

Inestabilidad microsatelital en lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino. Correlación con el genotipo del virus papiloma humano

Juan Carlos Roa S¹, Ricardo Martínez S¹, Sonia Montenegro², Iván Roa E^{1,4}, Italo Capurro V³, Gilda Ibacache S¹, Angélica Melo A¹.

Microsatellite instability and human papilloma virus genotypes in preneoplastic and neoplastic uterine cervix lesions

Background: The association between some specific human papilloma virus (HPV) types and cervix cancer is well known. However, the genetic conditions that favor the development of cervical cancer are less well known. **Aim:** To determine the presence of satellite instability (MSI) in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix and correlate these findings with HPV genotypes. **Material and methods:** Biopsy samples of cervical lesions were studied. Sixteen had low grade lesions, 22 had high grade lesions and 28 had an epidermoid cancer. Viral types were identified with polymerase chain reaction, dot-blot hybridization and restriction fragment length polymorphism. MSI was determined using a panel of eight highly informative microsatellites. **Results:** Microsatellite instability in at least one locus was observed in 91, 56 and 69% of low grade lesions, high grade lesions and epidermoid carcinomas, respectively. MSI-High grade, MSI-Low grade instability and microsatellite stability were observed in 5, 60 and 46% of samples, respectively. Two of three samples with high grade instability had HPV 52 genotype. Other viral subtypes had frequencies that ranged from 78% to 100%, with the exception of HPV16 that was present in only 53% of samples with low grade instability. **Conclusions:** Two thirds of biopsy samples from cervical lesions had MSI, mechanism that can be involved in the first stages of cervical carcinogenesis. The low frequency of high grade instability, its association with HPV52 and the low frequency of HPV16 in samples with low grade instability, suggest different coadjutant mechanisms in cervical carcinogenesis (Rev Méd Chile 2007; 135: 37-44). **(Key words:** Microsatellite repeats; Papillomavirus, human; Uterine cervical neoplasms)

Recibido el 7 de marzo, 2006. Aceptado el 19 de julio, 2006.

Financiado por la Universidad de La Frontera a través del Proyecto DIUFRO N° 120627.

¹Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ²Molecular Immunogenetics Laboratory, Ochsner Clinic Foundation, New Orleans, LA U.S.A. ³Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. ⁴Departamento de Patología, Clínica Alemana Santiago, Chile.

Abreviaciones

MSI-H: Inestabilidad microsatelital de alto grado.
MSI-L: Inestabilidad microsatelital de bajo grado.
MSS: Estabilidad microsatelital.
LBG: Lesión de bajo grado.
LAG: Lesión de alto grado.

Correspondencia a: Dr. Juan Carlos Roa. Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. Manuel Montt 112. Código Postal 478-1176. Temuco, Chile. E mail: jcroa@ufro.cl

El rol oncogénico del virus papiloma humano (HVP) ha sido claramente establecido en la carcinogénesis del cáncer cervical uterino (CaCu)^{1,2}. Sin embargo, la infección por sí misma, es insuficiente para la transformación del epitelio cervical, sugiriendo que otros factores como, la pérdida de la heterocigosidad (LOH) o la inestabilidad de microsátélites (MSI), podrían estar involucrados en la tumorigénesis cervical³⁻⁵.

La MSI es un evento que ocurre en pequeños segmentos repetitivos de ADN, denominados microsátélites, y la variación de estas regiones microsátélites es generada por errores durante la replicación del ADN. De esta manera, la MSI es un indicador de la incidencia elevada de mutaciones en el genoma de células neoplásicas, producto de la reparación defectuosa del ADN⁶. En el tejido normal, la presencia de MSI es infrecuente, debido a que cualquier desperfecto en la alineación de una hebra de ADN es corregido por el sistema reparador de ADN (*Mismatch Repair System*) (MMR)⁷.

La MSI ha sido observada en una variedad de tumores como: colon⁸, endometrio⁹, estómago^{10,11}, páncreas^{12,13} y pulmón^{14,15}. En tumores ginecológicos, la frecuencia de MSI ha sido reportada entre 17% y 30% para carcinoma endometrial¹⁶⁻¹⁸ y entre 10% y 30% en carcinomas de ovario¹⁹⁻²¹. En CaCu, la MSI ha sido observada entre 5% y 15%^{3,9,22} y alrededor de 15% en las neoplasias cervicales intraepiteliales²³.

En relación a MSI y genotipos de HPV, tanto en LBG, LAG y carcinomas invasores, existe poca información. Por otro lado, la presencia de MSI en lesiones preneoplásicas o cánceres y su relación con el pronóstico de la patología queda aún por clarificarse.

Considerando lo anteriormente expuesto, nuestro objetivo general fue establecer una asociación entre subtipos específicos de HPV y la presencia de MSI en lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. Seleccionamos 66 muestras de archivo de cuello uterino (biopsias colposcópicas, LEEP y conizaciones) desde el archivo del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de La

Frontera, obtenidas entre 1996 y 2001, las muestras provenían del Policlínico de Patología Cervical del Hospital Hernán Henríquez Aravena de Temuco, correspondientes a 16 lesiones de bajo grado (LBG), 22 lesiones de alto grado (LAG) y 28 carcinomas epidermoides.

Extracción del ADN. A 5 cortes de 10 micrones, se le microdisecó manualmente una zona con lesión y un área sin lesión, de acuerdo a lo indicado en un corte final teñido con hematoxilina-eosina. El ADN fue extraído con el *Kit Puregene™ DNA Isolation System* (Gentra Systems USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Para conocer la integridad del ADN y excluir muestras con ADN no amplificable, se utilizó una PCR con iniciadores para el gen β -globina, que amplifican un fragmento de 268 pares de bases (pb)²⁴.

Tipificación viral. Para la detección del ADN viral se utilizaron dos sistemas de PCR de consenso dirigidos a los genes L1 y E6/E7. La tipificación se realizó por hibridación *dot blot* (Figura 1A) y RFLP (polimorfismo de fragmentos de restricción) (Figura 1B), según métodos publicados previamente²⁵⁻²⁸. Se consideró subtipos indeterminados a aquellos casos donde no se realizó RFLP y sólo fueron genotipificados mediante hibridación *dot blot* en tipos de AR o BR, pero no fue posible identificar el genotipo específico.

Marcadores microsátélites. Se utilizaron 8 marcadores dentro de los cromosomas 2, 3, 5, 12, 16 y 17. Un panel de 5 marcadores mononucleótidos y dinucleótidos (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 y D17S250) recomendados por el *National Cancer Institute* (NCI)²⁹ y 3 marcadores adicionales: D3S1067, D12S1638 y D16S265, elegidos por ser altamente polimórficos y por su alto rendimiento en material fijado en formalina e incluido en parafina.

Amplificación de microsátélites mediante PCR (PCR-MSI). La reacción de polimerasa en cadena (PCR) fue realizada con 5 μ l de ADN (5-10 ng) y volumen final de 15 μ l. La mezcla de reacción fue: 0,2 uM de partidores, 1,5 mM de MgCl₂ y 0,04 U/ μ l de Taq polimerasa. Uno de los partidores fue marcado en su extremo terminal con deoxiadeno-

sina trifosfato unido a fósforo gamma³² (γP^{32}) mediante polinucleótido quinasa T4. Las temperaturas de hibridación fueron optimizadas para cada marcador. Los productos PCR, tanto del área con lesión como del área sin lesión del mismo paciente, fueron corridos en paralelo sobre un gel denaturante (formamida-urea) al 12%. Los geles fueron fijados en metanol al 10% y ácido acético al 5% y lavados con agua desionizada. Posteriormente, se secaron al vacío a 80°C y expuestos a una placa autorradiográfica por 16 a 24 h a temperatura ambiente.

Detección de MSI. Cualquier cambio en la longitud de un microsatélite producido por inserción o deleción de un segmento de ADN repetitivo, mono o dinucleótido, en el tejido con lesión comparado con el tejido morfológicamente normal; observado como movilidad electroforética de las bandas en geles denaturantes al 12% (Figura 1).

Según la frecuencia de MSI en los marcadores usados, se han definido 3 categorías de tumores: los de MSI de alta frecuencia (MSI-H), cuando más de 30% de los marcadores muestran MSI, los de baja frecuencia (MSI-L) cuando 30% o menos de los marcadores están alterados y los tumores que no son afectados, llamados microsatélites estables (MSS)²⁹.

RESULTADOS

La edad del grupo estudiado fluctuó entre 24 y 79 años, con una media de 39 años. Se recolectaron 16 LBG, 22 LAG y 28 casos de carcinoma epidermoide (Figura 2). Los subtipos de HPV 33, 16 y 31 fueron los más frecuentes, observándose casi exclusivamente en carcinomas y lesiones alto grado. Se observó un pequeño grupo de casos con infección mixta, la mayor parte de ellos correspondió a lesiones de alto grado con coinfección

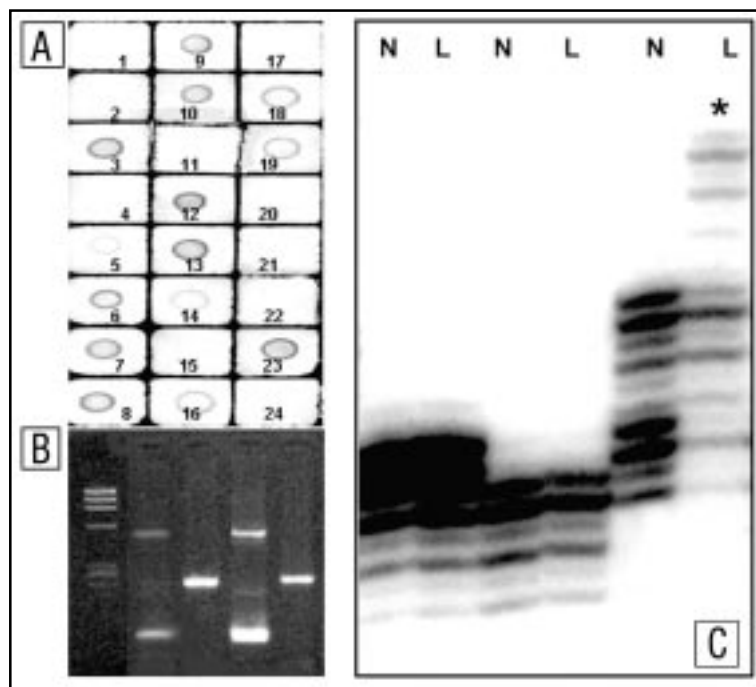
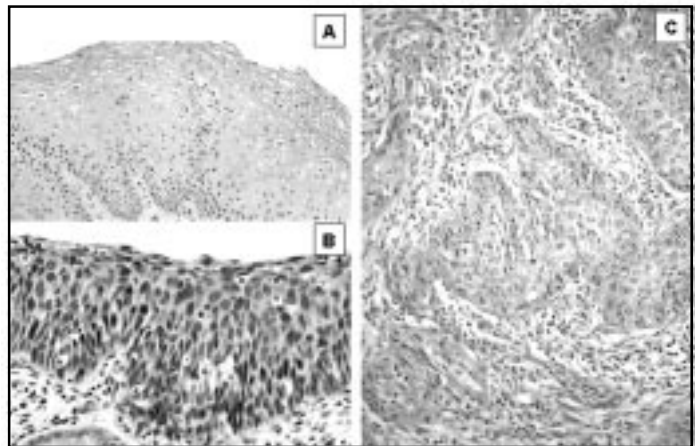


Figura 1. Tipificación de HPV mediante técnica combinada de PCR dot blot (A), RFLP (B) la determinación de inestabilidad microsatelital se realizó con PCR radioactivo y revelado mediante por autoradiografía. En la fotografía (C) se observa controles internos (N) y casos (T) observando el la zona del asterisco (*) la presencia de bandas extras en el alelo superior del microsatélite estudiado, evidenciado inserciones que hacen que el producto de PCR migre menos en el gel debido al mayor peso molecular.

Figura 2. Lesiones histológicas en cuello uterino. En la microfotografía compuesta se observa una lesión de bajo grado correspondiente a signos morfológicos de infección por HPV (A) una lesión de alto grado representada por un carcinoma *in situ* (B) y la imagen de un carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado infiltrante (C).



ción de genotipos virales 16/52 y 45/52 (Tabla 1).

De los marcadores de microsatélites estudiados, los localizados en los cromosomas 2, 12 y 16 fueron los más frecuentes (D2S123, D12S1638 y D16S265) alrededor de 20% cada uno. Para el resto de los marcadores la frecuencia, fluctuó

entre 4,5% y 15% y sólo el marcador D5S346 asociado al gen APC no mostró inestabilidad en ninguno de los casos examinados (Tabla 2).

Al analizar la frecuencia de inestabilidad microsatelital en al menos uno de los marcadores usados, se obtuvo 55,6%, 90,9% y 68,75% en los

Tabla 1 Genotipos de HPV según diagnóstico histológico

Diagnóstico	n	Genotipos Virales								
		16	18	31	33	35	45	52	IM*	AR ^o
Carcinoma	28	9	1	0	4	0	2	1	0	11
LAG	22	2	0	2	10	1	2	1	4	0
LBG	16	3	0	4	4	2	0	0	1	0
Total (%)	66	14 (21,2)	1 (1,5)	6 (9,1)	18 (27,2)	3 (4,5)	4 (6,1)	4 (6,1)	5 (7,6)	11 (16,7)

HPV= Virus papiloma humano. Ca= Carcinoma invasor. LAG= Lesión de alto grado. LBG= Lesión de bajo grado. IM*= Infección mixta (4 casos HPV16/52 y un caso HPV 45/52). AR^o= Alto riesgo (HPV 16, 18, 45 y 52), genotipificado por hibridación *dot blot*.

Tabla 2. MSI según microsatélite y diagnóstico histológico

	n	Inestabilidad microsatelital							
		BAT25	BAT26	D2S123	D5S346	D17S250	D3S1067	D12S1638	D16S265
Carcinoma	28	3	2	3	0	2	1	5	4
LAG	22	1	5	5	0	4	2	6	8
LBG	16	2	2	6	0	3	0	3	4
Total (%)	66	8/66 (12,1)	9/66 (13,6)	13/66 (19,7)	0	9/66 (13,6)	3/66 (4,5)	14/66 (21,2)	16/66 (25,8)

casos de carcinomas invasor, LAG y LBG, respectivamente. Sin embargo, cuando utilizamos la clasificación propuesta por el NCI, sólo encontramos un pequeño porcentaje de los casos con inestabilidad microsatelital de alto grado (MSI-H) (4,5%). El porcentaje de inestabilidad microsatelital de bajo grado (MSI-L) alcanzó 60% y no se observó inestabilidad microsatelital en 36,5% de los casos. Ninguno de los casos con carcinoma invasor presentó MSI-H, los restantes casos se distribuyeron en forma similar. El alto porcentaje de casos de MSI-L observado no mostró diferencias significativas en los diferentes grupos de lesiones estudiados (Tabla 3).

Al tabular los diferentes subtipos de HPV según el grado de inestabilidad microsatelital, observamos que los subtipos virales 16, 31 y 33 resultaron estar más frecuentemente asociados con MSI-L. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 4). Dos tercios de los pacientes en los cuales no fue posible tipificar el genotipo viral (es decir, probablemente un genotipo viral poco frecuente), no presentaron MSI.

DISCUSIÓN

En la actualidad, los estudios sobre CaCu y HPV están focalizados sobre las alteraciones genéticas que generan una mayor susceptibilidad para que la célula hospedera sufra transformación maligna^{4,5,30}. Entre ellas, se encuentran la deleción alélica (LOH) relacionada con inactivación de genes supresores de tumores y que ha sido descrita en la progresión de lesiones preneoplásicas. La deleción alélica más frecuente se ha observado en el brazo corto del cromosoma 3, como un evento precoz en la tumorigénesis cervical uterina^{22,31,32}. También ha sido reportada MSI, en CaCu y lesiones preneoplásicas^{23,33}, concordando con nuestros resultados, sin embargo, otros autores, como Nishimura M et al (2000), concluyeron, a partir de sus resultados, que la inestabilidad genómica es un evento tardío durante la carcinogénesis del CaCu y se asocia con la progresión de una neoplasia cervical intraepitelial a un carcinoma invasor. En nuestro trabajo no analizamos la presencia de LOH debido a que, a diferencia de la subtipificación HPV y determina-

Tabla 3. Grado MSI según diagnóstico histológico

	Grados de MSI (%)		
	MSI-H	MSI-L	MSS
Carcinoma	0	13 (46)	15 (54)
LAG	2 (9,1)	17 (77,2)	3 (13,7)
LBG	1 (6,3)	9 (56,2)	6 (37,5)
Total (%)	3 (4,5)	39 (59)	24 (36,5)

Tabla 4. Grado de MSI según genotipo de HPV

	n	Tipos de HPV							AR°
		16	18	31	33	35	45	52	
MSI-H	3	0	0	0	0	0	0	2	1
MSI-L	39	9	1	5	14	3	4	0	4
MSS	24	8	0	1	4	0	0	0	10
MSI/ total		9/17 (53%)	1/1	5/6 (83)	14/18 (78)	3/3	4/4	2/2	5/15 (34)

MSI-H= MSI alta frecuencia. MSI-L= MSI baja frecuencia. AR°= Alto riesgo (HPV 16, 18, 45 y 52), genotipificado por hibridación *dot blot*.

ción de MSI, ésta requiere pureza celular que sólo se obtiene mediante microdissección neumática o láser.

En relación a MSI y genotipos de HPV en LBG, LAG y carcinomas invasores de cuello uterino, existe escasa información publicada y no existe nomenclatura uniforme para la determinación y clasificación de MSI en los reportes publicados sobre genotipos específicos de HPV. Este hecho es particularmente desorientador, porque impide hacer las comparaciones necesarias que permitan extrapolar conclusiones. En nuestro estudio utilizamos la nomenclatura y clasificaciones actualmente aceptadas para otros órganos, como cáncer de colon, estómago y endometrio, encontrando una baja frecuencia de MSI-H en los casos analizados (4,5%) y considerablemente alta de MSI-L y MSS (60% y 35,5%, respectivamente). Los marcadores propuestos por el NCI junto a otro panel de marcadores (BAT40, D3S1263, D4S402, D5S406 y D11S912), fueron empleados por Wong et al³⁴ para el análisis de MSI en neoplasia cervical. Combinando ambos paneles, estos autores reportaron 29% de MSI en los casos de CaCu analizados, siendo la frecuencia de MSI en los carcinomas significativamente más alta que en LAG y LBG.

Otros estudios han encontrado MSI-H en carcinomas con frecuencias entre 14% y 18,8%^{3,31,35}. Chung et al³ encontraron MSI-H en 14% de los casos de carcinoma y concluyeron que la inestabilidad microsatelital era un evento raro en la carcinogénesis cervical y que es independiente de la presencia de HPV. Wong et al³⁴ encontraron MSI-L en menos de 2% de las lesiones de alto grado y un MSI-H en 11,8% de los casos de CaCu, encontrando asociación con peor pronóstico en aquellos pacientes con algún grado de MSI. También ha sido reportado 17,6% de MSI en casos HPV positivos (sólo para los genotipos 16, 18 y 33) y 7,9% en casos HPV negativos³¹. Narayan et al³⁵ encontraron 18,8% de MSI-H en tumores primarios HPV positivos. French et al³³ estudiaron 32 lesiones escamosas del cuello uterino con una metodología y nomenclatura diferentes, considerando 7 microsatélites diferentes a los nuestros, no encontrando MSI-H ni relación con los 4 genoti-

pos virales (6, 11, 16 y 18) que consideraron en su estudio.

Los porcentajes de MSI-L fluctuaron entre 12% y 47% de los casos en otras series^{3,33}. Al combinar los casos de alto y de bajo grado de inestabilidad, no se observó significativas diferencias en el pronóstico y conducta biológica de los tumores, sin embargo, se observó una leve tendencia a menor sobrevida en aquellos pacientes que presentaban inestabilidad de alto grado³. Es particularmente interesante que los virus de alto riesgo oncogénico presenten la mayor frecuencia de MSS y menor de MSI-H, una probable explicación en este punto podría radicar en que las vías utilizadas por los virus oncogénicos no requieren de MSI, la cual si sería más importante para los virus de menor potencial oncogénico.

Por otro lado, la presencia de MSI en lesiones preneoplásicas o cánceres y su relación con el pronóstico de la patología quedan aún por establecerse.

Es conocido que la inflamación crónica tiene un impacto en la capacidad reparadora del ADN desalineado, cuya alteración se relaciona directamente con la aparición de inestabilidad microsatelital debido a inactivación parcial total del sistema reparador de ADN desalineado, principalmente por mecanismos de metilación³⁶. Esto plantea la necesidad de definir la importancia de la cervicitis crónica inespecífica prolongada y fenómenos epigenéticos en la génesis del cáncer de cuello uterino mediada por inestabilidad genética localizada.

Cuando analizamos la frecuencia de subtipos virales con la presencia de MSI de bajo grado observamos tendencia a mayor acumulación con los subtipos 16, 31, 33, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En resumen, podemos decir que en casi dos tercios de los casos presentaron MSI-L, lo que demuestra la participación de inestabilidad genética desde las primeras etapas de la tumorogénesis cervical uterina. La baja frecuencia MSI-H y su agregación específica con el HPV52 y la menor frecuencia de MSI-L en casos HPV16, sugieren mecanismos coadyuvantes diferentes en la carcinogénesis cervical uterina mediada por virus de alto riesgo oncogénico.

REFERENCIAS

1. BOSCH FX, MANOS MM, MUNOZ N, SHERMAN M, JANSEN AM, PETO J ET AL. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a perspective. International biological study on cervical cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
2. VILLA LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 321-41.
3. CHUNG TK, CHEUNG TH, WANG VW, YU MY, WONG YF. Microsatellite instability, expression of hMSH2 and hMLH1 and infection in cervical cancer and their clinico-pathological. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 52: 98-103.
4. CLARKE B, GORDON M, MOODLEY M, NAIDOO R, CHETTY R. Microsatellite analysis of early stage (Ia-IIb) uterine cervical carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2003; 11: 253-60.
5. WANI K, NAIR CK. Genetic alterations in cervical cancer. *Indian J Exp Biol* 2003; 41: 789-96.
6. BENNETT P. Demystified... microsatellites. *Mol Pathol* 2000; 53: 177-83.
7. ESHLEMAN JR, LANG EZ, BOWERFIND GK, PARSONS R, VOGELSTEIN B, WILLSON JK ET AL. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies instability in colon cancer. *Oncogene* 1995; 10: 33-7.
8. THIBODEAU SN, BREN G, SCHAID D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
9. HELLAND A, BORRESEN-DALE AL, PELTOMAKI P, HEKTOEN M, KRISTENSEN GB, NESLAND JM ET AL. Microsatellite instability in cervical and endometrial. *Int J Cancer* 1997; 70: 499-501.
10. RHYU MG, PARK WS, MELTZER SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric. *Oncogene* 1994; 9: 29-32.
11. ROA JC, ARAYA JC, VILLASECA MA, ROA I, CORREA P. [Microsatellite instability and loss of heterozygosity in preneoplastic gastric lesions]. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1227-36.
12. NAKATA B, WANG YQ, YASHIRO M, NISHIOKA N, TANAKA H, OHIRA M ET AL. Prognostic value of microsatellite instability in resectable cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2536-40.
13. ABRAHAM SC, WU TT, HRUBAN RH, LEE JH, YEO CJ, CONLON K ET AL. Genetic and immunohistochemical analysis of pancreatic acinar carcinoma: frequent allelic loss on chromosome 11p and APC/beta-catenin pathway. *Am J Pathol* 2002; 160: 953-62.
14. MERLO A, MABRY M, GABRIELSON E, VOLLMER R, BAYLIN SB, SIDRANSKY D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung. *Cancer Res* 1994; 54: 2098-101.
15. TAKAHASHI Y, KONDO K, HIROSE T, NAKAGAWA H, TSUYUGUCHI M, HASHIMOTO M ET AL. Microsatellite instability and protein expression of the DNA repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Mol Carcinog* 2005; 42: 150-8.
16. RISINGER JJ, BERCHUCK A, KOHLER MF, WATSON P, LYNCH HT, BOYD J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 5100-3.
17. KANEKI E, ODA Y, OHISHI Y, TAMIYA S, ODA S, HIRAKAWA T ET AL. Frequent microsatellite instability in synchronous ovarian and adenocarcinoma and its usefulness for differential diagnosis. *Hum Pathol* 2004; 35: 1484-93.
18. HIRASAWA A, AOKI D, INOUE J, IMOTO I, SUSUMU N, SUGANO K ET AL. Unfavorable prognostic factors associated with high frequency of microsatellite instability and comparative genomic hybridization in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5675-82.
19. KING BL, CARCANGIU ML, CARTER D, KIECHLE M, PFISTERER J, PFLEIDERER A ET AL. Microsatellite instability in ovarian neoplasms. *Br J Cancer* 1995; 72: 376-82.
20. SINGER G, KALLINOWSKI T, HARTMANN A, DIETMAIER W, WILD PJ, SCHRAML P ET AL. Different types of microsatellite instability in ovarian. *Int J Cancer* 2004; 112: 643-6.
21. DELLAS A, PUHL A, SCHRAML P, THOMKE SE, RUSCHOFF J, MIHATSCH MJ ET AL. Molecular and clinicopathological analysis of ovarian carcinomas without microsatellite instability. *Anticancer Res* 2004; 24: 361-9.
22. KERSEMAEKERS AM, KENTER GG, HERMANS J, FLEUREN GJ, VAN DE VIJVER MJ. Allelic loss and prognosis in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Cancer* 1998; 79: 411-7.
23. JIMÉNEZ P, CANTON J, CONCHA A, TORRES LM, ABRIL E, REAL LM ET AL. Microsatellite instability in cervical intraepithelial. *J Exp Clin Cancer Res* 1998; 17: 361-6.
24. SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA ET AL. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.

25. MANOS MM TY, WRIGHT DK ET AL. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.
26. JACOBS MV, SNIJDERS PJ, VAN DEN BRULE AJ, HELMERHORST TJ, MEIJER CJ, WALBOOMERS JM. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 791-5.
27. SNIJDERS PJ, VAN DEN BRULE AJ, SCHRIJNEMAKERS HF, SNOW G, MEIJER CJ, WALBOOMERS JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990; 71: 173-81.
28. MELO A, MONTENEGRO S, HOOPER T, CAPURRO I, ROA J, ROA I. Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX región-Chile. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1382-90.
29. BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR, SIDRANSKY D, ESHLEMAN JR, BURT RW ET AL. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite cancer detection and familial predisposition: development of criteria for the determination of microsatellite instability in cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.
30. WONG YF, SELVANAYAGAM ZE, WEI N, PORTER J, VITTAL R, HU R ET AL. Expression genomics of cervical cancer: molecular classification prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5486-92.
31. KOHNO T, TAKAYAMA H, HAMAGUCHI M, TAKANO H, YAMAGUCHI N, TSUDA H ET AL. Deletion mapping of chromosome 3p in human uterine cervical cancer. *Oncogene* 1993; 8: 1825-32.
32. CHEUNG TH, LO KW, YIM SF, POON CS, CHEUNG AY, CHUNG TK ET AL. Clinicopathologic significance of loss of heterozygosity on in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 510-5.
33. FRENCH D, CERMELE C, VECCHIONE A, CENCI M. HPV infection and microsatellite instability in squamous lesions uterine cervix. *Anticancer Res* 2000; 20: 3417-21.
34. WONG YF, CHEUNG TH, POON KY, WANG VW, LI JC, LO KW ET AL. The role of microsatellite instability in cervical neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 434-9.
35. NARAYAN G, ARIAS-PULIDO H, KOUL S, VARGAS H, ZHANG FF, VILLELLA J ET AL. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer* 2003; 2: 24.
36. RASHID A, UEKI T, GAO YT, HOULIHAN PS, WALLACE C, WANG BS ET AL. K-ras mutation, p53 overexpression, and microsatellite instability in biliary tract cancers: a population-based study in China. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3156-63.