



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Análisis de las mutaciones E542K y E545K del
gen *PIK3CA* en el cáncer cervical**

TESIS

Que presenta

LEONARDO TRUJILLO CIRILO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de tesis:

Dr. Jaime Berumen Campos

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Ciudad de México

AGOSTO, 2016

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Medicina Genómica del Hospital General de México (HMG) "Eduardo Liceaga" bajo la tutoría del Dr Jaime Berumen Campos y el Dr Nicolás Villegas Sepúlveda. Durante el periodo de la maestría se contó con el apoyo de una beca estudiantil otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos.

Al programa de Maestría en Ciencias en la especialidad de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A mis tutores;

Al Dr Jaime Berumen Campos por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por sus enseñanzas.

Al Dr Nicolás Villegas Sepúlveda por su asesoría y cotutoría en el proyecto.

A mis asesores el Dr Vianney Ortiz Navarrete y el Dr Miguel Ángel Vargas Mejía por formar parte del comité y por sus observaciones sobre el proyecto.

A la M en C Eligia Juárez por su asesoría y enseñanza en la parte experimental y a la técnica Norma Mateos por su apoyo.

A la Dra Ana Alfaro por su asesoría en la parte estadística y discusión de resultados.

A todos los integrantes de la Unidad de Medicina Genómica del HGM por sus atenciones.

A mis compañeros del posgrado por su amistad, en especial a Pedro A, Pedro N, Noé y Lorena.

Dedicatorias.

A mi madre, Guadalupe Cirilo Flores por su apoyo y confianza en cada una de las decisiones que he tomado.

A mis hermanos, por su interés y apoyo.

A mis amigos, por estar siempre presentes.

**ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES E542K Y E545K DEL GEN
PIK3CA EN EL CÁNCER CERVICAL**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

LEONARDO TRUJILLO CIRILO

Ciudad de México

AGOSTO, 2016

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	27
SELECCIÓN DE PACIENTES, DISEÑO DEL ESTUDIO Y PUNTOS FINALES	28
AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN 9 DE <i>PIK3CA</i>	29
PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	29
IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES POR SNAPSHOT	30
POST-EXTENSIÓN	30
SECUENCIACIÓN TIPO SANGER	31
ELECTROFORESIS CAPILAR	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
RESULTADOS	33
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES CON CC Y MUJERES SANAS	34
FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES DE <i>PIK3CA</i> EN PACIENTES CON CC Y MUJERESSANAS	35
ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES E542K Y E545K POR EDAD	35
ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES E542K Y E545K POR TIPO VIRAL	38
FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES DE <i>PIK3CA</i> DE ACUERDO AL TIPO HISTOLÓGICO Y FIGO	40
ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON CC POR GRUPOS DE EDAD	41
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	50
BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABD.....	DOMINIO DE UNIÓN A LA SUBUNIDAD REGULADORA
AKT.....	CINASA SERINA/TREONINA
BAD.....	PROMOTOR DE MUERTE ASOCIADO A BCL2
Bcl-2.....	LINFOMA DE CÉLULAS B-2
CC.....	CÁNCER CERVICAL
CDK.....	CINASA DEPENDIENTE DE CICLINA
CDKS.....	CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS
CNA.....	ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS
ddDNTs.....	DIDEOXINUCLEÓTIDOS
DNA.....	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
DNTPs.....	DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS TRIFOSFATO
E542K.....	SUSTITUCIÓN DE UN ÁCIDO GLUTÁMICO POR UNA LISINA EN LA POSICIÓN 542
E545K.....	SUSTITUCIÓN DE UN ÁCIDO GLUTÁMICO POR UNA LISINA EN LA POSICIÓN 545
E6-AP.....	PROTEÍNA ASOCIADA A LA PROTEÍNA E6
FASL.....	LIGANDO DE FAS
FIGO.....	FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
GLUT-4.....	TRANSPORTADOR DE GLUCOSA 4
GSK3B.....	CINASA GLUCÓGENO SINTASA- 3
HIF.....	FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA
Kb.....	KILO BASE
KDa.....	KILO DALTON
LIE.....	LESIÓN INTRAEPITELIAL
MTOR.....	BLANCO DE RAPAMICINA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO
NF-KB.....	FACTOR NUCLEAR $\kappa\beta$
NIC.....	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL
ON.....	OXIDO NÍTRICO
OR.....	RAZÓN DE MOMIOS
PCR.....	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
PDK-1.....	3-KINASA DEPENDIENTE DE FOSFOINOSITIDO-1
PI3K.....	FOSFATIDILINOSITOL-3-CINASA
PIK3CA.....	FOSFATIDILINOSITOL-4,5-DIFOSFATO-3-CINASA SUBUNIDAD CATALÍTICA α
PIP2.....	FOSFATIDILINOSITOL-4,5-DIFOSFATO
PIP3.....	FOSFATIDILINOSITOL-3,4,5-TRIFOSFATO
PTEN.....	FOSFATIDILINOSITOL-3,4,5-TRIFOSFATO 3 FOSFATASA
RBD.....	DOMINIO DE UNIÓN A RAS
RLM.....	REGRESIÓN LOGÍSTICA MULTIVARIADO
RSK.....	RECEPTOR TIROSINA CINASA
RTK.....	RECEPTORES TIROSINA CINASA
STK11.....	CINASA SERINA/TREONINA 11
VEGF.....	FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR
VPH.....	VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
VPHsAR.....	VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO
Vps34.....	PROTEÍNA VACUOLAR DE SELECCIÓN 34

RESUMEN

El VPH es el principal factor de riesgo para desarrollar CC, sin embargo se ha sugerido que factores genéticos pueden tener un papel importante durante el proceso oncogénico. *PIK3CA* es un oncogén que forma parte de la vía PI3K, implicada en diversos procesos celulares. En varios tumores se han identificado mutaciones de este gen. En este proyecto analizamos la frecuencia de las mutaciones E542K y E545K de *PIK3CA* en pacientes con CC y mujeres sanas, y su relación con el tipo viral y factores del estilo de vida de las pacientes.

En un estudio de casos y controles (329 muestras de CC y 369 muestras de cérvix sanos), se determinó el tipo viral por PCR utilizando primers universales, secuenciación y acoplamiento de similitud de secuencias, y las mutaciones de *PIK3CA* por medio de la metodología de SNaPshot y secuenciación tipo Sanger. Se evaluó la frecuencia de las mutaciones de *PIK3CA* en dos grupos de edad, mujeres ≤ 50 y ≥ 51 años. Se analizó la frecuencia de las mutaciones de *PIK3CA* con respecto a los tipos VPHs, tipo histológico y clasificación FIGO. Por último se realizó un análisis de regresión logística univariado y multivariado para determinar el riesgo de CC que representan las mutaciones de *PIK3CA*, VPHsAR y factores del estilo de vida.

Las mutaciones E545K/E542K de *PIK3CA* se encontraron en el 24% ($n = 79$) de los casos de CC, mientras que en los controles no se encontró ninguna de las dos mutaciones. Una mayor proporción de las mutaciones se presentó en las mujeres de mayor edad (≥ 51 años), siendo 6 años mayores que las pacientes sin las mutaciones ($P = 0.014$) y en los casos positivos a los VPHsAR considerados de bajo potencial oncogénico. En las mujeres jóvenes (≤ 50 años), las mutaciones de *PIK3CA* confirieron un riesgo de desarrollar CC del 40.1, mientras que en las mujeres de mayor edad (≥ 51 años) éste se duplicó ($OR = 81$). Los VPHsAR proporcionaron el mayor riesgo para desarrollar CC, seguido de las mutaciones y en menor medida algunos factores del estilo de vida.

Las mutaciones de *PIK3CA* son frecuentes en las pacientes mexicanas con CC. Las mutaciones de *PIK3CA* pueden ser clave en el proceso de carcinogénesis cervical, principalmente en las mujeres de mayor edad, confiriendo ventajas a los VPHsAR que tienen bajo potencial oncogénico.

The HPV is the main risk factor for the development of CC, however it has been suggested that genetic factors may play an important role during the oncogenic process. *PIK3CA* is an oncogene, which is part of the PI3K pathway, involved in diverse cellular processes. In several tumors, many mutations have been identified in this gene. In this project we analyzed the frequency of E542K and E545K mutations of *PIK3CA* in CC patients and cervix of healthy women and the correlation with viral type and the patients' life-style factors.

We realized a case and controls study (329 samples of CC and 369 samples of normal cervix). The viral type was determined by PCR using universal primers and sequencing, and analyzed with sequenced similarity tool. The *PIK3CA* mutations were determined by SNaPshot methodology and Sanger sequencing type. The frequency of *PIK3CA* mutations was evaluated in two age groups, women ≤ 50 and ≥ 51 years old. The frequency of *PIK3CA* mutations were analyzed according to HPV types, histological type and FIGO classification. Finally, a univariate and multivariate logistic regression analysis was performed to determine the risk of CC, brought about *PIK3CA* mutations, HPVshR and life-style factors.

The E545K / E542K mutations were found in 24% ($n = 79$) of the CC cases, while any of the two mutations were not found in the controls. A higher proportion of mutations occurred in older women (≥ 51 years), being six years older than the patients without mutations ($P = 0.014$), and in HPVshR positive samples, virus considered with a low oncogenic potential. In younger women (≤ 50 years), *PIK3CA* mutations conferred a 40.1 risk of CC development, meanwhile in older women (≥ 51 years) it was doubled ($OR = 81$). HPVshR provided the greatest risk of CC development, followed by *PIK3CA* mutations and in a lesser extent some life-style factors.

Mutations of *PIK3CA* are common in mexican patients with CC. The *PIK3CA* mutations may be a key in the process of cervical carcinogenesis, mainly in older women, giving advantages to low oncogenic HPVshR.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical (CC) es el cuarto cáncer más común en mujeres en todo el mundo. En el 2012 se estimaron 527,600 nuevos casos de CC y 265,700 muertes por esta neoplasia, siendo más frecuentes en países en vías de desarrollo como los de América Latina, África y Asia [1]. Los estudios epidemiológicos sugieren que hay varios factores de riesgo que desencadenan el CC, sin embargo el principal factor de riesgo es la infección por el virus del papiloma humano (VPH) ya que se le encuentra en más del 95% de los casos [2]. El VPH tipo 16 se encuentra en aproximadamente el 50% de los casos de CC, seguido de los tipos virales VPH-18, VPH-45 y VPH-31 [3]. La distribución de estos virus varía en las pacientes con CC según la edad. Se han encontrado tres tendencias de distribución, una para el VPH-16, otra para el VPH-18, 45 y 39, y una tercera para el resto de los VPH de alto riesgo (VPHsAR), que en general tienen bajo potencial oncogénico. En el caso del VPH-16, la distribución de frecuencia presenta dos picos. El pico más alto se presenta en las pacientes jóvenes (≤ 35 años), seguido de una tendencia decreciente hasta los 60 años. El segundo pico se presenta entre los 61-65 años y es seguido nuevamente de una tendencia decreciente. La mayor frecuencia de los VPH-18, 45 y 39 se presenta en las mujeres jóvenes y decrece conforme la edad de las mujeres aumenta. Por el contrario, la tendencia para el resto de los VPHs de alto riesgo pero con bajo potencial oncogénico es ascendente desde el grupo de mujeres jóvenes hasta alcanzar su pico más alto en las mujeres más viejas (>70 años) [4]. Dado que los VPHs diferentes al VPH-16, 18 y 45 tienen bajo potencial oncogénico, estas infecciones pudieran tener un papel secundario en las mujeres con CC. Esto sugiere que alteraciones genéticas de genes celulares involucrados en cáncer pudieran ser importantes en este tipo de tumores. El CC es precedido por lesiones neoplásicas pre-invasoras que se producen en el epitelio cervical conocidas como lesiones intraepitelial (LIE) de bajo y alto grado [5]. La carcinogénesis por los VPH de alto riesgo está dada por las oncoproteínas virales E6 y E7 las cuales participan en el desarrollo y progresión del CC, a través de suprimir o activar moléculas esenciales en la proliferación celular [6,7]. La oncoproteína E6 promueve la proliferación celular al inducir la degradación de la molécula reguladora de la apoptosis P53, mediante la formación del complejo E6, P53 y la enzima de ubiquitinación celular E3 ubiquitin

ligasa (E6-AP). La degradación de P53 favorece por un lado la entrada de la célula al ciclo celular, ya que no se induce a la proteína inhibidora de cinasas p21, y por otra parte se pierde la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis y con ello se favorece el crecimiento tumoral [8]. La oncoproteína E7 se une a la proteína del gen supresor de tumores *pRB* con una alta afinidad a la región conocida como “pocket domains” [9]. La función de *pRB* es regular al factor de transcripción E2F mediante la formación de un complejo inhibidor sobre este, de esta manera se reprime y regula la expresión de genes implicados en la proliferación celular [10]. E7 evita la interacción de *pRB* con E2F de tal forma que E2F se encuentra transcripcionalmente activo y promueve la expresión o represión de genes involucrados en el avance del ciclo celular de G1 a la fase S [11]. Sin embargo, la presencia de las proteínas virales no es suficiente para producir un cáncer invasor, la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en oncogenes y genes supresores tumorales pueden ser cruciales para desarrollar un CC [12]. Se sabe que solo un pequeño porcentaje de las infecciones por VPH progresan a una LIE, la mayoría de las infecciones se resuelven espontáneamente y las que progresan a cáncer se desarrollan durante un periodo de 15 a 20 años [13]. Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que el VPH por sí solo no puede hacer tumorogénicas a células primarias, necesita la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales [14]. Las alteraciones genómicas que pueden desregular la actividad de los oncogenes y genes supresores de tumorales son las mutaciones puntuales, el aumento o disminución en el número de copias génicas, pérdida de la heterocigosidad alélica, translocaciones cromosómicas y cambios epigenéticos [15].

Se han identificado por diferentes metodologías alteraciones en el número de copias (CNA) en cáncer cervical. Aunque se sabe que las CNAs pueden ocurrir en cualquier parte del genoma, existen algunos brazos cromosómicos en donde ocurren más frecuentemente como la amplificación de los cromosomas 3q y 5p [16]. Sin embargo, solo el 5.3% de los genes que se localizan en esas regiones amplificadas se encuentran desregulados. Por otra parte, de los genes desregulados en los tumores, solo el 12% presentan cambios en el número de copias.

De hecho, la amplificación de oncogenes y/o delección de genes supresores tumorales específicos son poco recurrentes en el CC. Esto indica que la contribución de las CNAs en la desregulación genética es pequeña, por lo que pudieran existir otros mecanismos involucrados como cambios epigenéticos o mutaciones puntuales [17].

Una de las vías que frecuentemente se ha encontrado alterada en el cáncer cervical y otros tumores es la vía PI3K/AKT. Por ejemplo, el gen *PIK3CA* que forma parte de esta vía se encuentra mutado en una gran variedad de tumores humanos como cáncer de mama (27%), endometrio (22%), tracto urinario (16%), colorrectal (14%), y ovario (10%) principalmente (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>).

En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo en colaboración con otros grupos, en el que se secuenció el exoma de muestras de CC de pacientes de varios países de América Latina incluyendo 329 muestras de México, se encontraron mutaciones puntuales en oncogenes y genes supresores tumorales en aproximadamente la tercera parte de las muestras. Interesantemente, el gen *PIK3CA* fue el que se encontró más frecuentemente mutado (28%), con una frecuencia muy por arriba de la encontrada para el resto de oncogenes y genes supresores tumorales analizados. El 85% de las mutaciones de *PIK3CA* se concentraron en el dominio helicoidal de la proteína en la posición E545K y E542K (Glu545Lis-Glu542Lis) principalmente, mientras que mutaciones en el dominio cinasa fueron poco frecuentes caso contrario de lo que ocurre en otros tumores como el cáncer de colon y mama, donde mutaciones en el dominio cinasa (H1047R) de la proteína *PIK3CA* son las más predominantes. Agrupando la frecuencia de mutación de genes de la ruta PI3K-AKT, como *PTEN* y *PIK3CA* la frecuencia se va hasta el 35%. Interesantemente, cuando se analiza la frecuencia por grupos de edad, la frecuencia de mutaciones aumenta con la edad de las pacientes con cáncer. Así, en las mujeres menores de 50 años, la frecuencia de mutaciones fue de 25%, mientras que en las mujeres mayores fue de 48%. Esto sugiere que la vía PI3K-AKT-PTEN pudiera ser importante en la carcinogénesis del CC en las mujeres mayores de 50 años. Por otro lado, las mutaciones de esta vía fueron menos frecuentes en los tumores

positivos para el VPH-18 y 45 de alto potencial oncogénico, lo que pudiera correlacionar con la distribución preferencial de estos virus en las mujeres jóvenes [18]. A pesar de que *PIK3CA* tienen una alta frecuencia de mutaciones en países de Latinoamérica, estudios europeos de Suecia y Noruega presentan una baja frecuencia (8-14%) de mutación de *PIK3CA* que no correlacionan con lo que se presenta en países latinos don el VPH tiene una alta incidencia y mortalidad [19,20]. En este contexto, la acumulación de un mayor número de alteraciones genómicas favorecería posiblemente la carcinogénesis de los VPHs de bajo potencial oncogénico en las mujeres de mayor edad.

Por otro lado, el gen *PIK3CA* se encuentra frecuentemente amplificado en el CC, sin embargo la expresión concomitante del gen es controversial en la literatura científica. La sobreexpresión del gen se relaciona con el crecimiento celular e inhibición de la apoptosis en CC [21]. Por su parte, estudios *in vitro* han demostrado que la activación de la vía PI3K a través de *PIK3CA* es necesaria para el crecimiento, diferenciación y migración de células inmortalizadas por el VPH [22]. Por otro lado, estudios de terapia dirigida sobre la vía PI3K/AKT/mTOR en tumores avanzados y metastásicos han demostrado una mayor tasa de éxito (sobrevida) en aquellos pacientes que presentan mutaciones en *PIK3CA* a diferencia de los que no presentan las mutaciones [23, 24, 25]. Por tanto, la vía PI3K a través de *PIK3CA* parece ser muy relevante en la patogénesis del CC.

MARCO TEÓRICO

PIK3CA (fosfatidilinositol-4,5-difosfato-3-kinasa subunidad catalítica alfa) es un gen de 34 kb y 21 exones, localizado en el cromosoma 3q26 que codifica la proteína P110 α de 124 kDa. P110 α es un componente (o subunidad) de la cinasa de lípidos fosfatidilinositol-3-Kinasa (PI3K) que forma parte de la vía PI3K/AKT, la cual se ha demostrado ser importante para la supervivencia, adhesión, motilidad y proliferación de células tumorales [26, 27].

La familia de PI3Ks está dividida en tres clases de enzimas (I-PI3K, II-PI3K y III-PI3K), de acuerdo a su similitud de secuencia y su sustrato de preferencia. En mamíferos la clase I de PI3K se subdivide en 2 subclase, la subclase IA (P110 α , P110 β y P110 δ) y subclase IB (P110 γ) basada en su estructura, regulación y funciones diferentes. La clase II de PI3Ks consta de tres enzimas (C2 α , C2 β y C2 γ) que a diferencia de la clase I no tienen una subunidad reguladora. Mientras que la clase III de PI3Ks consta de un único miembro, la proteína vacuolar de selección 34 (Vps34) que se diferencia en estructura y participa en el tráfico intra-celular y autofagia [28]. Las clase I y II son encontradas únicamente en metazoos, mientras que la clase III también se encuentra en organismos unicelulares.

Las cinasas de la subclase IA de PI3Ks son un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica (P110 α , P110 β o P110 γ) y una subunidad reguladora (P85 α , P55 α , P50 α o p85 β) que cataliza generalmente la conversión del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) [29]. La subunidad reguladora P85 α consta de 5 dominios: un dominio SH3, un dominio GAP, dos dominios SH2 (nSH2 y cSH2) separados por un dominio conector iSH2. El dominio nSH2 presenta motivos de unión a tirosinas fosforiladas (pYXXM) [30] (figura-1).

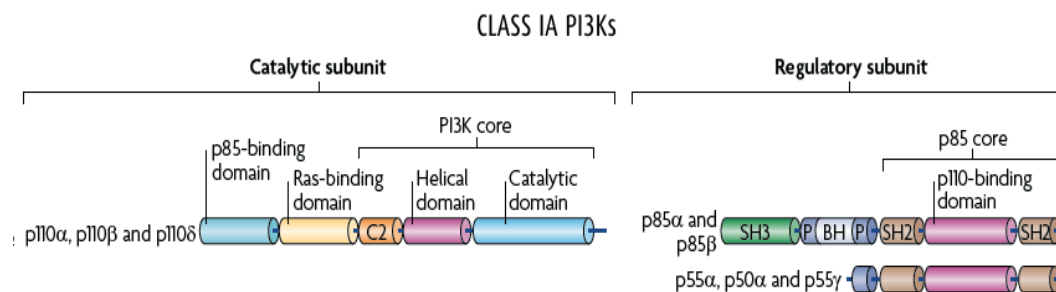


Figura 1. Dominios de la clase IA de PI3K y P85. Las isoformas de la subunidad catalítica de PI3K de la subclase IA presentan un dominio de unión a la subunidad reguladora P85, un dominio de unión a Ras, un dominio C2, un dominio helicoidal y un dominio catalítico. La subunidad reguladora presenta un dominio SH3 y dos dominios SH2, separados por un dominio conector de unión a la subunidad catalítica P110.

La subunidad P110 α está compuesta de 5 dominios; el dominio de unión-adaptador (ABD: residuo 1-108) que se une a la subunidad reguladora P85 α , un dominio de unión a Ras (RBD: residuo 191-291), un dominio C2 (residuo: 340-480) que facilita el reclutamiento de P110 α a la membrana celular, un dominio helicoidal (residuo: 525-696) que sirve de plataforma para P85 y el cual no se conoce su función completamente y un dominio catalítico (residuo: 697-1068) con actividad de cinasa de lípidos [31, 32] (figura-1).

El heterodímero P110 α -P85 α (PI3K α) se encuentra en el citoplasma, P85 estabiliza e inhibe la actividad catalítica del complejo a través de sus dominios iSH2 el cual interactúa directamente sobre los dominios ABD y C2 de P110 α , mientras que el dominio nSH2 se une a regiones clave en los dominios C2, helicoidal y Catalítico de P110 α [33].

La cinasa PI3K α puede ser activada por su reclutamiento a la membrana celular vía receptores tirosina cinasa (RTKs) o Ras. El dominio nSH2 de la subunidad reguladora reconoce las tirosinas fosforilada de los RTKs. PI3K activa es capaz de fosforilar a su sustrato el PIP2 en la posición 3 del anillo de inositol y convertirlo en PIP3 (figura 1). PIP3 actúa como un segundo mensajero reclutando y anclando a la cinasa serina/treonina AKT (proteína cinasa B) y al 3-cinasa dependiente de fosfoinositido-1 (PDK-1), a través de sus dominios PH a la

membrana celular. Ya en la membrana, PDK-1 fosforila y activa a AKT, la cual tiene un amplio espectro de proteínas blanco [34] (figura 2).

AKT regula varios procesos celulares al inhibir o activar a proteínas clave en la célula por medio de su fosforilación. AKT promueve la supervivencia celular al bloquear proteínas proapoptóticas que contribuyen a la muerte celular. El mecanismo por el cual AKT induce la supervivencia celular es multifactorial. AKT es capaz de fosforilar directamente a la proteína BAD que pertenece a la familia de moléculas apoptóticas Bcl-2. La molécula BAD forma de manera normal un complejo regulador con el factor de supervivencia BCL-XL. Al ser fosforilado BAD por AKT se evita esta interacción y el factor BCL-XL promueve eventos anti-apoptóticos en la célula. También AKT puede fosforilar directamente a la caspasa-9 en su dominio de muerte, evitando de esta manera su procesamiento e inicio de la apoptosis. AKT también evita la expresión de genes pro-apoptóticos como BIM y FASL al fosforilar negativamente al factor de transcripción FOXO [35].

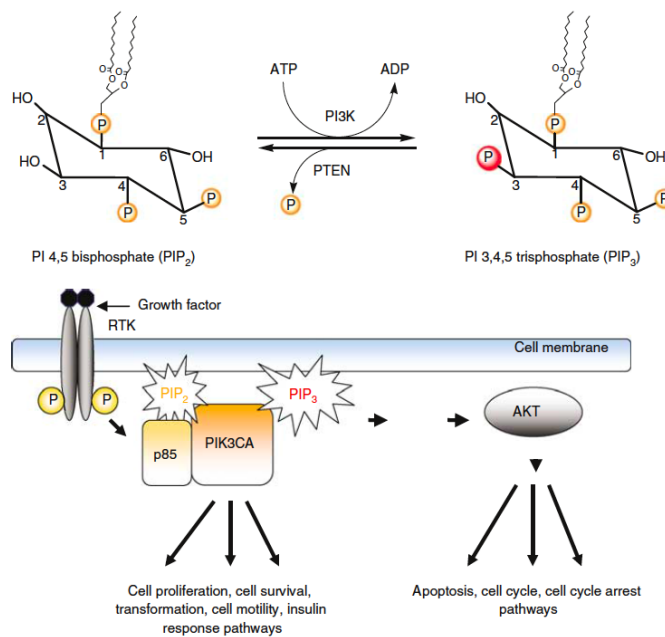


Figura 2. Activación de PI3K-PIK3CA. PI3K es activada después de su unión a receptores tirosina cinasa (RTK), a través del reclutamiento de la subunidad p85 al receptor, esto ocasiona un cambio conformacional e induce la actividad catalítica de la subunidad P110 α (PIK3CA). PI3K activa convierte PIP₂ a PIP₃, el cual es un segundo mensajero para activar a AKT, la cual señala para varios procesos celulares.

AKT también promueve la supervivencia de manera indirecta a través del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y p53. El complejo NF- $\kappa\beta$ promueve la supervivencia en respuesta a estímulos apoptóticos al transcribir genes de supervivencia. AKT genera un efecto positivo sobre NF- $\kappa\beta$ al fosforilar y activar a la cinasa I κ K. Esta cinasa induce la degradación de I κ B que es el inhibidor de NF- $\kappa\beta$, dejando libre y activo a NF- $\kappa\beta$. Por otro lado, AKT regula los niveles de la proteína pro-apoptótica P53, al fosforilar de manera positiva a la proteína de unión a P53 MDM2. MDM2 es un regulador negativo de las funciones de P53, promueve su degradación vía proteosoma a través de su actividad de E2 ubiquitin ligasa [36, 37].

La vía PI3K/AKT también es importante para regular el ciclo celular el cual es controlado por las ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Los niveles de la ciclina D1 son muy importantes para la transición de la fase G1/S. Por tanto, la ciclina D1 es regulada transcripcionalmente, post-transcripcional y post-traduccionalmente por diversos mecanismos moleculares. AKT previene la degradación de la ciclina D1 al regular la actividad de la cinasa glucógeno sintasa-3 β (GSK3 β). GSK3 β fosforila a la ciclina D1 y la marca para su degradación por proteosoma. AKT fosforila directamente de manera negativa a GSK3 y bloquea su actividad de cinasa, permitiendo la acumulación de la ciclina D1 y la transición a la fase S. También bloquea la transcripción de p27^{kip1} un inhibidor de Cdks, mediante la fosforilación negativa de la familia de factores de transcripción FOXO o directamente puede inactivar a p27^{kip1} por fosforilación. Por otro lado, la fosforilación y bloqueo de GSK3 estabiliza a las proteínas c-jun y c-myc las cuales participan importantemente en el ciclo celular [37, 36, 35].

En paralelo al ciclo celular AKT estimula el crecimiento celular (es decir el aumento de masa celular) por medio de la síntesis de macromoléculas. El complejo mTOR (blanco de rapamicina en células de mamífero) es una cinasa serina/treonina que censa y regula la síntesis de proteínas al activar a la cinasa p70S6 (RSK) que aumenta la traducción del RNA mensajero y al inhibir a 4E-BP1 un represor de la traducción que bloquea el CAP 5'. También

mTOR estimula la biogénesis de los ribosomas. La proteína mTOR es fosforilada y activada positivamente por AKT, promoviendo la síntesis de proteínas [38, 39, 35].

Una de las funciones fisiológicas más importantes de AKT tiene que ver con el metabolismo celular. En respuesta a factores de crecimiento AKT regula la captación de nutrientes y su metabolismo intracelular. Se ha observado que AKT estimula la captación de glucosa en respuesta a insulina, por medio de la translocación del transportador de glucosa 4 (Glut-4) a la membrana celular, aunque el mecanismo molecular no se conoce con certeza aun. Al fosforilar AKT negativamente a GSK3 evita que fosforile y regule a su sustrato la glucógeno sintasa y sea inhibida. Por tanto, se mantiene la síntesis de glucógeno [35].

La vía PI3K/AKT tiene un rol muy importante en la fisiología del cáncer principalmente en la angiogénesis por medio de sus efectos en las células endoteliales y células generadoras de señales angiogénicas como las células tumorales. En las células endoteliales la vía PI3K/AKT está sobre activada debido al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual contribuye al crecimiento, proliferación y supervivencia de las células endoteliales. Además, AKT induce la síntesis y liberación de óxido nítrico (ON) el cual puede estimular la vascularización, remodelación celular y angiogénesis. AKT induce la transcripción de factor inducible de hipoxia alfa (HIF-1 α y HIF-2 α) que en células endoteliales y en otras células induce la expresión y secreción de VEGF y otros factores angiogénicos, generando un ciclo de retroalimentación autocrino y paracrino [40, 35].

Un papel nuevo que se le ha dado a la señalización de AKT tiene que ver con el control de la migración celular, invasión de la matriz extracelular y en última instancia la metástasis debido a las diferentes funciones que presentan las isoformas de AKT (AKT1, AKT2 y AKT3) que son codificadas por genes diferentes. Se ha observado que la activación de la isoforma AKT1 disminuye la migración de células epiteliales de cáncer de mama e impide una transición epitelio mesenquimal *in vitro*, mientras que AKT2 promueve la metástasis. [35].

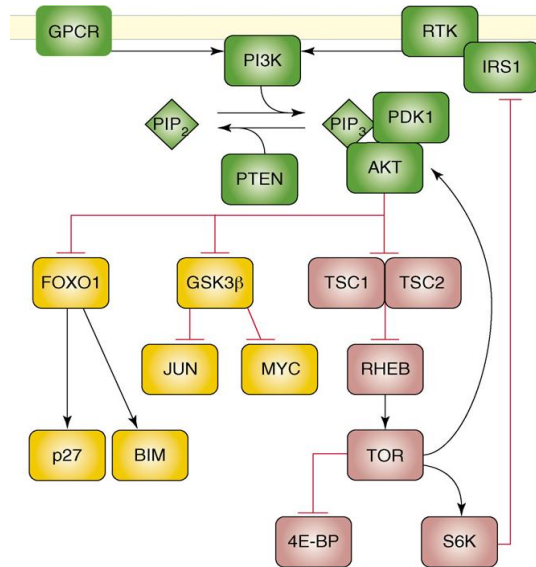


Figura 3. Vía de señalización PI3K-AKT. La cinasa PI3K de clase 1 puede ser activada mediante receptores tirosina cinasa (RTK) o receptores acoplados a proteínas G (GPCR). PI3K cataliza la reacción del fosfatidilinositol-4, 5-difosfato (PIP₂) a fosfatidilinositol-3, 4,5-trifosfato (PIP₃). La reacción inversa es realizada por la fosfatasa de lípidos y supresor de tumores PTEN. PIP₃ recluta a la cinasa AKT y PDK1, PDK1 se fosforila y activa a AKT. AKT activa fosforila negativamente a FOXO1, GSK3 y mTOR, los cuales controlan procesos de proliferación, supervivencia, crecimiento y metabolismo celular.

Como ya se mencionó la vía de señalización PI3K/AKT es una de las principales vías intracelulares que involucra una gran variedad de funciones celulares, por tanto ha sido extensamente estudiada su participación en la transformación oncogénica.

En 2004 Yardena Samuels reporto por primera vez una alta frecuencia de mutaciones puntuales en el gen *PIK3CA* en diferentes tipos de cáncer como; colon, cerebro, estomago, mama y pulmón. Mutaciones de cambio de un aminoácido en el dominio helicoidal en la posición E542K y E545K, y en el dominio catalítico en la posición H1047R principalmente, sugiriendo que estas mutaciones generan una actividad constitutiva de la cinasa y que estaría involucrada en la fisiología del cáncer [41]. En 2005 se reportó que las mutaciones puntuales de *PIK3CA* en células de cáncer colorrectal promueven el crecimiento, invasión y atenuación de la apoptosis [26].

Por su parte, estudios *in vivo* han demostrado que las mutaciones en *PIK3CA* (E545K y H1047R) son capaces de generar tumores heterogéneos en las glándulas mamarias de ratón [42]. Mientras que en embriones de pollo las mutaciones E542K, E545K y H1047R generan un aumento de la vascularización y la formación de nódulos neoplásicos [43].

Estudios bioquímicos han demostrado que las mutaciones en *PIK3CA* generan un aumento de la actividad enzimática de la cinasa de lípidos PI3K [44]. Las mutaciones que se presentan con mayor frecuencia en *PIK3CA* son en el dominio helicoidal y en el dominio catalítico, con lo cual se han sugerido dos mecanismos diferentes por los cuales se genera esta ganancia de función de la cinasa. Las mutaciones E542K y E545K son cambios de un ácido glutámico por una lisina teniendo como resultado un cambio en la carga del dominio helicoidal, de esta manera se debilita la interacción electrostática con el dominio nSH2 de la subunidad P85. Las mutaciones en el dominio helicoidal (E542K/E545K) son independientes de la activación por fosfotirosinas pero requieren de la unión de la GTPasa Ras para inducir la transformación oncogénica. Por su parte, la mutación H1047R genera un cambio conformacional del dominio cinasa que permite una mayor asociación con la membrana, de esta manera hay más sustrato para catalizar. La transformación celular por la mutante H1047R no requiere la presencia de Ras, pero sí de la subunidad reguladora P85 [45,46, 47].

Trabajos recientes han demostrado que las mutaciones de *PIK3CA* reprograman el metabolismo celular y generan una dependencia por glutamina en células cáncer colorrectal [48]. Por otro lado, se ha demostrado que *PIK3CA* es regulado transcripcionalmente por el micro RNA 375 (miRNA-375), sin embargo en diferentes tumores se encuentra subexpresado este microRNA [49].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que se ha encontrado una alta frecuencia de mutaciones de *PIK3CA* en CC, aun no se entiende la relevancia que tienen estas mutaciones en la fisiología de esta neoplasia. La mayor frecuencia de mutaciones de *PIK3CA* se presenta principalmente en mujeres diagnosticadas con CC a una edad mayor independientemente del tipo viral de ese grupo de edad. Por tanto, posiblemente las mutaciones de *PIK3CA* en estas mujeres de edad avanzada pudieran contribuir al desarrollo de un cáncer invasor.

Dado que las mutaciones en *PIK3CA* se asocian principalmente a mujeres de edad avanzada con CC, no se sabe si son eventos ligados directamente al proceso de carcinogénesis cervical en esas pacientes. Por otra parte, no se sabe si dichas mutaciones son generadas también espontáneamente en el cérvix de las mujeres sanas durante el transcurso de su vida, conforme avanza la edad.

Una manera de investigar si las mutaciones de *PIK3CA* están directamente ligadas a la carcinogénesis cervical fue mediante un estudio de casos y controles, explorando las mutaciones de *PIK3CA* en un grupo de mujeres con CC y un grupo de mujeres control. Para determinando el riesgo o razón de momios (OR) que representan las mutaciones en el desarrollo de CC.

La importancia del estudio de las mutaciones de *PIK3CA* es que ya existen drogas blanco específicas, al menos contra las mutaciones localizadas en la región cinasa de la proteína, que podrían utilizarse en la terapia de las pacientes con CC.

JUSTIFICACIÓN

A pesar, de los programas implementados de detección oportuna del CC y la vacunación contra los VPHs más oncogénicos, el CC sigue siendo un problema de salud pública en el mundo.

En México el CC es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres, tiene una tasa de mortalidad de 10 muertes por cada 100,000 mujeres entre 40 y 49 años y está aumentando con la edad llegando a 55 muertes en las mujeres mayores de 80 años [www.inegi-2012.org].

Los programas de vacunación contra el VPH-16 y 18 en mujeres jóvenes solo protege a un sector de la población y su efecto se verá reflejado dentro de 30 años. Mientras que las mujeres adultas las cuales presentan una alta frecuencia de otros tipos virales quedan desprotegidas y pudieran desarrollar CC. Esto genera la necesidad de estudiar cuales son los factores que contribuyen al desarrollo del cáncer cervical en las mujeres adultas y como participan con los VPHs.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS.

Dado que, las mutaciones E542K y E545K en el gen *PIK3CA* son muy frecuentes en las pacientes con CC con una edad avanzada, considero que son eventos directamente relacionados con la carcinogénesis tumoral en las mujeres de edad avanzada. Por lo que se espera encontrar una diferencia en la frecuencia de las mutaciones entre los casos y controles. Asimismo el riesgo para desarrollar CC en base a esas mutaciones pudiera ser independiente del riesgo conferido por los diferentes tipos de VPH.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el riesgo que confieren las mutaciones E542K y E545K del gen *PIK3CA* en la carcinogénesis cervical en mujeres menores y mayores de 50 años.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Identificar las mutaciones puntuales E542K y E545K de *PIK3CA* en biopsias de tumores de CC y exudados de mujeres sanas, menores y mayores de 50 años.
- Realizar el análisis de casos y controles en un modelo de regresión logística univariado para determinar el riesgo que confieren las mutaciones E542K y E545K al desarrollo de CC en mujeres menores y mayores de 50 años.
- Realizar el análisis de casos y controles en un modelo de regresión logística multivariado para determinar el riesgo que confieren las mutaciones E542K y E545K, los diferentes tipos de VPHs y los factores del estilo de vida en el desarrollo de CC en mujeres menores y mayores de 50 años.

MATERIAL Y MÉTODOS

SELECCIÓN DE PACIENTES, DISEÑO DEL ESTUDIO Y PUNTOS FINALES.

Las muestras de este estudio provienen de 462 pacientes diagnosticadas con CC por el departamento de Oncología y de 462 mujeres con epitelio cervical normal evaluadas por el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital General de México. Los criterios de inclusión de las pacientes con CC fueron: diagnóstico clínico de CC invasivo por el departamento de Oncología, sin tratamiento previo, nacidas y residentes en México y con ancestría mexicana que se remonte a dos generaciones. Las pacientes que cumplieron los criterios de inclusión fueron reclutadas secuencialmente a partir de noviembre del 2003 hasta julio del 2007. Los tumores de las pacientes fueron clasificados clínicamente de acuerdo a la federación internacional de ginecología y obstetricia (FIGO). Dos muestras de biopsia fueron tomadas de los tumores durante el examen de colposcopia. Una muestra se dividió en dos partes iguales: una parte se fijó en tampón de formamida para el análisis morfológico y la otra parte junto con la segunda muestra de biopsia se congelo con hielo seco y se guardó a -80 °C hasta su análisis. Para la detección y tipificación de los VPHs se realizó un raspado del exocérvix y endocérvix con cytobrush de las pacientes y controles, las células se suspendieron en un vial con tampón de extracción y se almaceno a -20°C. EL DNA se extrajo y purifico usando el kit PureLink Genomic DNA (invitrogen, Grand Island NY). La detección del VPH se realizó mediante PCR utilizando primers universales para genes del VPH (L1 MY09/MY11, GP5+/6+, y L1C1). Los tipos virales fueron identificados por secuenciación fluorescente (Kit BigDye Terminator Ready Reaction, Applied Biosystems, Foster city, CA) de las bandas amplificadas en las muestras positivas y se analizaron con la herramienta de similitud de secuencias FASTA (EMBL-EBI). Se investigado si los factores de estilo de vida de las pacientes se asocia con la distribución de la enfermedad por rango de edad. Los factores estudiados fueron; edad de la primera relación sexual, número de parejas sexuales, estado civil, uso de anticonceptivos, tabaquismo, edad del primer embarazo y prueba de Papanicolaou previa. Cada uno de estos factores fue obtenido de los registros médicos de las pacientes a través de encuestas elaboradas por

personal capacitado. Las muestras fueron agrupadas en dos grupos de edad, mujeres ≤ 50 años y mujeres ≥ 51 años.

AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN-9 DE *PIK3CA*.

Se amplificó el exón 9 del gen *PIK3CA* por PCR, ya que es la región donde se presentan las dos mutaciones de interés E542K y E545K, mediante primers específicos (FW-AGTAACAGACTAGCTAGAGAC- y RV-CTGTGACTCCATAGAAAATCTT) y con una temperatura de alineamiento de 54°C. Se adiciono 10 ng/ μL de ADN a la mezcla de reacción para obtener un volumen final de 25 μL que contiene; 20 mM de Tris-HCL (pH8.8), 1 mM de MgCl_2 , 50 mM de KCl, 200 μM de dATP, dTTP, dGTP, y dCTP, 1 μM de cada primer, y 1-2 U de Taq DNA polymerase Platinum^(invitrogen). Después de una desnaturalización a 94°C durante 2 minutos la reacción de amplificación se llevó a cabo durante 40 ciclos en un termociclador^(Applied Biosystems-2720), con una etapa inicial de 94°C durante 30 segundos, una segunda de 54°C por 30 segundos y la tercera a 72°C durante 30 segundos. Después de este ciclado las reacciones se mantuvieron a 72°C durante 7 minutos. Los amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (2%) con 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio durante 30m-1h a 120 V, de acuerdo a su tamaño (125 pb) y al marcador de peso molecular.

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.

En una reacción previa de PCR quedan restos de cebadores (primers) y dNTPs que no se utilizaron en la reacción, ambos reactivos deben eliminarse para no generar fondo en la metodología de SNaPshot y secuenciación tipo Sanger.

Para ello se utilizó el reactivo EXO-SAP-IT^(USB). Esta solución comercial está compuesta de dos enzimas; exonucleasa 1, la cual degrada fragmentos de DNA de cadena sencilla como los cebadores y la fosfatasa alcalina que hidroliza los dNTPs que no se utilizaron en la reacción de PCR. Se mezclaron 2 μL de EXO-SAP^(USB) con 5 μL de producto de PCR (amplificado de *PIK3CA*) en un tubo de 0.5 mL, incubando durante 20 minutos a 37°C en un

Thermomixer^(eppendorf) para que se dé la reacción. Pasado el tiempo de reacción las muestras se incubaron durante 15 minutos a 80°C para inactivar a las enzimas (EXO-SAP).

IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES POR SNaPshot.

La metodología que se empleó para identificar las mutaciones en el EXON-9 de *PIK3CA* fue SNaPshot ^(Applied Biosystems), fundamentada en la técnica de extensión del cebador. Se diseñaron primers complementarios para cada una de las mutaciones cuyo extremo 3' finaliza justo un nucleótido antes del nucleótido mutado 542 (GAA→AAA) y 545 (GAG→AAG). Mediante dideoxinucleótidos (ddNTPs o terminadores) marcados con diferentes fluorocromos, la polimerasa incorporara solamente un nucleótido al extremo 3' y termina la reacción, marcando el perfil del nucleótido de interés.

Para esta metodología se utilizó el kit de SNaPshot de Applied Biosystems. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 5 µL, que contiene 2.5 µL de Buffer mix de SNaPshot, 0.2 µM de Mix de primers 542/545 (542-FW CTACACGAGATCCTCTCTCT, 545-RV CATAGAAAATCTTTCTCTGCT) y 1.5 µL de producto de PCR tratado con EXO-SAP. La extensión de los cebadores se llevó a cabo en un termociclador durante 25 ciclos; 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 54°C y 30 segundos a 60°C, seguido de un enfriamiento a 4°C.

POST-EXTENSIÓN (PURIFICACIÓN).

Para remover los grupos fosfato 5' que pudieran intervenir en la electroforesis capilar. Se mezclaron 1.0 unidad de fosfatasa alcalina (SAP^(USB)) a cada mezcla de reacción obtenida del SNaPshot y se incubo durante 1 hora a 37°C en un Thermomixer^(eppendorf) para hidrolizar los ddNTPs. Para inactivar a la enzima (SAP) se incubo a 75°C durante 15 minutos.

SECUENCIACIÓN TIPO SANGER.

Para validar el perfil de mutaciones se secuencio el EXON-9 de *PIK3CA* por el método de fluorescencia de ciclos de temperatura con el Kit BigDye Terminator Ready v3.1 ^(Applied Biosystems).

Con un volumen final de la mezcla de reacción de 5.5 μL , que contiene 2 μL de BigDye Terminator, 1 μL BigDye Sequencing Buffer, 1 μL de primer y 1.5 μL de templado (producto de PCR tratado con EXO-SAP). Con una etapa inicial de 96 °C durante 1 minuto y seguido de 25 ciclos a 96 °C por 30 segundos, 54 °C durante 15 segundos y 60 °C por 1:30 minutos, con una etapa final a 4 °C. Cada reacción de secuencia se purificó por el método de columna.

ELECTROFORESIS CAPILAR.

Para la electroforesis capilar se utilizó el equipo ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se mezcló 30 μL de Hi-Di formamida, 2 μL de producto del SNaPshot y 1.5 μL de GeneScan-120Liz por cada reacción, para obtener un volumen final de 33.5 μL . Para la secuenciación Sanger, se diluyó cada muestra con 20 μL de Hi-Di formamida. Las muestras se dejaron incubar durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizar, pasado el tiempo se colocaron a 4°C hasta su análisis. Los perfiles de mutación de SNaPshot se analizaron con el software Genemapper 4.0 (Applied Biosystems) y las secuencias con el software DNA Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los modelos de regresión logística son modelos estadísticos en los que se desea conocer la relación entre dos variables: una variable dependiente cualitativa, dicotómica o con más de dos valores (multinomial) y una o más variables (covariable) explicativas independientes, ya sean cualitativas (dicotómicas) o cuantitativas. Por sus características los modelos de regresión logística tienen dos finalidades; cuantificar la importancia de la relación existente entre cada una de las covariables y la variable dependiente (es decir, conocer la razón de momios, OR, por sus siglas en inglés) y clasificar individuos dentro de las categorías (presente/ausente) de la variable dependiente, según la probabilidad que tengan de permanecer a una de ellas dada la presencia de determinadas covariables. El objetivo primordial que resuelve este análisis es modelar como influye en la probabilidad de aparición

de un suceso, habitualmente dicotómico, la presencia o ausencia de diversos factores y el valor o nivel de los mismos.

En este protocolo se analizó si los factores de estilo de vida, VPHsAR y las mutaciones de *PIK3CA* contribuyen al inicio temprano o tardío de CC, para esto cada uno de los factores del estilo de vida fue dividido en dos grupos de acuerdo al riesgo reportado para el CC, variables de bajo riesgo (OR = 1) y variables de alto riesgo (Tabla 1).

Para la edad, los resultados fueron expresados como mediana y rango intercuartil 1.5x (IQR = 25%-75%) y fue utilizada la prueba estadística de U de Mann-Whitney para evaluar las diferencias significativas entre grupos analizados. Las tendencias de distribución de las frecuencias fueron analizadas mediante la prueba de chi-cuadrada de Pearson. La asociación de las mutaciones de *PIK3CA*, los VPHsAR y factores de estilo de vida respecto al CC fue estimada mediante un análisis de regresión logística univariado y multivariado (prueba de chi-cuadrada Wald), de resultados dicotómicos (casos-controles) y las variables explicativas (Mutaciones en *PIK3CA*, VPHsAR y factores de estilo de vida) en todas las pacientes y por grupos de edad, mujeres jóvenes (≤ 50 años) y mujeres de mayor edad (≥ 51 años). Para poder realizar los modelos de regresión logística, una de las muestras control se consideró como positiva para cada una de las mutaciones de *PIK3CA*. La asociación fue expresado como razón de momios (OR), teniendo un margen de confianza (IC) del 95%. Todas las pruebas estadísticas fueron de dos colas; las diferencias se consideraron estadísticamente significativa cuando la $P \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron el programa Sigma Plot (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) y SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES CON CC Y MUJERES SANAS.

En este estudio se analizaron 329 pacientes de CC y 369 mujeres sanas (Tabla 1). El 97.9% de los casos (n = 322) fueron positivos para un tipo de VPH, mientras que sólo el 13.5% (n = 50) de las mujeres sanas fueron positivas. De acuerdo con el tipo de VPH, el 92.4% (n = 304) de los casos presentaron infecciones con VPHsAR, de los cuales el tipo 16 fue el más frecuente (47.1%, n = 155), seguido por el tipo 18 y 45 (10.3%, n =34; 7%, n =23, respectivamente). El resto de los casos fueron positivos para los otros 11 VPHsAR (31/33/35/39/51/52/56/58/59/66/68), con una frecuencia individual menor del 2% (28%, n = 92) o positivos para los VPHs de bajo riesgo (5.5%, n = 18). Al igual que en los caso de CC, las infecciones por el VPH16 (2.4%, n = 9) y VPH18/45 (1.1%, n = 4) fueron las más frecuentes en las mujeres sanas.

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con CC y mujeres sanas.

	Frecuencia: % (n)	
	Casos	Controles
Tipo viral		
VPHsAR	92.4 (304)	8.4 (31)
VPH16	47.1 (155)	2.4 (9)
VPH18/45	17.3 (57)	1.1 (4)
Otros VPHs	28 (92)	4.9 (18)
VPHsBR	5.5 (18)	5.1 (19)
Negativo	2.1 (7)	86.4 (319)
Total	100 (329)	100 (369)
Tipo histológico		
Epidermoide	83.3 (274)	
Adenocarcinoma	13.4 (44)	
Otros	3.3 (11)	
Total	100 (329)	
FIGO		
I-II	75.7 (254)	
III-IV	24.3 (80)	
Total	100 (329)	

VPH: virus del papiloma humano, VPHsAR: virus del papiloma humano de alto riesgo,

VPHsBR: virus del papiloma humano de bajo riesgo,

Otros VPHs incluye: VPH 31/33/35/39/51/52/56/58/59/66/68.

VPHsBR incluye: VPH 6/11/26/34/42/44/53/54/61/64/69/70/71/82/84/85/89/91/97.

Considerando la clasificación histológica, el 83.3% (n = 274) de los tumores analizados fueron epidermoides y el 13.4% (n = 44) adenocarcinoma. El resto (3.3%, n = 11) fueron otros tipos histológicos poco frecuentes. La clasificación clínica inicial de las pacientes con CC de acuerdo a FIGO fue: estadio I-II, 75.7% (n = 254) y estadio III-IV, 24.3% (n = 80).

FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES E542K Y E545K EN LAS PACIENTES CON CC Y MUJERES SANAS.

En el 24% (n = 79) de los 329 casos de CC se encontró al menos una de las dos mutaciones del gen *PIK3CA* (Tabla 2) y en 5 casos se encontraron ambas mutaciones. La mutación E545K presentó una frecuencia individual del 14.6% (n = 48) y la mutación E542K del 10.9% (n = 36). En los controles no se encontró ninguna de las mutaciones.

Tabla 2. Frecuencia de las mutaciones E545K y E542K.

<i>PIK3CA</i>	Frecuencia: % (n)
E545K/E542K	24 (79)
E545K	14.6 (48)*
E542K	10.9 (36)*
E545E/E542E	76 (250)
Total	100 (329)

*En 5 tumores se encontraron las dos mutaciones, fueron agrupadas de forma independiente en cada grupo.

ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES E542K Y E545K POR EDAD.

La mediana de la edad de las pacientes con CC y las mujeres sanas fue de 50 años (IQR = 22-89; IQR = 17-79, respectivamente). Cuando se consideró a las pacientes con al menos una de las dos mutaciones de *PIK3CA* (Figura 1), la mediana de la edad fue de 54 años (IQR = 24-78). No se observó una diferencia estadística significativa (P = 1.0) al comparar la edad de las pacientes con cada mutación de manera individual (E545K: mediana = 54 años, IQR =

24-74; E542K: mediana = 54 años, IQR = 37-78). La mediana de la edad de las pacientes (48 años, IQR = 22-89) con los codones normales (E545E/E542E) de *PIK3CA*, es 6 años menor que la mediana de la edad de las pacientes con al menos una de las dos mutaciones, con una diferencia estadística significativa ($P = 0.014$).

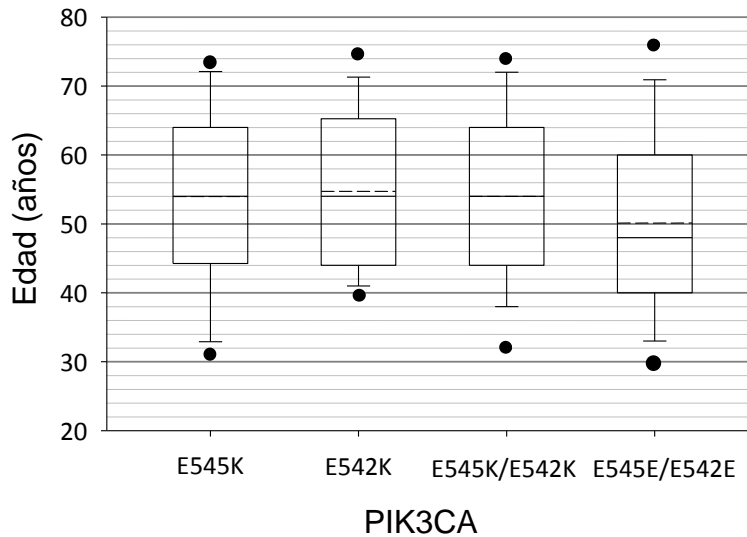


Figura 1. Distribución de la edad de las pacientes por las mutaciones E542K y E545K. EL box plot muestra la edad de las pacientes con las mutaciones E542K, E545K y al menos una de las mutaciones E545K/E542K, respecto a los codones normales E545E/E542E. El límite superior e inferior de las cajas representan los percentiles 75 y 25 respectivamente. Las líneas negras y punteadas dentro de las cajas representan la mediana y los valores medios respectivamente, y los bigotes representan el mínimo y máximo valor que se encuentra dentro del rango inter cuartil 1.5x desde el extremo de la caja. Valores fuera de este rango están representados por círculos negros. La significancia estadística de la diferencia en la edad media entre las mutaciones y E545E/E542E fue determinada

Para analizar la frecuencia de las mutaciones de *PIK3CA*, dividimos los casos en dos grupos de edad considerando la mediana (≤ 50 y ≥ 51 años). Se observó que casi se duplicó la frecuencia de las mutaciones de *PIK3CA* (32%, $n = 49$) en el grupo de mayor edad, en comparación del grupo de menor edad (17%, $n = 30$). Lo mismo ocurrió al considerar la frecuencia de las mutaciones individualmente (Figura 2).

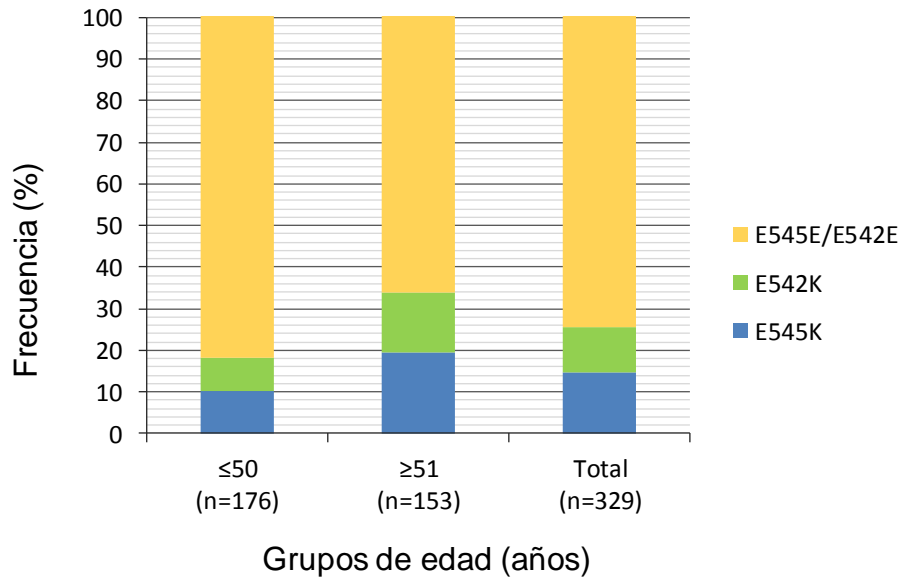


Figura 2. Frecuencia de las mutaciones E542K y E545K en pacientes con CC de acuerdo a la edad. La figura muestra la frecuencia relativa (%) de las mutaciones E542K y E545K en pacientes con CC agrupadas en dos grupos de edad ≤ 50 y ≥ 51 .

Para identificar la relación entre la frecuencia de las mutaciones de *PIK3CA* con la edad de las pacientes con CC, ésta se analizó en intervalos de 10 años (Figura 3). Se observó que la frecuencia de las mutaciones E545K/E542K aumentaban con la edad de las pacientes, con un pico máximo en el rango de 51-60 años y posteriormente una pequeña tendencia decreciente. La frecuencia de al menos una de las mutaciones de *PIK3CA* fue dependiente de la edad de las pacientes con un coeficiente de correlación de 0.825 estadísticamente significativo ($P = 0.0432$). Esta misma relación se observó al analizar las mutaciones de forma individual (E545K: r^2 0.915, $P = 0.0106$. E542K: r^2 0.818, $P = 0.0465$).

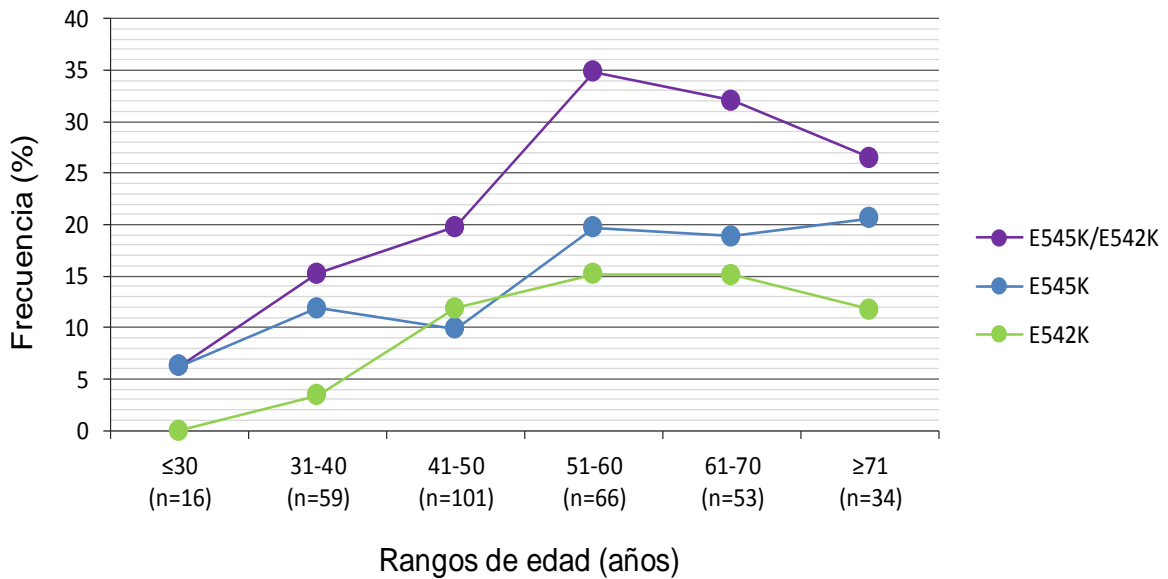


Figura 3. Distribución de las mutaciones E542K y E545K por intervalos de 10 años en las pacientes con CC. La figura muestra la distribución de la frecuencia de las mutaciones E545K/E542K (círculos morados), E545K (círculos azules) y E542K (círculos verdes), durante intervalos de edad de 10 años en las pacientes con CC (n=329).

ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES E542K Y E545K POR TIPO VIRAL.

Para el análisis de la distribución de las mutaciones de *PIK3CA* en relación al tipo de VPHsAR, consideramos 3 grupos (Figura 4A). La mayor frecuencia de al menos una mutación se presentó con el tipo viral 16 (28.4%, n = 44), con una proporción similar entre ambas mutaciones (E545K: 17.4%, n = 27; E542K: 13.5%, n = 21); de forma similar esto se observó en el grupo de los otros VPHsAR. Con los tipos virales 18/45, se observó una menor frecuencia para al menos una de las dos mutaciones (14%; n = 8), siendo la mutación E545K (12.3%, n = 7) casi tres veces más frecuente que la mutación E542K (3.5% n = 2).

Al considerar los dos grupos de edad y los VPHsAR (Figura 4B-C), confirmamos que la frecuencia de al menos una de las mutaciones de *PIK3CA* fue mayor en las mujeres ≥ 50 años (Figura 4C) y no se observó diferencia en la proporción de la frecuencia de las mutaciones individuales considerando el tipo viral.

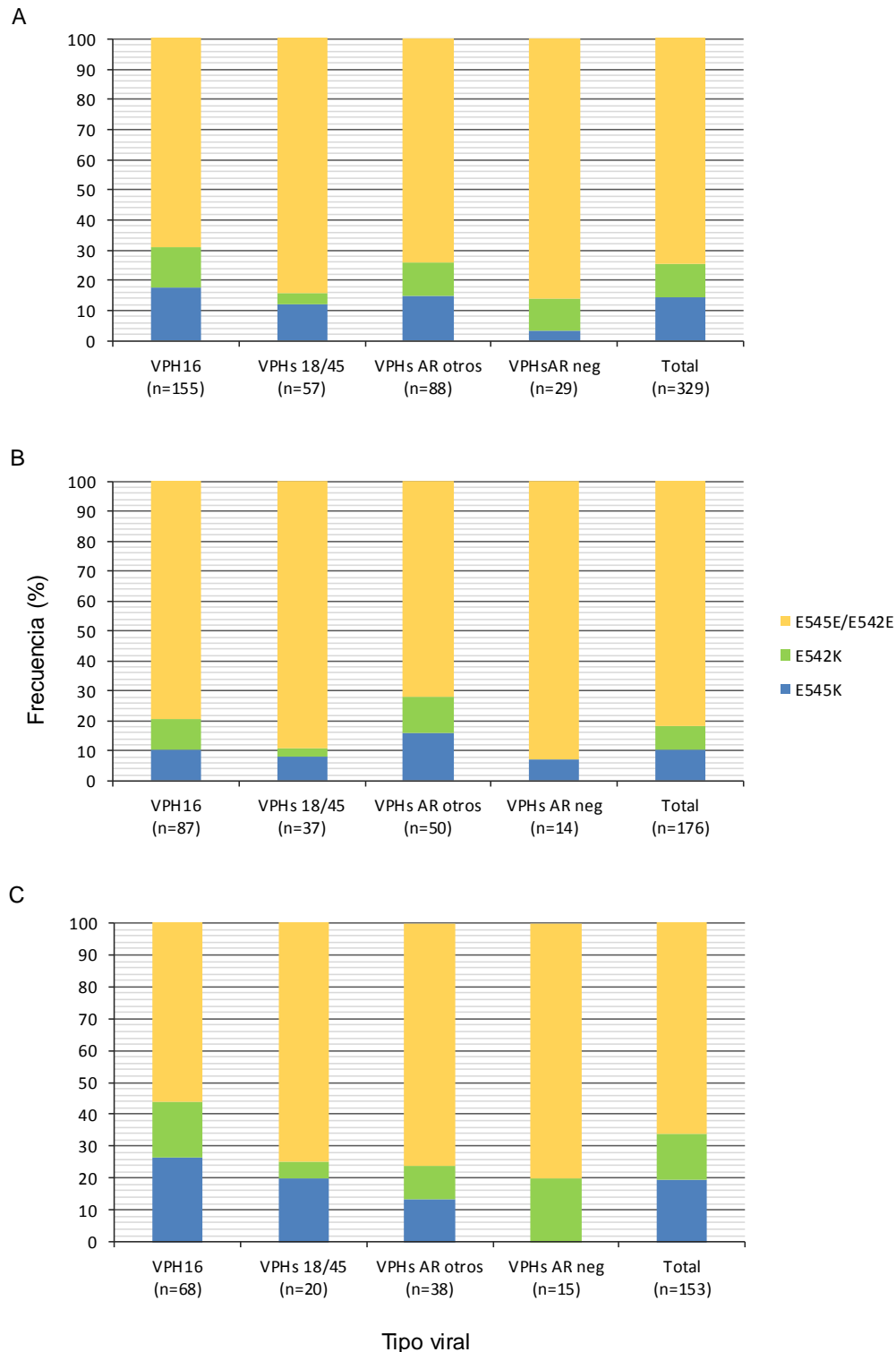


Figura 4. Distribución de las mutaciones E542k y E545K de acuerdo al tipo viral. La figura muestra la frecuencia de las mutaciones E542K y E545K con respecto al VPH 16, VPHs 18/45 y otros VPHsAR en los 329 casos de CC. El panel A muestra la proporción global de las mutaciones y los VPHsAR. El panel B muestra la proporción de las mutaciones y VPHsAR en las mujeres ≤ 50 años. El panel C muestra la proporción de las mutaciones y VPHsAR en las mujeres ≥ 50 años.

FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES E542K Y E545K DE ACUERDO CON EL TIPO HISTOLÓGICO TUMORAL Y LA CLASIFICACIÓN FIGO.

La frecuencia de al menos una de las mutaciones de *PIK3CA* fue muy similar en los dos tipos histológicos más frecuentes (~25%). Sin embargo, en los adenocarcinomas, la mutación E545K (20.5%, n = 9) fue casi cinco veces más frecuente que la mutación E542K (4.5%, n = 2); mientras que en los carcinomas epidermoides, esta proporción fue igual (Figura 5).

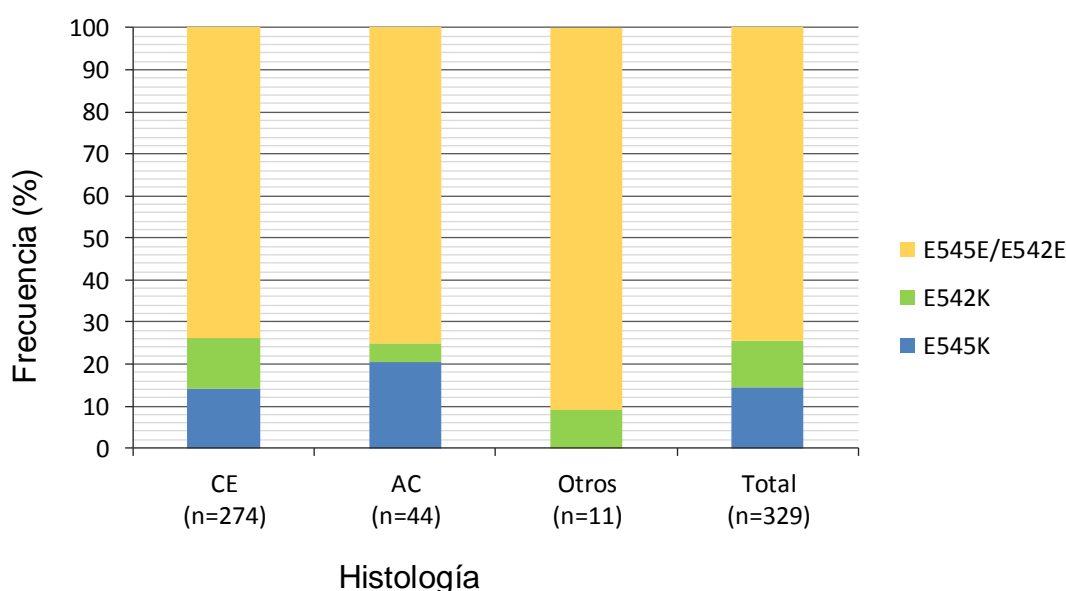
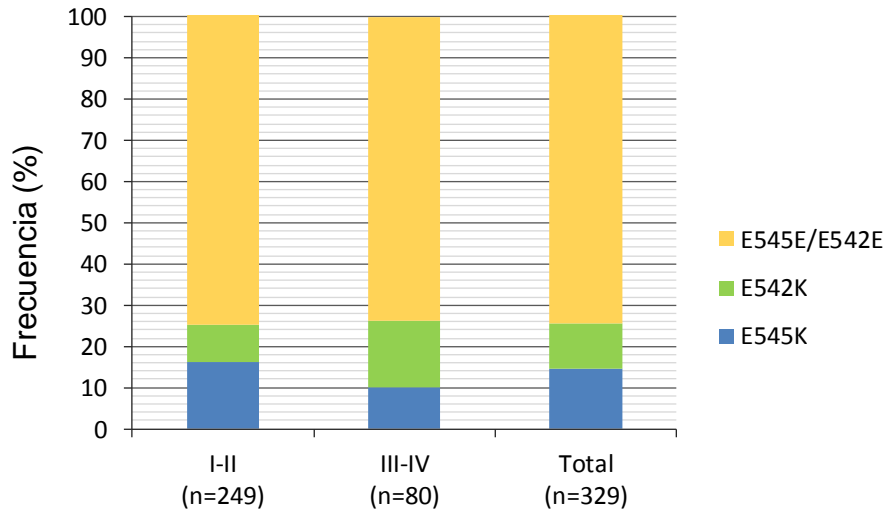


Figura 5. Frecuencia de las mutaciones E542K y E545K de acuerdo al tipo histológico. La figura muestra la frecuencia (%) de las mutaciones E542K y E545K de acuerdo al tipo histológico en las 274 muestras de carcinoma epidermoide (CE) y 44 muestras de adenocarcinoma (AC).

Cuando se consideró el estadio clínico FIGO no se encontró diferencia en la frecuencia de al menos una de las mutaciones de *PIK3CA*. Al analizar las mutaciones de manera individual, E545K fue más frecuente (16.1%, n = 40) en los estadios iniciales (I-II) mientras que la mutación E542K fue más frecuente (16.3%, n = 13) en los estadios avanzados (Figura 6).



FIGO

Figura 6. Frecuencia de las mutaciones E542K y E545K de acuerdo a la clasificación FIGO. La figura muestra la frecuencia (%) de las mutaciones E542K y E545K según la clasificación FIGO que esta agrupada en estadio I-II (n = 249) y III-IV (n = 80).

ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON CC POR GRUPOS DE EDAD.

En el total de los casos (Tabla 3), los VPHsAR fue el factor con OR más alto (116.9, IC 68.6-199.3). Cuando se analizó el tipo viral de manera individual, el OR para VPH16 se incrementó hasta 201.3 (IC 93.1-435.5), seguido de los VPH18/45 (OR = 116.6, IC 56.4-491.7). El OR de cada tipo viral al considerar los grupos de edad ≤ 50 años y ≥ 51 años se modificó radicalmente. Mientras que en las mujeres jóvenes los VPHs18/45 confirieron el mayor riesgo (OR = 470.4, IC 60-3688.9), el VPH16 fue para las mujeres de mayor edad (OR = 364.9, IC 81.2-1639.4), en una proporción de 4 y 3 veces mayor respectivamente, en relación al total.

Cuando se consideró al menos una de las mutaciones de *PIK3CA* en el total de las pacientes, el riesgo fue similar al conferido por los VPHsAR. Sin embargo en los grupos de edad, este riesgo disminuye, siendo inferior al dado por los VPHsAR de mayor riesgo específico para cada grupo (Tabla 3, grupos de edad). El riesgo de desarrollar CC al presentar un mutación de

PIK3CA fue el doble en las mujeres mayores (81, IC 11-595.7) que en las mujeres jóvenes (40.1, IC 5.4-297.2).

De los 8 factores de estilo de vida analizados individualmente en el total de la muestra (Tabla 3, factores de estilo de vida), sólo “anticonceptivos orales” no proporcionó un riesgo estadísticamente significativo para desarrollar CC. El OR de cada uno de los factores fue inferior al de los VPHsAR y las mutaciones de *PIK3CA*. Cuando se consideró la edad de las pacientes, algunos factores no aportaron riesgo para desarrollar CC.

Con el análisis de RLM se determinó que factores otorgaron de forma independiente un riesgo de desarrollar CC (negritas en Tabla 3): VPHsAR, mutaciones de *PIK3CA*, “edad de la primera relación sexual”, “número de hijos” y “prueba de Papanicolaou previa”, con la omisión de “número de hijos” en las mujeres de mayor edad. Con este modelo, se descartó la hipótesis nula ($P < 0.0001$, likelihood ratio test); se ajustaron los datos ($P > 0.05$, Hosmer-Lemeshow test) y se obtuvo una predicción global del 81.9% en las mujeres ≤ 50 años y del 83.2% en las mujeres ≥ 51 años. Mientras que los VPHsAR explicaron el 73.4 % ($r^2 = 0.734$ Nagelkerke) de los casos de CC en las mujeres jóvenes y 74.2% ($r^2 = 0.742$ Nagelkerke) en las mujeres mayores, las mutaciones de *PIK3CA* sólo explicaron el 13.6% ($r^2 = 0.136$ Nagelkerke) y el 27.5% ($r^2 = 0.275$ Nagelkerke) respectivamente. Esto confirmó que las variables explicativas en cada grupo fueron independientes y contribuyeron al desarrollo temprano o tardío de CC.

a El grupo control se tomó como una variable de referencia (OR = 1) ; los OR se calcularon mediante un modelo de regresión logística , con valor de p y un intervalo de confianza del 95 %.
b VPH negativos incluye a otros VPHs AR y VPHs BR
c Incluye a los VPHs AR 33/35/39/52/56/59/66/68
d No se conto con la información de 5 pacientes
e No se conto con la información de 5 pacientes
f No se conto con la información de 3 pacientes
g No se conto con la información de 3 pacientes
h Incluye a mujeres nuliparas
i Incluye a pacientes que asistieron una vez a la citología

Tabla 3. Asociación de las mutaciones de PIK3CA, VPHsAR y factores de estilo de vida en pacientes con CC por grupos de edad.

Factores	Grupos de edad: % (n)				Total							
	≤50		≥51		Controles		Casos		OR (95% CI) ^a		P	
Tipo viral												
VPH AR negativo ^b	8 (14)	90.8 (178)	1	93.1 (161)	9.8 (15)	93.1 (161)	1	8.8 (29)	91.9 (339)	1	116.9 (64.6-198.3)	<0.0001
VPH AR	92 (162)	9.2 (18)	114.4 (55.1-237.5)	6.9 (12)	90.2 (138)	6.9 (12)	123.4 (55.9-272.6)	91.2 (300)	8.1 (30)	1	201.3 (93.1-435.5)	<0.0001
VPH16	49.4 (87)	3.6 (7)	158 (61.6-405.7)	1.2 (2)	44.4 (68)	1.2 (2)	364.9 (81.2-1639.4)	47.1 (155)	2.4 (9)	1	166.6 (96.4-491.7)	<0.0001
VPH18/45	21 (37)	0.5 (1)	470.4 (60-3688.9)	1.7 (3)	13.1 (20)	1.7 (3)	71.6 (19-268.9)	17.3 (57)	1.1 (4)	1	60.5 (31.8-115.1)	<0.0001
VPHs otros	21.6 (38)	5.1 (10)	48.3 (20-116.9)	4 (7)	32.7 (50)	4 (7)	76.7 (29.6-198.6)	26.7 (88)	4.6 (17)	1		
Total	100 (176)	100 (196)		100 (173)	100 (153)	100 (173)		100 (329)	100 (369)	1		
Mutaciones en PIK3CA												
E545E/E542E	83 (146)	99.5 (195)	1	99.4 (172)	68 (104)	99.4 (172)	1	76 (250)	99.7 (368)	1	116.3 (16.1-841.3)	<0.0001
E545K/E542K	17 (30)	0.5 (1)	40.1 (5.4-297.2)	0.6 (1)	32 (49)	0.6 (1)	81 (11-595.7)	24 (79)	0.3 (1)	1		
Total	100 (176)	100 (196)		100 (173)	100 (153)	100 (173)		100 (329)	100 (369)	1		
Edad de la primera relación sexual^a												
>18	19 (33)	46.9 (92)	1	55.5 (96)	31.3 (47)	55.5 (96)	1	24.7 (80)	50.9 (188)	1	3.2 (2.3-4.4)	<0.0001
≤18	81 (141)	53.1 (104)	3.8 (2.4-6.1)	44.5 (77)	68.7 (103)	44.5 (77)	2.7 (1.7-4.3)	75.3 (244)	49.1 (181)	1		
Total	100 (174)	100 (196)		100 (173)	100 (150)	100 (173)		100 (324)	100 (369)	1		
Número de parejas sexuales durante el transcurso de la vida^a												
1	37.4 (65)	52.6 (103)	1	59.5 (103)	48.7 (73)	59.5 (103)	1	42.6 (138)	55.8 (206)	1	1.7 (1.3-2.3)	<0.0001
≥2	62.6 (109)	47.4 (93)	1.9 (1.2-2.8)	40.5 (70)	51.3 (77)	40.5 (70)	1.6 (1.2-2.4)	57.4 (186)	44.2 (163)	1		
Total	100 (174)	100 (196)		100 (173)	100 (150)	100 (173)		100 (324)	100 (369)	1		
Estado civilⁱ												
Casada	48 (84)	54.1 (106)	1	54.3 (94)	37.1 (56)	54.3 (94)	1	42.9 (140)	54.2 (200)	1	1.6 (1.2-2.1)	<0.005
Otro	52 (91)	45.9 (90)	1.3 (0.8-1.9)	45.7 (79)	62.9 (95)	45.7 (79)	2 (1.3-3.2)	57.1 (186)	45.8 (169)	1		
Total	100 (175)	100 (196)		100 (173)	100 (151)	100 (173)		100 (326)	100 (369)	1		
Edad del primer embarazo												
>19 ^h	47.2 (83)	67.9 (133)	1	72.8 (126)	63.4 (97)	72.8 (126)	1	54.7 (180)	70.2 (259)	1	1.9 (1.4-2.7)	<0.0001
≤19	52.8 (93)	32.1 (63)	2.4 (1.6-3.6)	27.2 (47)	36.6 (56)	27.2 (47)	1.5 (1.2-2.5)	45.3 (149)	29.8 (110)	1		
Total	100 (176)	100 (196)		100 (173)	100 (153)	100 (173)		100 (329)	100 (369)	1		
Número de hijos^a												
3 ^b	49.1 (85)	78.6 (154)	1	48 (83)	20 (29)	48 (83)	1	35.8 (114)	64.2 (237)	1	3.2 (2.3-4.4)	<0.0001
≥4	50.9 (88)	21.4 (42)	3.8 (2.4-6)	52 (90)	80 (116)	52 (90)	3.7 (2.2-6.1)	64.2 (204)	35.8 (132)	1		
Total	100 (173)	100 (196)		100 (173)	100 (145)	100 (173)		100 (318)	100 (369)	1		
Uso de anticonceptivos												
No	76.1 (134)	77 (151)	1	79.8 (138)	85 (130)	79.8 (138)	1	80.2 (264)	78.3 (289)	1	0.9 (0.6-1.3)	0.53
Si	23.9 (42)	23 (45)	1.1 (0.7-1.7)	20.2 (35)	15 (23)	20.2 (35)	0.7 (0.4-1.2)	19.8 (65)	21.7 (80)	1		
Total	100 (176)	100 (196)		100 (173)	100 (153)	100 (173)		100 (329)	100 (369)	1		
Tabaquismo												
No	81.3 (143)	84.2 (165)	1	86.7 (150)	73.9 (113)	86.7 (150)	1	77.8 (256)	85.4 (315)	1	1.7 (1.1-2.5)	<0.05
Si	18.8 (33)	15.8 (31)	1.2 (0.7-2.1)	13.3 (23)	26.1 (40)	13.3 (23)	2.3 (1.3-4.1)	22.2 (73)	14.6 (54)	1		
Total	100 (176)	100 (196)		100 (173)	100 (153)	100 (173)		100 (329)	100 (369)	1		
Previo papanicolaou												
Si ^f	38.6 (68)	81.1 (159)	1	80.3 (139)	26.8 (41)	80.3 (139)	1	33.1 (109)	80.8 (298)	1	8.5 (6-12)	<0.0001
No	61.4 (108)	18.9 (37)	6.8 (4.3-10.9)	19.7 (34)	73.2 (112)	19.7 (34)	11.2 (6.7-18.8)	66.9 (220)	19.2 (71)	1		
Total	100 (176)	100 (196)		100 (173)	100 (153)	100 (173)		100 (329)	100 (369)	1		

DISCUSIÓN

En este estudio de casos y controles, encontramos una frecuencia del 24% de las mutaciones E545K/E542K del gen *PIK3CA* y se asociaron principalmente a las mujeres con CC de mayor edad, siendo un factor de riesgo importante para este grupo (OR = 116.3, IC 16.1-841.3). No identificamos una asociación entre las mutaciones de *PIK3CA* y los VPHsAR, los cuales son el factor necesario para el desarrollo de CC. Posiblemente estos dos factores actúan de forma independiente en el proceso de carcinogénesis cervical. Algunos factores del estilo de vida de las pacientes contribuyen de forma independiente y en menor medida en el desarrollo de CC.

E545K/E542K del gen *PIK3CA* pueden ser mutaciones somáticas que se acumulan durante la vida de las pacientes en las células cervicales. Sin embargo, cabe la posibilidad que sean mutaciones de la línea germina, representando un factor intrínseco de riesgo para CC. Una forma de confirmarlo es mediante la identificación de ambas mutaciones en células no relacionadas con el cérvix, como lo son las células sanguíneas en las pacientes que presentaron las mutaciones de *PIK3CA*.

Estudios recientes de secuenciación a gran escala del genoma tumoral han revelado que *PIK3CA* es el oncogén más mutado en diferentes tipos de cáncer [50]. Las mutaciones en *PIK3CA* son comunes en cáncer de colon, mama y endometrio, con frecuencias del 20-40% [2]. La frecuencia de las mutaciones puntuales E542K y E545K del exón 9 de *PIK3CA* encontrada para CC en este estudio es similar a la frecuencia reportada por un trabajo previo que incluyó muestras de CC de varios países de Latinoamérica, incluyendo a México, en el que se consideró el total de mutaciones para este gen [18]. Estudios de Suecia y Noruega reportan frecuencias menores del 8.5% y 14%, respectivamente [19, 20].

Las alteraciones genéticas son comunes en el desarrollo tumoral, siendo las mutaciones somáticas un elemento necesario e indispensable para diferentes tumores. A diferencia de otros tumores en el CC las proteínas virales E6 y E7 juegan un papel preponderante en la transformación neoplásica. Algunos genes que se encuentran recurrentemente mutados en CC son; *PTEN* (6%), *STK11* (4%), *MAPK1* (8%), y *KRAS* (8%) [51, 20]. Sin embargo, estas frecuencias son menores a las reportadas para *PIK3CA* y a la encontrada en este estudio,

demostrando que las mutaciones de *PIK3CA* tienen una jerarquía mayor en el CC. Las mutaciones de *PIK3CA* pueden ser consideradas como una mutación conductora, que se conserva durante la carcinogénesis. A diferencia de las mutaciones pasajeras que no tienen una relevancia y no se perpetua en el genoma.

Las mutaciones puntuales E542K y E545K en CC representan el 80% de las mutaciones de *PIK3CA*, a diferencia de otros tumores donde la mutación H1047R del exón 20 es la más frecuente [18]. La mutación H1047R se localiza en el dominio cinasa de la proteína de *PIK3CA* (P110 α), generando un cambio conformacional del dominio catalítico que favorece una mayor zona de contacto con su sustrato PIP2 [45].

Las mutaciones E542K y E545K son mutaciones de cambio de sentido que resultan en la sustitución de un ácido glutámico por una lisina en la posición 545 y 542 del dominio helicoidal de la proteína de *PIK3CA*. Se ha demostrado que ambas mutaciones debilitan la interacción de la subunidad reguladora P85, permitiendo la interacción con pequeñas GTPasas [46]. Las mutaciones del dominio helicoidal y del catalítico (H1047R) originan una ganancia de función de la enzima de *PIK3CA*, resultando en una sobre activación de la vía PI3K/AKT que promueve la carcinogénesis tumoral [52]. La vía PI3K es activada por la estimulación de receptores con actividad de tirosina cinasa, la generación de PIP3 por parte de PI3K recluta a proteínas adaptadoras como PDK-1 y a la cinasa AKT. AKT es una cinasa de serina/treonina que regula múltiples procesos celulares como son la proliferación, metabolismo, apoptosis, crecimiento y migración [28].

La alta frecuencia de mutaciones E545K/E542K de *PIK3CA* en CC, nos sugiere una ventaja selectiva en el proceso de la carcinogénesis cervical. El CC es una complicación poco frecuente (10%) de la infección viral, la mayoría de las infecciones son transitorias y no evolucionan a lesiones neoplásicas [53]. Se ha demostrado que la infección por el VPH por sí sola no causa CC y que factores genéticos como duplicaciones, deleciones, mutaciones puntuales o regulación epigenética, contribuyen al desarrollo de un cáncer invasivo [12]. En este sentido, estudios *in vitro* han demostrado que la activación de la vía PI3K es muy

importante en el proceso de inmortalización celular por el VPH [22]. Por tanto, las mutaciones de *PIK3CA*, podrían considerarse mutaciones conductoras en la expansión clonal de células inmortalizadas por el VPH.

Una mayor proporción de las mutaciones de *PIK3CA* se encontró en los tumores de las mujeres de mayor edad (≥ 51), en los cuales aumentó la frecuencia de los VPHsAR pero de bajo potencial oncogénico, como ya ha sido reportado, a diferencia de las mujeres jóvenes que presentaron una alta frecuencia de los tipos virales 16, 18/45 y 39 [4]. Al analizar la relación de frecuencias entre las mutaciones de *PIK3CA* y los VPHsAR, se observó que las mutaciones son independientes del tipo viral. Posiblemente las mujeres positivas para VPHsAR de bajo potencial oncogénico evolucionaron a CC a través de la acumulación de un mayor número de alteraciones genéticas, como son las mutaciones de *PIK3CA*. En este contexto, se sugiere que a diferencia de los VPH16 y 18 (de alto potencial oncogénico), los otros VPHsAR requieren mutaciones claves para poder generar una lesión preneoplásica y posteriormente una lesión invasora. Las mutaciones de *PIK3CA* pueden ser relevantes para este tipos VPHsAR, confiriéndoles ciertas ventajas para la progresión tumoral, ya que *PIK3CA* forma parte de la vía PI3K, la cual regula múltiples proceso que son necesarios para el mantenimiento tumoral.

En este estudio se volvió a corroborar que el VPH es el principal factor de riesgo para desarrollar CC. Además demostramos que las mutaciones E545K/E542K de *PIK3CA* y algunos factores de vida de las pacientes proporcionan un riesgo aditivo para CC. El OR de las mutaciones de *PIK3CA* fue significativo y mayor que el OR de los factores de estilo de vida en el análisis total y por grupos de edad. El OR de las mutaciones aumentó el doble en las mujeres ≥ 51 en comparación de las mujeres jóvenes, representando un riesgo mayor para este grupo de edad. El OR de los VPHsAR fue el más alto en las mujeres jóvenes, mientras que en las mujeres ≥ 51 años, el OR de las mutaciones y el OR de los VPHs 18/45 y los otros VPHsAR fueron similares, sin representar un riesgo mayor que el VPH 16. Esto nos confirma

que las mutaciones de *PIK3CA* tienen un papel muy importante en las mujeres de edad avanzada representando un cofactor para los VPHsAR.

La ganancia de función que se genera por las mutaciones E545K/E542K en *PIK3CA* impactan en el fenotipo tumoral debido a los procesos celulares que regula. Se ha demostrado que la sobre activación de la vía PI3K/AKT está frecuentemente relacionada con tumores más agresivo resistentes a terapias como inhibidores de cinasas, radiaciones, citotóxicos y biológicos [54]. Por su parte, estudios *in vitro* demuestran que células de CC con la mutación E545K de *PIK3CA* muestran resistencia a la administración de cisplatino, una droga utilizada como agente terapéutico en diferentes tumores [55].

Actualmente inhibidores de la vía PI3K/AKT se están evaluando en modelos pre-clínicos para determinar si pueden restaurar la sensibilidad de los agentes terapéuticos cuando se administran en combinación. En cáncer de mama, pulmón y glioblastoma, se han encontrado evidencias pre-clínicas que demuestran que los inhibidores de PI3K o mTOR pueden restaurar esta sensibilidad [56]. Algunos de los inhibidores de la vía PI3K mejor caracterizados son wormamina y LY294002. Ambos han demostrado ser agentes anti tumorales eficaces en modelos *in vitro* e *in vivo*. LY294002 es ser un inhibidor *in vitro* de PI3K y de la fosforilación río abajo de *PIK3CA* en cáncer de mama y colon. Sin embargo, debido a su marcada citotoxicidad, LY294002 y wormanina no tienen una utilidad clínica. Además no son ideales para la inhibición específica de las mutaciones en *PIK3CA*, ya que pueden inhibir otras cinasas de la familia PI3K. Recientemente, varios grupos están desarrollando inhibidores más selectivos de *PIK3CA* con mejor eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo*. Inhibidores de la vía PI3K como XL147 (Exilixis), BEZ235 (Novartis), y GDC-0941 (Genentech) se encuentran en ensayos pre-clínicos de fase 1 [54]. También se ha reportado que el uso de algunos inhibidores de la vía PI3K en pacientes con tumores metastásicos, que presentan mutaciones en *PIK3CA* tienen una mayor tasa de sobrevida en comparación de los pacientes sin mutaciones en el gen [24]. En este sentido, el perfil de mutaciones de *PIK3CA* permitirá la selección de pacientes que pueden tener una alta probabilidad de respuesta a inhibidores de

la vía PI3K. El estatus de mutaciones de *PIK3CA* puede ser usado como un biomarcador o blanco terapéutico en CC. Sin embargo se necesitan más estudios para entender los mecanismos moleculares de cómo las mutaciones de *PIK3CA* favorecen la carcinogénesis cervical y el diseño de inhibidores específicos que reconozcan las mutaciones más frecuentes en CC.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES.

Los resultados de este estudio nos permiten entender la relevancia que tienen las mutaciones en el CC. Se ha demostrado que las mutaciones E545K/E542K de *PIK3CA* tienen una frecuencia del 24% en CC. La mayor proporción de las mutaciones se presentan en los tumores de las mujeres de edad avanzada, los cuales son positivos a VPHsAR con bajo potencial oncogénico. Las mutaciones de *PIK3CA* generan un riesgo alto de desarrollar CC, con una relación proporcional a la edad de la paciente. El conocer el perfil de mutaciones de los tumores también nos permite identificar posibles blancos terapéuticos.

PERSPECTIVAS.

El encontrar una alta frecuencia de mutaciones de *PIK3CA*, genera la necesidad de investigar cuales son los mecanismos moleculares por los cuales *PIK3CA* participa en la carcinogénesis cervical. Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* de silenciamiento o sobreexpresión de las formas mutantes de *PIK3CA*, y ensayos de proliferación, metabolismo, apoptosis y crecimiento celular, se podrá tener un acercamiento de cómo participan las mutaciones en CC. Para determinar si las mutaciones de *PIK3CA* se acumulan durante la carcinogénesis cervical, un estudio con muestras de lesiones pre neoplásicas (LIE) nos permitirá corroborar esta afirmación. Por otro lado, para descartar que las mutaciones pertenezcan a la línea germinal en las pacientes con CC, un estudio del perfil de *PIK3CA* de muestras de cérvix y células no relacionadas con el mismo, nos permitirá demostrar que pertenecen al linaje somático.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torre, A. L. et al. (2015) Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 65: 87-108.
2. Walboomers, J. M. et al. (1999) Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J Pathol.* 189:12-19.
3. Muñoz, N. et al. (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *NN Engl J Med.*348: 518-27.
4. Estrada, G. M. et al. (2014) The Distribution of High-Risk Human Papillomaviruses Is Different in Young and Old Patients with Cervical Cancer. *Plos one.* 9: e109406.
5. Spriggs, A. I. et al. (1980) Progression and regression of cervical lesions. Review of smears from women followed without initial biopsy or treatment. *J Clin Pathol.* 33: 517-522.
6. Kaur, P. et al. (1989) Immortalization of Primary Human Epithelial Cells by Cloned Cervical.Carcinoma DNA Containing Human Papinomavirus Type 16 E6/E7 Open Reading Frames. *J. Gen. Virol.* 70: 1261-1266.
7. Hawley, N. P. et al (1989) HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *J EMBO.* 8:3905-3910.
8. Crook, T. Tidy, J. A and Vousden, K. H. (1991) Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell.* 67: 547-556.
9. Jones, D. L. et al. (1996) Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Semin Cancer Biol.* 7:327-337
10. Lipinski, M. M and Jacks, T. (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene.*18: 7873-7882.
11. Cheng, S. et al. (1995) Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes and Development.* 9:2335-2349.
12. Magnusson, P. K and Gyllensten, U. B. (2000) Cervical cancer risk: is there a genetic component?. *Mol Med Today.* 6:145-148.

13. IARC. (1995) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Human Papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Human. 64.
14. Campo, S. M. (1992) Cell transformation by animal papillomaviruses. *J Gen Virol.* 73:217-222
15. Weir, B. et al. (2004) Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell.* 6:433-438.
16. Medina, M. I. et al. (2014) Impact of gene dosage on gene expression, biological processes and survival in cervical cancer: a genome-wide follow-up study. *Plos one.* 9e97842.
17. Vázquez, M. O. et al. (2012) Amplified genes may be overexpressed, unchanged or downregulated in cervical cancer cell lines. *Plos one.* 7: e33667.
18. Lou, H. et al. (2015) Genome Analysis of Latin American Cervical Cancer: Frequent Activation of the PIK3CA Pathway. *Clin Cancer Res.* 14-1837.
19. Cui, B. et al. (2009) Mutation of PIK3CA: Possible risk factor for cervical carcinogenesis in older women. *IJC.* 34: 409-416.
20. Ojesina, I. A. et al. (2013) Landscape of genomic alteration in cervical carcinomas. *Nature.* 506: 371-375.
21. Ma, Y. Y. et al. (2000) PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene.* 19: 2739-2744.
22. Henken, F. E. et al. (2011) PIK3CA-mediated PI3-kinase signalling is essential for HPV-induced transformation in vitro. *Mol Cancer.* 10:71.
23. Janku, F. et al. (2011) PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *MCT.* 10: 558-565.
24. Hou, M. M. et al. (2014) Targeted PI3K/AKT/mTOR therapy for metastatic carcinomas of the cervix: a phase 1 clinical experience. *Oncotarget.* 5: 11168-11179.
25. McIntyre, B. J. et al (2013) PIK3CA mutational status and overall survival in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy. *Gynecologic Oncology.* 128: 409-414.

26. Samuels, Y. et al. (2005) Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 7: 561-573.
27. Samuels, Y and Velculescu, V. E. (2004) Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*. 3:1221-1224.
28. Foster, M. F. et al. (2003) The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *JCS*. 116: 3037-3040.
29. Engelman, J. A., Luo, J and Cantley, L. C. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinase as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genetics*. 7: 606-619.
30. Wymman, P. M and Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biofys Acta*. 1436: 127-150.
31. Huang, H. C. et al. (2007) The structure of a human p110alpha / p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science*. 318: 1744-1748.
32. Karakas, B. Bachman, E. K. And Park, H. B. (2006) Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer*. 94: 455-459.
33. Backer, M. J. et al. (2010) The regulation of class IA PI3-Kinases by inter-subunit interaction. *CT Microbiol Immunol*. 346: 87-114.
34. Katso, R. Et al. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17: 615-675.
35. Manning, D. B and Cantley, C. L. (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129: 1261-1274.
36. Fresno, V. AJ. et al. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cáncer. *Cancer Treat Rev*. 30: 193-204.
37. Vivanco, I and Sawyers, L. C. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2:489-501.
38. Franke, F. T. (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*. 27: 6473-6488.

39. Sabatini, D. M. (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*. 6:729-734.
40. Jiang, H. B and Liu, Z. L. (2008) PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *BBA*. 1784: 150-158.
41. Samuels, Y. et al. (2004) High Frequency of Mutations of the *PIK3CA* Gene in Human Cancers. *Science*.
42. Meyer, D. S. et al. (2013) Expression of PIK3CA mutant E545K in the mammary gland induces heterogeneous tumors but is less potent than mutant H147R. *Oncogenesis*. 2.
43. Bader, A. G., Kang, S., and Vogt, P. K. (2006) Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *PNAS*. 103: 1475-1479.
44. Carson, D. J. et al. (2008) Effects of oncogenic p110 α subunit mutations on the lipid kinase activity of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*. 409: 519-524.
45. Vadas, O. et al. (2011) Structural Basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Science Signaling*. 4:
46. Zhao, L and Vogt, PK. (2008) Helical domain and kinase domain mutations in P110 α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *PNAS*. 105: 2652-2657.
47. Zhao, L and Vogt, PK. (2010) Hot-spot mutations in P110 α of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS. *Cell Cycle*. 9: 596-600.
48. Hao, Yujun. et al. (2016) Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. *Nature C*. 7: 119-171.
49. Wang Yihui, et al. (2014) microRNA-375 inhibits colorectal cancer growth by targeting PIK3CA. *BBRC*. 444: 199-204.
50. Lawrence, M. S. et al. (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumours types. *Nature*. 505: 495-501.
51. Chang, T. M. et al. (2016) Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nature*. 34: 155-163.

52. Mandelker, D. et al. (2009) A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3K α and the membrane. *106*: 16996-17001.
53. Shiffman, M. et al. (2007) Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. *370*: 890-907.
54. Burris, A. H. (2013) Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *CCPharmacology*. *71*:829-842.
55. Arjumand, W. et al. (2016) Phosphatidylinositol-3 kinase (PIK3CA) E545K mutation confers cisplatin resistance and a migratory phenotype in cervical cancer cell. *Oncotarget*.
56. John, P. G. et al (2010) The PIK3CA gene as a mutated target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. *8*: 733-740.