

Mutaciones Ha-RAS en fibroblastos del estroma cervical de neoplasias escamosas de cuello uterino

Ha-RAS mutations in cervical stromal fibroblasts of squamous neoplasia of the cervix

Pablo Moreno-Acosta¹, Schyrly Carrillo¹, Martha Serrano², Diana Núñez¹, Alfredo Romero-Rojas³

1 Grupo Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Colombia.

2 Grupo Área de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Colombia.

3 Grupo de Patología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Colombia.

Resumen

Objetivo: Detectar mutaciones del oncogén Ha-RAS en fibroblastos del estroma de biopsias de la zona de transformación del cuello uterino. **Métodos:** Se seleccionaron ocho muestras de tejido fresco congelado de pacientes diagnosticadas con neoplasia intraepitelial de cuello uterino, de tipo escamoso (NIC I, NIC II, NIC III), cáncer *in situ* y carcinoma escamocelular infiltrante, tejido en el cual sólo se encontraba representado el estroma, sin evidencia de componente epitelial tumoral residual, y para cada uno de los cuales se contaba con el tejido cervical de control incluido en parafina, que confirmaba la presencia de proceso neoplásico escamoso cervical. La detección de mutaciones Ha-RAS codón 12 fue realizada mediante un PCR-SSCP no radiactivo y análisis enzimático de restricción. **Resultados:** La mutación hallada para un cambio de una glicina por una valina en el codón 12 del oncogén Ha-RAS fue detectada en una sola muestra (12,5%), NIC III. **Conclusiones:** La presencia de una alteración molecular, mutación puntual del oncogén Ha-RAS en el estroma de uno de estos casos analizados, representa un cambio importante, y sugiere una vía alterna que podría involucrar inestabilidad genética estromal en la generación de neoplasias intraepiteliales y progresión del cáncer de cuello uterino.

Palabras clave: Ha-RAS, mutación, fibroblastos, estroma, neoplasia, cuello del útero.

Abstract

Objective: To detect Ha-Ras oncogene mutations in stromal fibroblasts in biopsies in the cervical transformation zone. **Methods:** Eight samples were selected of fresh frozen tissue taken from patients diagnosed with intraepithelial neoplasia of the cervix, squamous type (NIC I, NIC II, NIC III), cancer *in situ*, and invasive squamous cell carcinoma, tissue in which only stroma was represented, with no evidence of residual tumor epithelial component; from each, the control cervical paraffin fixed tissue was counted which confirmed the presence of squamous cervical neoplastic process. The detection of codon 12 Ha-RAS mutations was carried out with non radioactive PCR-SSCP and restriction enzyme analysis. **Results:** The revealed mutation that altered a glycine into a valine in the codon 12 of the Ha-RAS oncogene

Correspondencia:

Pablo Moreno Acosta. Grupo Investigación en Biología del Cáncer, Subdirección de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología. Av. 1ª No. 9-85, Bogotá, Colombia. Teléfono: 334 1122, ext. 4203.

Correos electrónicos: dajup63@yahoo.com, pmoreno@cancer.gov.co

Fecha de recepción: 25 de agosto del 2009. Fecha de aprobación: 23 de marzo del 2010.

was detected in only one sample (12.5%), NIC III. **Conclusions:** The presence of molecular alteration, punctual mutation of the Ha-RAS oncogene in the stroma of one of the cases analyzed represents an important change and suggests an alternate route that could involve stromal genetic stability in the generation of intraepithelial neoplasia and in the progression of cervical cancer.

Key words: Ha-RAS, mutation, fibroblasts, stroma, neoplasia, cervix uteri

Introducción

El estroma es un elemento importante para el tejido epitelial; se trata de una capa subepitelial compuesta de matriz extracelular y de varios tipos de células. El estroma es mantenido, remodelado y reparado por fibroblastos residentes, apoya e instruye al epitelio y es esencial para la función epitelial (1). Actualmente se reconoce que los cambios del estroma son necesarios para el establecimiento de cáncer, pues anteriormente se los consideraba como espectadores frente a la expansión clonal y frente a la adquisición de características malignas de las células tumorales (2). Un estroma anormal puede ser considerado como un promotor clásico en la terminología de la carcinogénesis, por cuanto la disfunción de las interacciones de epitelio-mesenquimal normal incrementan la posibilidad de que la lesión preneoplásica progrese a malignidad (2).

Las células estromales tienen una función básica de sostén en los tejidos humanos como derivados mesenquimales; sin embargo, también es conocido que contribuyen tanto a la supresión tumoral como a la progresión; incluso, algunos estudios sugieren que la proporción de inhibidores de los promotores estromales determina el destino de las células tumorales (3). La mayoría de estudios sobre el estroma y su relación con la generación, progresión y metástasis de neoplasias se han centrado, especialmente, en cánceres como el de mama (1-6), y otros como el cáncer de próstata (4,6), el gástrico (6), el colorrectal (7) y el de cuello uterino (8,9). Los reportes sobre cáncer cervical abordan, específicamente, aspectos como rasgos genómicos y clonalidad en carcinogénesis cervical. Sin embargo, ni la presencia de mutaciones en oncogenes Ha-RAS en células estromales ni su contribución a la generación y progresión de neoplasias escamosas cervicales han sido reportadas aún.

La activación de oncogenes por mutaciones puntuales fue descrita inicialmente en genes de la familia RAS; específicamente, en Ha-RAS, familia compuesta por tres genes altamente homólogos: Ha-RAS, K-RAS y N-RAS, los cuales codifican para una proteína de 21 Kd (10,11), que en las células tumorales determina la síntesis de una proteína RAS mutada que permanece activa de manera constante. De esta forma se desequilibra la regulación de la proliferación, y las células afectadas se independizan de la acción enzimática reguladora de las proteínas activadoras de la GTPasa, lo cual contribuye a la progresión de la enfermedad (10).

Se ha demostrado que la introducción de una copia de ADN de RAS mutado induce la transformación neoplásica en líneas celulares normales (10,12). Además, en varios tumores humanos han sido reportadas diferentes mutaciones puntuales de los genes RAS (13-15), incluyendo el cáncer de cuello uterino y neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC I, NIC II, NIC III) (16-24), pero no en fibroblastos, que constituyen parte del estroma de sostén del cuello uterino.

Teniendo en cuenta que la frecuencia de mutación de Ha-RAS en cáncer de cuello uterino se estima entre el 6% y el 24% (16,17) en muestras que presentan un porcentaje adecuado en células tumorales, y que la presencia de este tipo de mutaciones ha sido detectada en tejido normal contiguo al tumoral en otros tipos de cáncer, nos propusimos detectar mutaciones en el codón 12 del gen Ha-RAS en el estroma (tejido fibroconjuntivo-fibroblastos y vasos sanguíneos) en casos de pacientes con lesión escamosa intraepitelial de cuello uterino, cáncer *in situ* y carcinoma escamocelular infiltrante.

Para esto fue necesario establecer un protocolo específico, sensible y no radioactivo, para la detección de mutaciones, basado en el análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) (25-28) y análisis enzimático de restricción.

Métodos

Se analizaron 8 muestras de biopsias de tejido congelado de neoplasias escamosas cervicales de la zona de transformación de cuello uterino, 1 NIC I (m240), 3 NIC III (m97,m186,m375), 3 cáncer *in situ* (m7,m202,m346), 1 carcinoma escamocelular infiltrante (m51). Las biopsias fueron tomadas entre 2003 y 2004, de pacientes que asistieron a la consulta de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología. Cada caso fue confirmado histológicamente, y al examinar al recorte del respectivo bloque de parafina sólo se observó representación del estroma cervical, sin evidencia de componente epitelial tumoral residual.

Parámetros como la morfología propia de la célula fibroblástica (fusiforme, elongada), la ausencia de atipia nuclear (característica inequívocamente presente en las células epiteliales malignas), la ausencia de actividad mitótica y la confirmación inmunohistoquímica de la naturaleza mesenquimal de dicha célula (desmina y actina específica positiva), con negatividad para coctel de citoqueratinas (marcador de inmunohistoquímica que muestra filamentos intermedios de alto y bajo peso molecular, que son constituyentes celulares de las células epiteliales), fueron tomados por un médico especialista en patología oncológica, con el fin de establecer el origen mesenquimal fibroblástico de las células analizadas de cada uno de los ocho casos incluidos en el estudio.

Se emplearon como controles positivos en la reacción de PCR, 10 ng de ADN de pBR322-Ha-RAS mutado (EJ 6.6: sustitución de timina por guanina, lo cual genera un cambio del aminoácido valina por glicina en el codón 12), que corresponde a 3,3 ng de Ha-RAS mutado; y como controles negativos, 10 ng de ADN de pBR322-Ha-RAS silvestre (plásmido prototipo), 10 ng de ADN de tejido de cérvix normal.

El ADN de cada biopsia de tejido en fresco congelado se extrajo según condiciones estandarizadas en nuestro laboratorio (29).

Se seleccionaron los iniciadores sentido 5'-GACGGAAATATAAGCTGGTGG-3' (nucleótidos 1672-1692) y antisentido 5'-TGGATGGTCA-GCGCACTCTT-3' (nucleótidos 1714-1734), con un contenido en guanina-citocina (G:C) del 50% y el 52%, respectivamente. Se colocaron 10 µl del sobrenadante de ADN de cada muestra, para ser amplificado en un volumen total de 50 µl en una solución de 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, gelatina al 0,001%, 0,1 mM de dNTPs, 1,25 U de Taq polimerasa (Gibco BRL), y 25 pmol de cada iniciador (Gibco BRL).

Se emplearon 30 ciclos de amplificación en el termociclador 9600 de Perkin-Elmer. En cada ciclo se realizó un paso de denaturación (96 °C por 30 seg), anillaje (60 °C por 60 seg) y elongación (72 °C por 90 seg). Adicionalmente, se realizó un paso final de elongación por 10 min, con el fin de asegurar una extensión completa del ADN amplificado. El tamaño del producto de amplificación fue de 63 pb (pares de bases). Como control de contaminación de la PCR se empleó agua estéril, y como control de calidad del ADN se amplificó un fragmento de 102 pb del gen β-globina utilizando los iniciadores PCO3 y PCO4 (30).

De cada producto de PCR se tomaron 6 ml y se mezclaron con 10 µl de solución denaturante (formamida 95%, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,05%, xylene cyanol 0,05%). Esta mezcla se calentó a 95 °C por 6 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo, antes de aplicarla sobre el gel.

Los productos obtenidos por PCR fueron analizados en geles no denaturantes de poliacrilamida (relación acrilamida/bisacrilamida: 38:2; TBE 0,5X, Glicerol 5%; tamaño: 22 cm 17 cm × 0,1 × cm) en *buffer* TBE al 0,5X a 300 voltios, por 5 horas. El *buffer* se mantuvo en un tanque de electroforesis (CBS Scientific CO, Del mar, CA, EUA), a 17 °C. Los geles se tiñeron con AgNO₃ (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,5%, y fueron analizados en un densitómetro GS-700 (Biorad, Ramsey, Estados Unidos). Los patrones obtenidos por SSCP de cada muestra analizada fueron comparados individualmente con los patrones de referencia del plásmido prototipo c-Ha-RAS y del plásmido c-Ha-RAS mutado.

El análisis enzimático de restricción fue utilizado para discriminar entre secuencias Ha-RAS normales

y Ha-RAS mutadas. La secuencia nucleotídica de Ha-RAS normal contiene un sitio de restricción para MspI (31), mientras que la secuencia Ha-RAS mutada no los contiene. El corte enzimático del fragmento de ADN de 63 pb de Ha-RAS normal genera dos fragmentos de 32 y 31 pb, mientras que el fragmento de 63 pb mutado permanece (Figura 1).

Se mezclaron 10 ml de productos de PCR con 1,25 unidades de la enzima de restricción Msp I en un volumen final de 15 µl, de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante (Gibco BRL). La reacción fue incubada a 37 °C toda la noche, y los productos de corte enzimático fueron visualizados mediante tinción con plata, en geles de poliacrilamida, al 20%.

La sensibilidad del análisis enzimático de restricción fue evaluada mediante PCR en diluciones seriadas (100 ng-10 fg) de ADN de tejido normal y ADN del control positivo (EJ 6.6), iniciando con una dilución 1:0. Los productos amplificados y tratados con MspI fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 20%.

Resultados

El par de iniciadores o *primers* seleccionados para la amplificación del codón 12 de Ha-RAS permitió la obtención de un fragmento de 63 pb, lo que facilitó amplificar la secuencia estudiada, con una alta representatividad y especificidad en las muestras y controles analizados. Este producto de amplificación

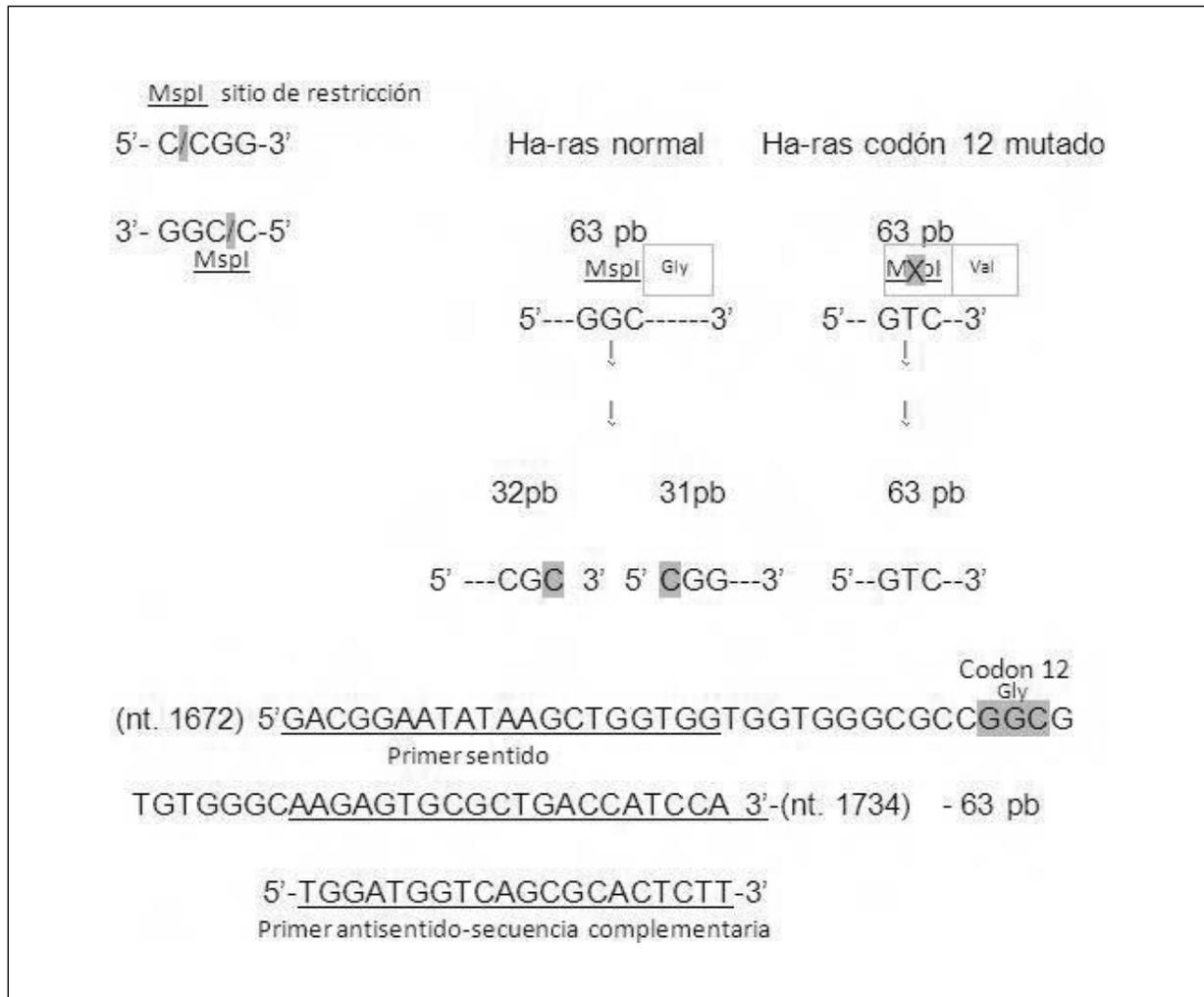


Fig. 1. Sitio de restricción MspI y secuencia de nucleótidos del exón 1 codón 12-Valina (Val) de Ha-RAS, correspondiente a un fragmento de 63 pb de ADN, con ubicación de los respectivos *iniciadores*, o *primers*.

fue analizado bajo condiciones de SSCP estandarizadas (temperatura de 16 °C, voltaje constante, composición de la mezcla de carga, composición del gel), y ello evitó la aparición de bandas adicionales no específicas, y permitió detectar e identificar mutaciones Ha-RAS.

La reproducibilidad de los resultados obtenidos por PCR-SSCP fue evaluada mediante la generación de un mismo patrón de corrido en ensayos realizados por triplicado tanto en las muestras como en los controles utilizados.

En el ensayo de sensibilidad para el análisis enzimático de restricción que confirmaba las mutaciones detectadas por PCR-SSCP, la banda de ADN mutante de 63 pb de Ha-RAS (EJ 6.6) fue aún detectable en la dilución 1:32 (10 fg de ADN mutante-EJ 6.6).

La mutación, cambio de valina (-GTC-) por glicina (-GGC-) localizada en el codón 12 del exón 1 de Ha-RAS fue detectada en un sola muestra de las ocho analizadas (12,5%). La muestra en la que se detectó esta mutación correspondía a un NIC III (m97).

Nosotros establecimos un patrón de corrido por SSCP no radioactivo, que nos permitió distinguir entre alelo mutado y alelo silvestre, y discernir así si el individuo era homocigoto o heterocigoto para la mutación.

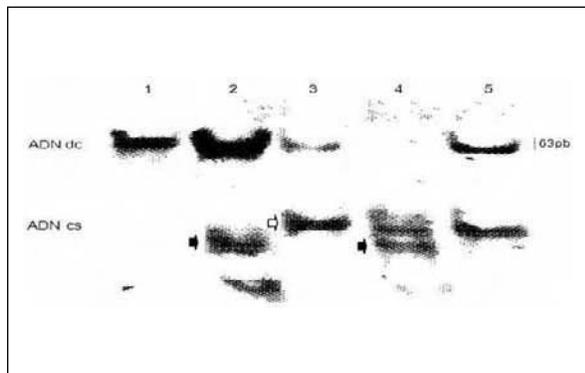


Fig. 2. Análisis PCR-SSCP de mutaciones puntuales en el exón 1 del gen Ha-RAS tejido estromal de neoplasias cervicales. Línea 1: ADN no denaturado de doble cadena (ADN dc) de EJ 6.6 (control positivo). Línea 2: EJ 6.6 (control positivo). Línea 3: ADN de EC (control negativo). Línea 4: ADN m97. Línea 5: ADN m186. Las flechas negras indican la presencia de alelos mutados (cambio de una T por una G (valina por glicina), bandas de ADN de cadena sencilla (ADN dc), y la flecha blanca indica la presencia de alelos normales, bandas de ADN de cadena sencilla (ADN cs).

Patrones representativos de SSCP de la mutación (carril 2-tipo homocigoto (EJ 6.6), carril 4-tipo heterocigoto (m97)), y no presencia de la mutación (carril 3 y 5) de controles y muestras incluidas en el estudio se muestran en la Figura 2.

Análisis de Restricción/MspI

A partir del fragmento de ADN de doble cadena con un tamaño de 63 pb, correspondiente al control positivo (EJ 6.6) (Figura 3, línea 2), no se generó ningún tipo de banda del corte enzimático con MspI, lo que indica la presencia de la mutación, cambio T por G. En el control negativo (plásmido prototipo) se generaron dos bandas de ADN de doble cadena, una de 32 pb y una de 31 pb; no se observó banda a la altura de 63 pb, lo cual demuestra la ausencia del cambio T por G (Figura 3, línea 6). La muestra 97 (NIC III) en la que se identificó la mutación T por G mediante SSCP, al corte enzimático con MspI, generó 3 fragmentos de ADN, uno de 63 pb, en el que está representado el alelo mutado, y otros 2 fragmentos de 32 y 31 pb, cuya secuencia corresponde al alelo silvestre (Figura 3, línea 4).

Discusión

Los reportes sobre cáncer de cuello uterino y estroma abordan aspectos como cambios genómicos y clonalidad en carcinogénesis cervical (8,9).

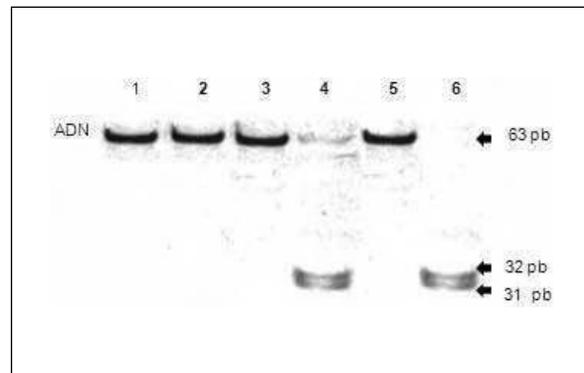


Fig. 3. Análisis del corte enzimático de restricción/MspI de productos de PCR de Ha-RAS de tejido estromal de neoplasias cervicales. Línea 1: ADN plasmídico no tratado con MspI de EJ 6.6 (control positivo). Línea 2: ADN plasmídico de EJ 6.6 (control positivo) tratado con MspI. Línea 3: ADN (m97) no tratado. Línea 4: ADN (m97) tratado; genera 3 bandas (ADN mutado de 63 pb; ADN normal de 32 y 31 pb. Línea 5: ADN (m186) no tratado. Línea 6: ADN (m186) tratado genera 2 bandas (32 y 31 pb de ADN normal).

Sin embargo, la presencia de mutaciones Ha-RAS en células estromales y su contribución a la generación y progresión de neoplasias escamosas cervicales, hasta el momento, no ha sido reportada.

En el presente estudio reportamos la presencia de una mutación puntual en el codón 12 del oncogén Ha-RAS (valina-GTC- por glicina-GGC-) en una de las muestras analizadas y diagnosticada como NIC III. En estas muestras sólo se encontraba representado el estroma cervical (fibroblastos-tejido fibroconectivo), sin evidencia de componente epitelial tumoral residual.

En este tipo de muestra la detección de mutaciones puntuales puede tener mayor dificultad si se compara su detección con muestras tumorales epiteliales, por lo cual es importante que las técnicas de análisis empleadas tengan la capacidad de detectar y describir con precisión estos cambios, sin olvidar los diversos requerimientos de sensibilidad. Estos fueron requerimientos que tuvimos en cuenta para el análisis PCR-SSCP y corte de restricción enzimático, los cuales utilizamos en este estudio.

La sensibilidad del PCR-SSCP se fundamenta en características del producto de PCR, tales como el tamaño del fragmento (tamaño óptimo menor a 300 pb), la composición de la secuencia del fragmento que se analizará (bajo número de guaninas y citocinas (G:C) y el uso de mínimas cantidades de ADN.

Para nuestros ensayos el tamaño del producto de PCR fue de 63 pb, tamaño ideal para la detección de cambios nucleotídicos, pues a menor tamaño de la secuencia por amplificar, la secuencia obtenida tendrá mayor representatividad, y ello facilitará su detección, así como la detección de mutaciones en tejido mesenquimal o en tejido epitelial, condición que nos permitió utilizar 6 µl del producto de PCR. Por consiguiente, la estandarización de condiciones para PCR-SSCP no radioactivo y análisis de restricción enzimático/MspI, como las descritas, constituye una estrategia de detección con una alta sensibilidad y especificidad, lo cual nos permitió detectar mutaciones -GTC-, en el fragmento de 63 pb de Ha-RAS en fibroblastos estromales de muestras de cuello uterino diagnosticadas como neoplasias intraepiteliales escamosas.

La presencia de una mutación de este tipo representa un cambio importante, ya que en el caso del oncogén RAS, las mutaciones impiden la conversión de la forma activa a inactiva, aun en ausencia de estímulos provenientes del medio extracelular. De esta forma, se desequilibra el control de la proliferación y las células afectadas se independizan de la acción enzimática reguladora de las proteínas activadoras de la GTPasa, lo cual contribuye a la progresión de la enfermedad (10).

Estudios de detección de mutaciones en tejido neoplásico, normal y de estroma de mama de rata, como el realizado por Maffin y cols. (32), reportan la presencia de mutaciones Ha-RAS-1 en más del 80% del tejido analizado. Ellos concluyen que estas mutaciones en el tejido transformado “no son necesarias ni suficientes” para la transformación neoplásica. Sin embargo, Matsumoto y cols. (7) consideran que la presencia de mutaciones K-RAS en tejido epitelial (45%) y en tejido estromal (55%) contribuyen al desarrollo del cáncer colorrectal. Frente a estas discrepancias debe tenerse en cuenta que la presencia de mutaciones puntuales, como parte del proceso de carcinogénesis, puede afectar el proceso neoplásico no sólo en células epiteliales, sino, también, en células estromales, de tal manera que estas puedan estimular la progresión tumoral (4).

El hecho de no haber detectado la mutación -GTC- en las siete muestras restantes puede deberse a que dicha mutación somática esté representada sólo en una pequeña fracción (aproximadamente, el 15%) del total del ADN analizado (33), así como por una probable heterogeneidad topográfica en la distribución de estas mutaciones.

La presencia de una mutación puntual del oncogén Ha-RAS —cambio de valina por glicina en el estroma de uno de estos casos analizados (NIC III)— representa un cambio importante y sugiere una vía alterna que podría involucrar inestabilidad genética estromal en la generación de neoplasias intraepiteliales y progresión del cáncer de cuello uterino.

Reconocimientos

Los autores agradecen al profesor R. Weinberg (Massachusetts Institute of Technology, Estados Unidos) y al Dr. Alejandro García Carrancá (Unidad

de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, México D. F., México), por suministrar los plásmidos EJ 6.6 y EC.

Este trabajo recibió apoyo financiero del Instituto Nacional de Cancerología a través del proyecto "Uso de sondas frías en el estudio de la relación entre HPV y Cáncer de Cuello Uterino" (Código 4103038-1).

Referencias

- Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(11):1401-14.
- Barcellos-Hoff MH, Medina D. New highlights on stromal-epithelial interactions in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(1):33-6.
- Schedin P, Elias A. Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2004;6(2):93-101.
- Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:119-50.
- Mulherkar R. The enigma of carcinogenesis - stroma or epithelial cells? *J Biosci.* 2004;29(2): 133-4.
- Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol.* 2004;2(2):206-14.
- Matsumoto N, Yoshida T, Yamashita K, Numata Y, Okayasu I. Possible alternative carcinogenesis pathway featuring microsatellite instability in colorectal cancer stroma. *Br J Cancer.* 2003;89(4):707-12.
- Gius D, Funk MC, Chuang EY, Feng S, Huettner PC, Nguyen L, et al. Profiling microdissected epithelium and stroma to model genomic signatures for cervical carcinogenesis accommodating for covariates. *Cancer Res.* 2007;67(15):7113-23.
- Hu X, Pang T, Asplund A, Pontén J, Nistér M. Clonality analysis of synchronous lesions of cervical carcinoma based on X chromosome inactivation polymorphism, human papillomavirus type 16 genome mutations, and loss of heterozygosity. *J Exp Med.* 2002;195(7):845-54.
- Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
- Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, et al. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature.* 1982;300(5888):143-9.
- Berger KL, Barriga F, Lace MJ, Turek LP, Zamba GJ, Domann FE et al. Cervical keratinocytes containing stably replicating extrachromosomal HPV-16 are refractory to transformation by oncogenic H-Ras. *Virology.* 2006;356(1-2):68-78.
- Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989;49(17):4682-9.
- Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6): 459-65.
- Karimianpour N, Mousavi-Shafaei P, Ziaee AA, Akbari MT, Pourmand G, Abedi A, et al. Mutations of RAS gene family in specimens of bladder cancer. *Urol J.* 2008;5(4):237-42.
- Riou G, Barois M, Sheng Z, Duvillard M, Lhomme C. Somatic deletions and mutations of c-Ha-ras gene in human cervical cancers. *Oncogene.* 1988;3(3):329-33.
- Landro ME, Dalbert D, Picconi MA, Cúneo N, González J, Vornetti S, et al. Human papillomavirus and mutated H-ras oncogene in cervical carcinomas and pathological negative pelvic lymph nodes: a retrospective follow-up. *J Med Virol.* 2008;80(4):694-701.
- Field JK, Spandidos DA. The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res.* 1990;10(1):1-22.
- Schneider A, Koutsky LA. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. *IARC Sci Publ.* 1992;(119):25-52.
- Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY. Expression and mutation of H-ras in Uterine Cervical Cancer. *Gynecol. Oncol.* 1996;62(1):49-54.
- Van Le L, Stoerker J, Rinehart CA, Fowler WC. H-ras codon 12 mutation in cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* 1993;49(2):181-4.
- Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AM. Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. *Cancer Lett.* 1995;95(1-2):29-32.
- Alonio LV, Dalbert D, Picconi MA, Cervantes Vazquez G, García Carrancá A, Distefano AL, et al. Ha-ras and p53 gene mutations scanned by PCR-SSCP in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix associated with human papillomavirus. *Medicina (B Aires).* 2000;60(6):895-901.
- Soh LT, Heng D, Lee IW, Ho TH, Hui KM. The relevance of oncogenes as prognostic markers in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2002;12(5):465-74.
- Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic. *PCR Methods Appl. DNA.* 1991;1(1):34-8.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(8):2766-70.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymor-

- phisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989;5(4):874-9.
28. Moreno-Acosta P, Molano M, Huertas A, de Gómez MS, Romero A, González M, et al. A non-radioactive PCR-SSCP analysis allows to distinguish between HPV 16 European and Asian-American variants in squamous cell carcinomas of the uterine cervix in Colombia. *Virus Genes*. 2008;37(1):22-30.
 29. Arias PH, Moreno AP, Corredor JC, Molano M, Orozco D, Van den Brule AJC. Detección del virus del papiloma humano por métodos no radiactivos. *Neoplasia*. 1997;14(2):45-50.
 30. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.
 31. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV. Complete nucleotide sequences of the T24 human Bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature*. 1983;302(5903):33-7.
 32. Maffini MV, Soto AM, Calabro JM, Ucci AA, Sonnenschein C. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 8):1495-502.
 33. Rangel-López A, Piña-Sánchez P, Salcedo M. Genetic variations of the tumor suppressor TP53: outstanding and strategies of analysis. *Rev Invest Clin*. 2006;58(3):254-64.