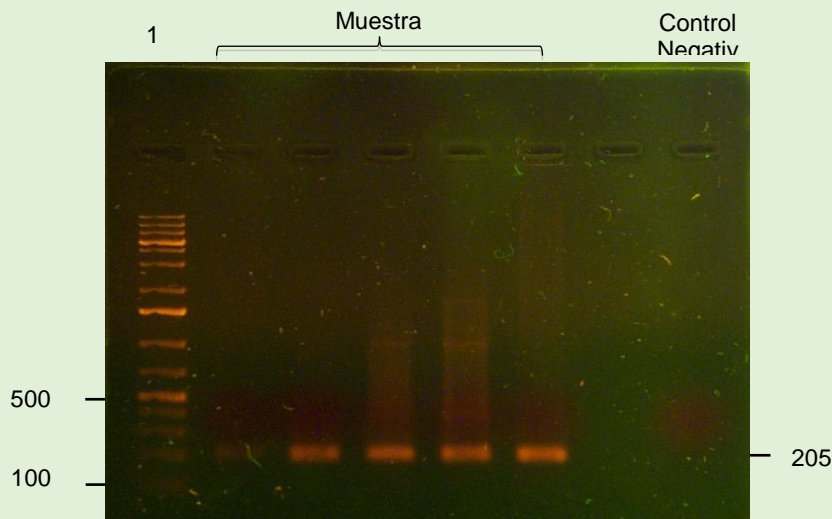
## RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 95 muestras de citología base líquida con previo diagnóstico citopatológico. El grupo control se conformó por muestras negativas a lesión intraepitelial o malignidad (NM), mientras que en el grupo de casos se incluyeron lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de alto y bajo grado.

Las muestras que amplificaron el segmento del gen  $\beta$ -globina demostraron que el ADN extraído presentaba una buena calidad y que se encontraba íntegro para realizar estudios moleculares (Figura 1).

Figura 1

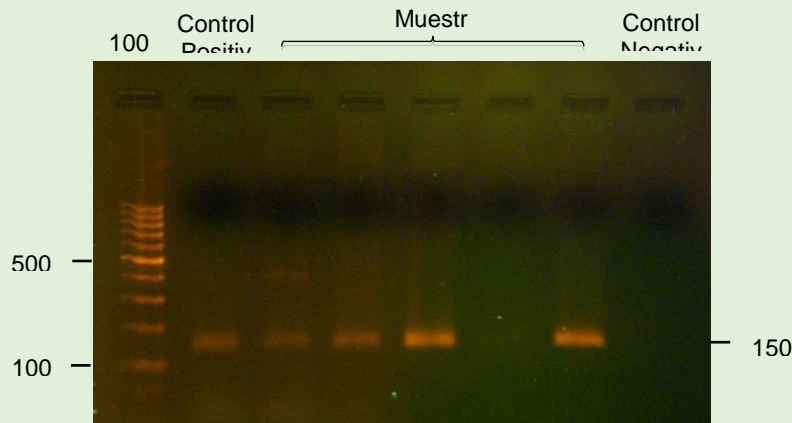
**Fragmento del gen  $\beta$ -globina.** Se muestran diferentes amplificaciones por PCR convencional de



ADN extraído de muestras de citología base líquida. Las muestras positivas se indican en la parte superior de la imagen, además se indica el control negativo de la reacción. Gel de agarosa al 1.2% en TBE 1X con BrEt.

Un 46.31% de las muestras analizadas fue positiva a VPH al amplificar un fragmento de la secuencia viral L1 por PCR punto final, un amplicón de 150 pb resulta en una muestra positiva, como se muestra en la Figura 2.

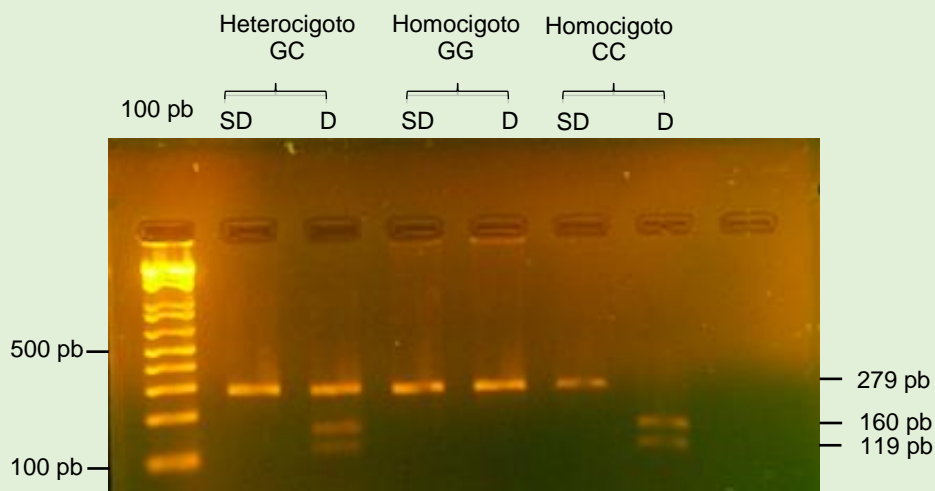
Figura 2



**Amplificación de un fragmento del gen L1 de VPH.** Se presenta un grupo de muestras representativas de la amplificación de la región viral L1, las cuales se indican con una línea en la parte superior de la imagen. El control positivo corresponde a ADN de la línea celular SiHa, mientras que el control negativo corresponde a la reacción de PCR. Gel de agarosa al 2% en TBE 1X con BrEt como agente intercalante.

Los amplificadores de 279 pb fueron sometidos a digestión para la identificación del SNP P72R del gen TP53. En la Figura 3 se muestra el patrón de bandeo para la identificación del genotipo correspondiente.

**Figura 3**



**RFLP's del amplificado de 279 pb del gen TP53.** Se muestran los 3 patrones del corte de la endonucleasa BstUI; en individuos heterocigotos (GC) se visualizan 3 bandas de distinto peso (279, 160 y 119 pb); aquellos homocigotos (GG) conservan la banda de 279 pb debido a que se elimina el sitio de corte de la enzima; y en homocigotos (CC) hay presencia de dos bandas de 160 y 119 pb. Gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X con BrEt. SD: Muestra sin digerir, D: Muestra digerida.

La población cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=0.8693$ ), donde la frecuencia alélica para R72 es de 71.58% y de 28.42% para el alelo P72 (Tabla 1).

**Tabla1. Análisis estadístico del genotipo P72R (Equilibrio de Hardy-Weinberg)**

Genotipo	Frecuencia Obtenida	Frecuencia Esperada	Valor <i>P</i>
CC	38	38.65	0.8693
GC	49	48.67	
GG	8	7.67	
Total	95	95	

A través de  $\chi^2$  se obtuvo un valor  $p>0.05$ . Con un intervalo de confianza (IC) de 95%.

Los genotipos del SNP P72R del gen TP53 se analizaron como factor de riesgo para la presencia del VPH. El genotipo más frecuente corresponde al CC (54.34%) en el grupo control. Cuando se toma como alelo de riesgo a C, se observa una asociación estadística entre el genotipo GC (OR: 0.129,  $P=0.03834$ ), CC



FORMANDO  
PROFESIONALES  
DE LA QUÍMICA

"UN PILAR DE CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"



FECHAS 2017  
29 al 31 de Agosto

(OR:0.137,  $P=0.04254$ ), y un menor riesgo a la presencia de VPH con respecto al grupo control; sin embargo, al tomar como alelo de riesgo a G, se observa una diferencia significativa entre el genotipo GG (OR: 7.292,  $P=0.04254$ ), con un riesgo mayor a la infección por VPH 7.292 veces en comparación con el grupo control.

Tabla 2. Análisis de riesgo del SNP P72R (OR)

Genotipo	Controles n=46	Casos n=49	OR	IC (95%)	Valor <i>P</i>
<b>Riesgo del alelo C</b>					
GG	2.17% (1)	14.28% (7)	1 (Referencia)	-	-
GC	43.47% (20)	36.73% (18)	0.129	0.014 – 1.149	0.03834
CC	54.34% (25)	48.97% (24)	0.137	0.016 – 1.200	0.04254
C vs G	78.26% (70)	67.34% (66)	0.648	0.342 – 1.1228	0.18193
<b>Riesgo del alelo G</b>					
CC	54.34% (25)	48.97% (24)	1 (Referencia)	-	-
GC	43.47% (20)	36.73% (18)	0.938	0.401 – 2.189	0.88143
GG	2.17% (1)	14.28% (7)	7.292	0.833 – 63.790	0.04254
G vs C	23.91% (22)	32.65% (29)	1.543	0.815 – 2.921	0.18193

## CONCLUSIONES

Del total de muestras analizadas un 46.31% resultaron positivas a VPH. La población estudiada se encuentra en equilibrio de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg. Existe una relación entre los genotipos del SNP P72R del gen TP53 con la presencia de VPH de tal manera que un homocigoto para el alelo G tiene un mayor riesgo (7.292 veces) a adquirir una infección por VPH que un homocigoto para C.



UAZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
ZACATECAS  
"Francisco García Salinas"

UACQ



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS

FORMANDO  
PROFESIONALES  
DE LA QUÍMICA"UN PILAR DE CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA EN ZACATECAS"FECHAS 2017  
29 al 31 de Agosto

## REFERENCIAS

1. World Health Organization. *GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*, International Agency for Research on Cancer, consultada por Internet el 22 de Septiembre del 2017. Dirección de internet: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
2. López A., Lozano M. (2006). *Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina*. Rev. Cancerología. 1, 31-55.
3. Woodman C.B. et al. (2007) *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*, Nature Reviews, 7, 11-22.
4. Sam S.S., et al. (2011). *Virus del papiloma humano y adolescencia*, Ginecología y Obstetricia de México, 4(74), 214-224.
5. Bieging KT, et al. (2014). *Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression*, Nature Reviews Cancer, 1-12.
6. Pietsch EC, et al. (2006). *Polymorphisms in the p53 pathway*, Oncogene, 25:1602-1611.
7. Whibley C, et al. (2009). *p53 polymorphisms: cancer implications*, Nature Reviews, 9, 95-10.