

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

“ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DEL SISTEMA PRINCIPAL DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL DESARROLLO DE LESIONES PRECURSORAS  
DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

**P R E S E N T A**

BIOL. MIRIAM ENRIQUETA NIEVES RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS : DRA. en C. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

MÉXICO, D. F.

ENERO 2005



COORDINACIÓN

m. 352191



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miriam Enriquez Nieves Ramírez

FECHA: 13/ Diciembre / 2005

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de agosto del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) NIEVES RAMÍREZ MIRIAM ENRIQUETA, con número de cuenta 93167288 con la tesis titulada: "Análisis del polimorfismo de los genes del sistema principal de histocompatibilidad en el desarrollo de lesiones precursoras del cáncer cérvico uterino)", bajo la dirección del(a) Dra. Martha E. Pérez Rodríguez.

Presidente:	Dr. Mauricio Salcedo Vargas
Vocal:	Dra. Gloria B. Vega Robledo
Secretario:	Dra. Martha E. Pérez Rodríguez
Suplente:	Dr. Jaime Berumen Campos
Suplente:	Dr. Armando Isibasi Araujo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria D.F., a 29 de noviembre del 2005

Dr. Juan Muñoz Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTARON CON LOS SIGUIENTES APOYOS ECONÓMICOS:

BECA DE MAESTRÍA DEL CONACYT EN EL PERIODO DE FEBRERO 2003 A JUNIO 2004 CON NÚMERO DE REGISTRO 176744

BECA DE LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD DEL IMSS EN EL PERIODO DE FEBRERO 2003 A FEBRERO 2005 CON MATRÍCULA DE BECARIO 99091244

#### MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

Dr. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

Dra. GLORIA BERTHA VEGA ROBLEDO

*Para ti Mamá...*

*... que siempre has estado conmigo y me has enseñado algo muy importante "dar sin recibir nada a cambio cuando se quiere de verdad", y tú lo has hecho siempre conmigo.*

## AGRADECIMIENTOS

- ♣ A mi familia (Abuelita Chuy, Tía Lily, Tía Sonric's, Tía Lucas, Tía Dulce, Tío Uli y Tío Poncho, Iris, Bere, Betza, Dulce, Karla, Ponchín, Lucerito, Ana, Jimena, Paco, Iván, Sebas, Prisma, Maximiliano, Mauricio e Ivana) que han sido un ejemplo de integración, apoyo incondicional, comprensión total y guía para afrontar la vida.
- ♣ A ti Oswaldo Partida Rodríguez, por ser la persona que más amo en esta vida y que me brindas tu amistad, confianza, comprensión, cariño y ánimo siempre que lo necesito.
- ♣ A la Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez, por darme la oportunidad de continuar con mis estudios y enseñarme que con mucha tenacidad se llegan a lograr las metas que uno se propone.
- ♣ Al Dr. Roberto Kretschmer Schmid, de quien me quedará el recuerdo de una persona maravillosa y la enseñanza de seguir hacia delante y buscar siempre nuevas oportunidades.
- ♣ A los miembros de mi comité tutorial y mis sinodales, Dra. Gloria Bertha Vega Robledo, Dr. Armando Isibasi Araujo, Dr. Mauricio Salcedo Vargas y Dr. Jaime Berumen Campos, por compartir su amplia experiencia con cada uno de sus comentarios y propuestas para concluir esta etapa de mis estudios.
- ♣ Al Dr. Pedro Eduardo Alegre Crespo y la Dra. María del Carmen Tapia Lugo, de quienes aprendí en todo momento con las experiencias de la consulta médica cotidiana. Son para mí un ejemplo de compañerismo pero sobre todo de personas con mucha calidad humana.
- ♣ A la Dra. Iris Isabel Trejo Villa, a la srita. Rosario Araceli Ambrosio Montes y la enfermera Mónica Pérez Pérez, por brindarme toda la ayuda que necesite para concluir este trabajo. Quiero darles las gracias por recibirme siempre con una sonrisa y por ser en todo momento entusiastas con el proyecto.
- ♣ A la Dra. Norma Salgado y la Quim. Rosario (Chayito), del Laboratorio de Biología Molecular, del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de PEMEX por compartir sus conocimientos y ayudarme en una parte fundamental del trabajo. Quiero agradecerles y expresarles que son un ejemplo a seguir.
- ♣ A todos mis amigos y compañeros (Ericucho, Lili, Laurín, Lucas, Jaime, Alejandro, Rigo, Ara, Julio, Oscar, Estrellita y Ale) por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas.
- ♣ A todos los miembros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología: Dr. Blanco, Vicky, Lupita, Yadira, Luisito, Karina, Dr. Alvaro, Mony, Lety, Leo, Memo, J Gabriel, Emiliano, Rafa, Cris, Dra. Lupita, Esther, Raúl, Sarita, Dr. Tofito, Paty, Bere y Rica, por tener siempre la mejor disposición de ayudar y hacer ameno el tiempo de trabajo en el laboratorio.
- ♣ A la UNAM y al IMSS, por abrirme sus puertas y permitirme así seguir superándome. Siempre estaré muy orgullosa de ser parte de una de las casas de estudios más prestigiosas del mundo y también por la fortuna de realizar mi trabajo de laboratorio en instalaciones de la Institución de Salud más importante de la República Mexicana.

**Gracias a todos y cada uno de ustedes**

## INDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer cérvico uterino (CaCu)	1
1.1.1 Epidemiología	3
1.1.2 Factores de riesgo	3
1.1.2.1 Virus del papiloma humano (VPH)	4
1.1.3 HLA y CaCu	5
1.2 Genes MIC	8
1.2.1 Los microsatélites de MICA y su asociación con enfermedades	12
1.3 Genes del Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	13
1.3.1 TNF y su asociación con enfermedades	17
2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3.0 OBJETIVOS	21
3.1 General	21
3.2 Particulares	21
4.0 HIPÓTESIS	22
5.0 MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Muestras de controles	23
5.2 Muestras de pacientes	23
5.3 Extracción de DNA de muestras de linfocitos de sangre periférica (LSP)	24
5.4 Extracción de DNA de células cervicales	24
5.5 Tipificación de VPH	24
5.6 Tipificación de los microsatélites de MICA	26

5.6.1 RSCA ( <i>Reference Strand mediated Conformation Analysis</i> )	26
5.6.2 Preparación de referencias (FLRs)	28
5.6.3 Hibridación	29
5.6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida	29
5.6.5 Análisis de los resultados en el gel de poliacrilamida	29
5.7 Amplificación de la posición -308 de la región promotora de TNF $\alpha$	29
5.7.1 Tipificación de la posición -308 de TNF $\alpha$ mediante RFLP ( <i>Restiction Fragment Length Polymorphism</i> )	30
5.8 Análisis estadístico	30
6.0 RESULTADOS	32
6.1 Evaluación de los factores de riesgo en el desarrollo del CaCu	32
6.2 Tipificación de VPH	32
6.3 Selección de FLRs para tipificar los microsatélites de MICA mediante RSCA	35
6.4 Selección de controles internos de DNA ( <i>ladders</i> ) para tipificar los microsatélites de MICA mediante RSCA	36
6.5 Movilidad de los microsatélites A4 y A9	36
6.6 Frecuencias de microsatélites	37
6.7 Frecuencias de genotipos de los microsatélites	38
6.8 Frecuencias de microsatélites y tipos de VPH	39
6.9 Frecuencias de genotipos de los microsatélites y tipos de VPH	41
6.10 Tipificación del SNP-308 de la región promotora de TNF $\alpha$ por RFLP	43
6.11 Identificación de los genotipos de la posición SNP-308 de TNF $\alpha$ del grupo control y pacientes	44
7.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
8.0 CONCLUSIONES	51
9.0 BIBLIOGRAFÍA	52

## ABREVIATURAS

<b>Bx</b>	Biopsia cervical
<b>CaCu</b>	Cáncer cérvico uterino
<b>CFTR</b>	Gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis cística ( <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, ATP-binding cassette, sub-family C, member 7</i> )
<b>CMVH</b>	Citomegalovirus humano
<b>Cy5</b>	Carbocianina 5 (fluorocromo)
<b>FLR</b>	Referencia marcada con fluorescencia ( <i>Fluorescence Labelled Reference</i> )
<b>(GCT = A)</b>	Triplete de nucleótidos codificadores del aminoácido Alanina
<b>HHV</b>	Herpes virus humano (HHV, <i>Human Herpes virus</i> )
<b>H-W</b>	Prueba estadística de equilibrio Hardy-Weinberg
<b>LEC</b>	Legrado endocervical
<b>LIEAG</b>	Lesiones Intraepiteliales Escamosas de alto grado
<b>LIEBG</b>	Lesiones Intraepiteliales Escamosas de bajo grado
<b>LSP</b>	Linfocitos de Sangre Periférica
<b>MHC</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad
<b>MICA</b>	Gen A relacionado con la cadena del MHC clase I ( <i>major histocompatibility complex class I chain-related genes</i> )
<b>NIC</b>	Neoplasia Intraepitelial Cervical (Lesión precursora del CaCu)

<b>PaP</b>	Prueba citológica de Papanicolaou
<b>p</b>	Nivel de significancia estadístico
<b>pc</b>	Corrección de Bonferoni (número de especificidades estudiadas)
<b>RFLP</b>	Polimorfismo por fragmentos de restricción ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>RSCA</b>	Análisis conformacional usando una cadena sencilla de DNA como referencia ( <i>Reference Strand mediated Conformation Analysis</i> )
<b>R.M.</b>	Razón de momios
<b>SNP-308</b>	Polimorfismo de un sólo nucleótido ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ) en la posición -308 de la región promotora de TNF $\alpha$
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alpha ( <i>Tumour Factor Necrosis alpha</i> )
<b>T1 (G)</b>	Polimorfismo de la región -308 de TNF $\alpha$ con el alelo G
<b>T2 (A)</b>	Polimorfismo de la región -308 de TNF $\alpha$ con el alelo A
<b>T1T1 (G/G)</b>	Genotipo de la posición -308 de TNF $\alpha$
<b>T1T2 (G/A)</b>	Genotipo de la posición -308 de TNF $\alpha$
<b>T2T2 (A/A)</b>	Genotipo de la posición -308 de TNF $\alpha$
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano ( <i>HPV, Human Papillomavirus</i> )
<b>VPH +</b>	Grupo de pacientes positivas a infección por VPH con la prueba de PCR
<b>VPH -</b>	Grupo de pacientes negativas a infección por VPH con la prueba de PCR

## RESUMEN

En México, diario se registran 60 nuevos casos de cáncer cérvico uterino (CaCu). El CaCu, está asociado principalmente con la infección por virus del papiloma humano (VPH) así como a otros factores que se encuentran también implicados en el desarrollo de este cáncer. Los genes TNF $\alpha$  y MICA están involucrados en la respuesta inmunológica innata del hospedero y presentan asociación con diferentes tipos de cánceres epiteliales. Este trabajo determinó la asociación del polimorfismo de la región microsatélital de MICA codificada por el exón 5 y la sustitución simple de un sólo nucleótido (SNP) en la posición -308 de la región promotora de TNF $\alpha$  en mujeres mestizas mexicanas con infecciones por VPH y lesiones neoplásicas precursoras al CaCu. Se analizó el polimorfismo de MICA, mediante análisis conformacional de DNA (RSCA), en tanto TNF $\alpha$  -308 se estudió con RFLP. El trabajo estuvo conformado por 99 mujeres controles (negativas al Papanicolaou) y 138 pacientes (positivas a VPH) organizadas por clasificación Bethesda (102-LIBG y 36-LIAG). El análisis estadístico fué evaluado con las pruebas Hardy-Weinberg (H-W),  $X^2$ , Fisher y Haldane, y el valor de p fue corregido por el número de especificidades estudiadas ( $pc < 0.05$ ). Los microsatélites A5 y A9 fueron los más frecuentes en la población. El microsatélite A6 confirió protección en pacientes con LIAG (R.M. = 0.25, 0.08-0.71  $pc < 0.05$ ). Se encontraron 10 tipos de VPH y los más frecuentes fueron 16 (59.18%) y 58 (12.9%). Al realizar el análisis de Hardy-Weinberg, se encontró que las lesiones de bajo grado y la infección por VPH-16 influyen en la segregación de los microsatélites de MICA ( $p < 0.05$ ). En cuanto al SNP-308 de TNF $\alpha$ , se estudiaron 50 muestras del grupo control y 50 muestras del grupo de pacientes (25-LIEBG y 25-LIEAG). El polimorfismo T1 (G) fué el más frecuente tanto en el grupo control como en pacientes (88.0%). Se observó que los polimorfismos de la región -308 de TNF $\alpha$ , se encontraban en equilibrio H-W.

## ABSTRACT

In Mexico, 60 new cases of cervical cancer are registered every day. Cervical cancer is associated mainly with the human Papillomavirus (HPV) infection, but there are other factors implicated in the development of this cancer. TNF $\alpha$  and MICA genes are involved in the innate immune response and have been associated with different types of epithelial cancers. This study determined the polymorphism within the MICA microsatellital region, codified in the exon 5, and the single nucleotide polymorphism (SNP) in the position -308 of the TNF $\alpha$  promoter in Mexican mestizo women with HPV infection and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions. The MICA polymorphism was determined by a DNA conformational technique (RSCA), whereas TNF $\alpha$  was analyzed using RFLP. The sampling was constituted of 99 healthy women (negative to Papanicolaou) and 138 patients (positive to HPV) organized in agreement with Bethesda classification (102-SIL-LG and 36-SIL-HG). The data was analyzed with Hardy-Weinberg equilibrium (H-W),  $X^2$ , Fisher and Haldane test, then the p value was corrected multiplying by the number of specificities studied ( $p < 0.05$ ). The A5 and A9 microsatellites were the most frequent in the population. A6 microsatellite conferred protection in patients with SIL-HG (O.R.= 0.25, 0.08-0.71  $p < 0.05$ ). We found 10 HPV types, among them, the most frequent were 16 (59.18%) and 58 (12.9%). The Hardy-Weinberg analysis determined that SIL-LG and the infection with HPV-16 were associated with the segregation of MICA microsatellites ( $p < 0.05$ ). SNP-308 TNF $\alpha$  was studied in 50 control and 50 patients (25-SIL-LG and 25-SIL-HG). Polymorphism T1 (G) was the most frequent in all groups (88.0%). We observed that the polymorphism -308 TNF $\alpha$  is in H-W equilibrium.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Cáncer cérvico uterino (CaCu)

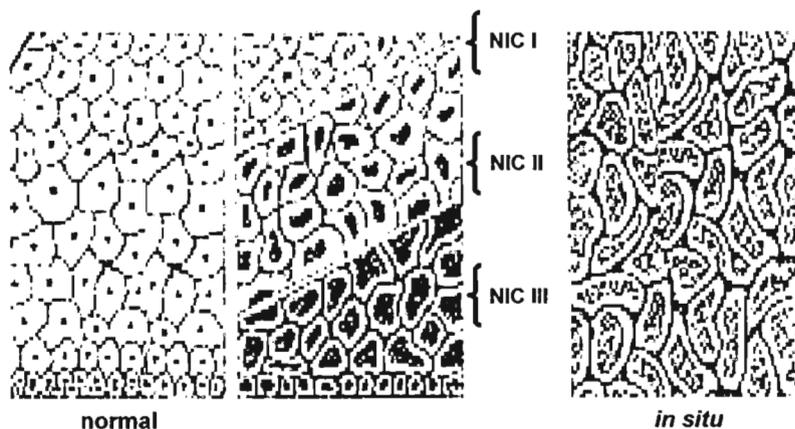
El Cáncer es una enfermedad multifacética que altera el mecanismo de replicación de una célula, invade y coloniza territorios que normalmente están reservados para otras células (Lodish *et al.*, 2002).

El cáncer se ha clasificado en cuatro grupos. El primer grupo son los adenocarcinomas que se desarrollan en las células de tejido glandular, el segundo está formado por los carcinomas que se originan de células epiteliales, los sarcomas (que se generan en tejido conectivo) forman el tercer grupo y por último las leucemias y linfomas que se originan de médula ósea (y/o sangre) y tejido linfoide respectivamente (Cortinas, 1998).

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es una neoplasia que se desarrolla en forma progresiva **Figura 1**. Esta enfermedad va desde la infección por el virus del papiloma humano (VPH), la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grados I-III (el grado I equivale a la displasia leve, el grado II a la displasia moderada y el grado III a la displasia grave) hasta un cáncer *in situ* (Steven, 2000). Una vez establecido el cáncer *in situ*, le toma entre 10 y 20 años para convertirse en un cáncer invasor (Cortinas, 1998).

Debido a las diferentes terminologías que se utilizaban en el diagnóstico del CaCu, se desarrolló el Sistema Bethesda (Berek, 2003) con la finalidad de unificar los criterios histopatológicos y citopatológicos observados en las lesiones preinvasoras del cérvix, así como conocer la participación del VPH en el desarrollo de las lesiones del cáncer *in situ* (Steven, 2000, Berek, 2003) **Tabla 1**.

**Figura.1** Representación esquemática de los cambios morfológicos que ocurren en el cérvix al desarrollarse las lesiones precursoras (NIC) y un cáncer *in situ*.



**Tabla 1.** Sistema Bethesda para el diagnóstico e informe de la citología cérvico-vaginal.

Tipo de citología	Clasificación citológica de la enfermedad	Clasificación NIC	Clasificación de Bethesda
I: Benigna	Benigna	Ninguna	Células atípicas de significado incierto
II: Benigna atípica	Hay células atípicas pero no displásicas. La atipia es debida a la atipia inflamatoria coliocítica (moderada)	Ninguna	No describe de otra manera los cambios celulares inflamatorios, preneoplásicos o neoplásicos ya definidos
III: Sospechosa	Células compatibles con displasia (1) leve (2) moderada	NIC-I, NIC-II	SIL-BG cambios celulares compatibles con VPH
IV: Altamente sospechosa de malignidad	Células anormales compatibles con displasia grave o carcinoma <i>in situ</i>	NIC-III	SIL-AG cambios celulares compatibles con VPH
V: Concluyente de malignidad	Células anormales compatibles con cáncer invasor	Ninguna	Carcinoma de células escamosas

NIC=neoplasia cervical intraepitelial; SIL-BG=lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; SIL-AG=lesión intraepitelial escamosa de alto grado; VPH=virus del papiloma humano. Fuente:MS Piver, RE Hempling, KA Craig. Neoplasms of the cervix. In JFHolland, E.Frei, RC Blasts *et al* (eds), Cancer Medicine (3.ªed), Philadelphia: Lea & Febiger. Pp 1631-1646. Tomado de Lesiones preinvasoras del cérvix, en Oncología Ginecológica. Ed.Marban. Steven, 2000.

### **1.1.1 Epidemiología**

En el mundo se reportan aproximadamente 400,000 casos de CaCu por año (García *et al.*, 2003). La incidencia de mortalidad por CaCu en países desarrollados es de 5 casos por cada 100, 000 mujeres, mientras que en países en desarrollo se registran 40 casos por cada 100, 000 mujeres (Tonon *et al.*, 2004).

La mayoría de los casos ocurren en países en desarrollo (sur de Asia, sur de África y Latinoamérica), que presentan deficientes programas de detección oportuna (Burd, 2003). En México, en un estudio epidemiológico desarrollado entre los años 1980 y 1995, se reportó una incidencia de mortalidad de 62,000 casos (Hernández-Ávila *et al.*, 1998). En la actualidad, las prácticas de abortos ilegales (por abortos autoadministrados y/o por las deficientes condiciones sanitarias) son la primera causa de muerte en la mujer (INEGI, 2004) mientras que el CaCu es la primera causa de muerte por cáncer ya que se reporta que por cada 100 000 mujeres 40.5 presentan este cáncer (Salud Pública de México, 2004), a pesar que desde 1974 se implementó el Programa Nacional de Detección Oportuna de Cáncer (Lazcano-Ponce *et al.*, 1993; Alonso *et al.*, 2000).

### **1.1.2 Factores de riesgo**

Como se mencionó anteriormente, el CaCu es de origen multifactorial. Se ha asociado a infecciones virales, uso del tabaco, multiparidad, inicio temprano de relaciones sexuales, higiene genital deficiente, número elevado de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales así como la carencia de vitamina A, C,  $\beta$ -carotenos y folatos en la dieta cotidiana. También se ha observado que el nivel económico de las mujeres que padecen esta enfermedad es bajo (DeVita *et al.*, 1993; Polendnak, 1993; González *et al.*, 1995).

### 1.1.2.1 Virus del papiloma humano (VPH)

Aproximadamente en el 99% de los casos de CaCu se encuentra el VPH. Los VPH son miembros de la familia *Papillomaviridae* ([http:// pathmicro.med.sc.edu/mhunt/intro-vir.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/intro-vir.htm)). Los VPH son virus de doble cadena de DNA circular y su genoma esta funcionalmente dividido en 3 regiones: La región de control larga, la temprana y la tardía.

La región de control larga constituida de 400 a 1000 pb, contiene secuencias promotoras y potenciadoras (*enhancers*) que regulan la replicación del DNA. La región temprana codifica 6 proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) involucradas en la replicación viral y la oncogénesis, y la región tardía codifica 2 proteínas (L1 y L2) que forman la cápside icosaedra compuesta de 72 capsómeros implicada en la introducción de la célula epitelial a través de su interacción con las moléculas de superficie celular (Davidson *et al.*, 2002; Burd, 2003; Tingxi *et al.*, 2005).

De un total aproximado de 200 tipos de VPH, se han identificado alrededor de 30 tipos que son transmitidos vía sexual y que infectan primordialmente al cérvix, vagina, vulva, pene y ano. Gracias al conocimiento de su función biológica, se han logrado clasificar de acuerdo al riesgo que implican para desarrollar cáncer cervical. Así tenemos que los tipos 16, 18, 31 y 45 son los más frecuentes, encontrándose en alrededor de un 25 a 30% de los casos de cáncer cervical (Berumen *et al.*, 2001; Burd, 2003).

Es muy amplia la información de los diferentes tipos de virus del papiloma humano que implican riesgos adicionales al desarrollo del CaCu en el mundo. Así encontramos que el tipo más común de VPH que se encuentra en sexo-servidoras en México y los Estados Unidos es el 16, con una incidencia de 48.9% (Juárez-Figueroa *et al.*, 2001). También se encuentra el 18 con una frecuencia de 15% y ambos tipos participan en la progresiva transformación de células epiteliales de cérvix a células cancerosas (Pontén *et al.*, 1995; Muñoz, 2000). En

un estudio realizado entre los años 1996 y 1999, se informó que en México existían 24 tipos de VPH y los más frecuentes tipificados con la técnica de SSOP inversa fueron 16, 18, 31 y 53 pero ninguno de ellos estuvo presente más del 1.7% del total de las mujeres estudiadas (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001). En otro estudio, los tipos de VPH que se encontraron más frecuentemente en las mujeres mexicanas con CaCu fueron 31, 35, 45, 51, 55, 58 y 73, mientras que los tipos 18, 31, 35, 51, 52, y 58 son los que predominaron en mujeres de los Estados Unidos afectadas de CaCu (Flores-Luna *et al.*, 2001).

El CaCu está también relacionado con el Herpes virus humano (HVH) (los tipos HVH-1, HVH-2, HVH-6 y HVH-7) (Koenig *et al.*, 1976) y el Citomegalovirus humano (CMVH), ya que incrementan la función oncogénica del VPH en la modificación de las células normales del cérvix a neoplasias (Ho *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2001).

### **1.1.3 HLA y CaCu**

No todas las mujeres que presentan una infección por VPH llegan a desarrollar lesiones de NIC o CaCu, indicando que pueden participar otros factores (Krul *et al.*, 1999). Entre los factores del hospedero que participan en el desarrollo de la enfermedad, se han considerado las moléculas de HLA clase I y II. Algunos estudios han tratado de asociar las lesiones NIC y CaCu con alelos de HLA.

De ahí que fueron realizándose estudios en Estados Unidos, con la finalidad de encontrar asociaciones de esta enfermedad con los antígenos HLA. Se reportó que los antígenos HLA-A1, A9, A11 y B12 presentaron una disminución en pacientes diagnosticadas con CaCu, mientras que los antígenos HLA-B5 y B8 estaban aumentados (Takasugi *et al.*, 1973; Tarpley *et al.*, 1975).

En población alemana, mujeres infectadas con HVH-1 y HVH-2, presentaron un aumento del antígeno HLA-B12, pero no tuvieron ninguna asociación significativa

con mujeres que presentaban CaCu (Koening *et al.*, 1976). También se encontró que el antígeno HLA-DQ3 generaba un riesgo 7.1 veces mas para desarrollar carcinoma celular escamoso y que este se incrementaba a 12.7 veces cuando se encontraba en desequilibrio de enlace con el antígeno HLA-DR5 lo que no se observó cuando el desequilibrio de enlace era con HLA-DR6 (Odunsi y Ganesan, 1997). Actualmente, existe una asociación positiva del desarrollo de CaCu con el antígeno HLA-B8 cuando esta presente la oncoproteína E7 del VPH-16 (Oerke *et al.*, 2005).

Wank y colegas (1992), reportaron que la frecuencia de los alelos DQB1\*0301 y \*0303 se encontraba incrementada en mujeres afroamericanas y belgas, lo que se confirmó con los estudios realizados por Helland *et al.* (1994) y Vandenvelde *et al.* (1993).

El haplotipo DRB1\*0407-DQB1\*0302 se asoció un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer cervical en población hispana, mientras que el haplotipo DRB1\*1501-DQB1\*0206 presentaba un riesgo relativo de 75 cuando las mujeres tenían infecciones con VPH-16, a su vez DRB1\*1302-DQB1\*0604 resulto ser independiente de las infecciones por VPH-16 (Odunsi y Ganesan, 1997; Arias-Pulido *et al.*, 2004).

En población del Reino Unido los alelos DQB1\*03, DRB1\*0401, \*0403, \*0406 y \*1101 se relacionaron positivamente con NIC así como los haplotipos DRB1\*0401-DQB1\*0301, DRB1\*0401-DQB1\*0302, DRB1\*0403-DQB1\*0302 y DRB1\*1101-DQB1\*0301 (Vandenvelde *et al.*, 1993; Odunsi y Ganesan, 1997). En la misma población se reportó que los antígenos HLA-B12 y B7 presentaron una asociación positiva lo que no sucedió con el antígeno HLA-B35, que presentó desequilibrio de enlace con el haplotipo DRB1\*0101-DQB1\*0501, que generó una protección contra el desarrollo de NIC (Odunsi y Ganesan, 1997).

En mujeres hondureñas se encontró una asociación positiva con el alelo DQA1\*03011 y el incremento a desarrollar NIC (Ferrera *et al.*, 1999), mientras que mujeres de Tanzania, el alelo DQB1\*0602 presentó una asociación con el CaCu (Wank *et al.*, 1993).

En Venezuela los alelos DQB1\*0201,\*0202 y \*0402 presentaron asociación positiva con el desarrollo de CaCu (Dao *et al.*, 2005) y en mujeres iraníes esta asociación se encontró con el alelo DQB1\*0601 (Dehaghani *et al.*, 2002).

En México, se reportó que pacientes con CaCu, los antígenos más frecuentes fueron HLA-A2, A30, A31 y A32, mientras que para el locus HLA-B fueron B39, B40 y B35. El antígeno HLA-DR5 se encontró con mayor frecuencia en pacientes que en controles (Silva *et al.*, 1999).

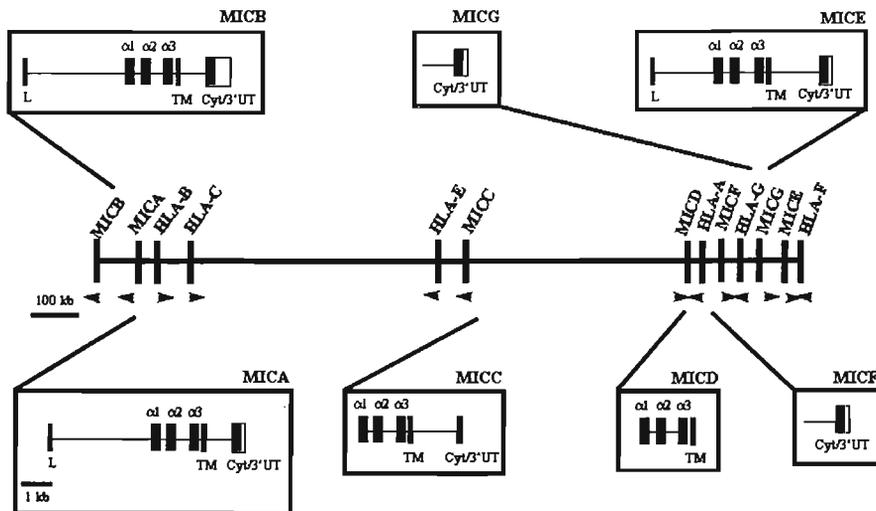
Otros genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) que se asocian con susceptibilidad al desarrollo del CaCu, son TAP (TAP1 y TAP2). Estos genes están involucrados en el procesamiento de antígenos unidos a las moléculas de clase II. En pacientes estadounidenses con alelos homocigotos TAP1 C/C, se encontró una frecuencia menor al compararse con mujeres sanas (Gostout *et al.*, 2003). Por otro lado, el gene TAP2 al presentarse en forma heterocigota (TAP2 A/B), incrementa la frecuencia de cáncer cervical en pacientes australianas (Fowler y Frazer, 2004).

Con lo anterior, se observa un panorama de cómo los alelos de HLA se asocian en forma positiva (susceptibilidad) o negativa (protección) con las diferentes poblaciones y que sirven como marcadores genéticos no sólo en la enfermedad de CaCu sino en otros padecimientos.

## 1.2 Genes MIC

Estos genes están conformados por siete miembros: MIC-A, MIC-B MIC-C, MIC-D, MIC-E, MIC-F y MIC-G. Sólo MICA y MICB codifican para transcritos de mRNA mientras que MICC, MICD, MICE, MICF y MICG son pseudogenes (Bahram, 2001). **Figura 2.**

**Figura 2.** Representación esquemática de las secuencias de los genes *MIC*, que se encuentran ubicados en la región de clase I de HLA. Tomado de Bahram, 2001.



Los genes MIC no se encuentran en murinos aunque se conservan en humanos, primates, perros, gatos, caballos y cerdos (Stephens *et al.*, 1999). Se ha considerado que los genes MIC se originaron de una diversificación temprana durante la evolución de los genes de clase I. El análisis filogenético de MIC sugiere que este gen divergió de los demás genes del MHC clase I después de la aparición de los anfibios, pero antes de la separación de mamíferos marsupiales y placentarios (Kandil *et al.*, 1995). Actualmente, los genes MIC son reconocidos

como un segundo linaje del MHC clase I en los mamíferos que pudieran haber evolucionado hacia los antígenos no clásicos (Bahram, 1994) y aunque no se encuentran en el genoma del ratón, pudiera existir una contraparte evolutiva que compensa su ausencia (Fodil *et al.*, 1996).

La molécula de MIC, contiene tres dominios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) precedidos de un segmento transmembranal y una región citoplasmática carboxilo terminal relativamente corta. Los niveles de mRNA no son afectados por interferón- $\gamma$  pero si son regulados por las proteínas de choque térmico lo que conduce a su sobreexpresión bajo condiciones de estrés, es independiente de TAP y no presenta antígenos (Bahram *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1996; Bahram, 2001). La proteína de MICA, cuando se compara con las moléculas de HLA clase I, comparte una similitud del 19%, 25% y 35% en los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  respectivamente (Bahram *et al.*, 1994); no se asocia con  $\beta 2$ -microglobulina (Li *et al.*, 1999).

La expresión del gen MIC se ha observado en células epiteliales (HeLa), queratinocitos (A431), linfoma de células T (MOLT-4), linfoma de células B (Raji) células endoteliales (HUV-EC-C) y monocitos (U937 y THP-1), pero también se ha encontrado su expresión en monocitos, queratinocitos y células endoteliales de muestras frescas, mientras que en subpoblaciones de linfocitos periféricos (células T -CD4<sup>+</sup> y -CD8<sup>+</sup> y células B CD19<sup>+</sup>) no se encuentra la expresión de MICA (Groh *et al.*, 1998; Zwimer *et al.*, 1998).

Las proteínas MICA y MICB, interactúan con los linfocitos T $\gamma\delta$ , CD8<sup>+</sup> y células NK a través de su receptor NKG2D/DAP10 (Bauer *et al.*, 1999). La frecuencia de T $\gamma\delta$  es baja en los órganos linfoides y en la sangre periférica, sin embargo, aumenta cuando las moléculas de MIC se unen a NKG2D (Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1998). El receptor NKG2D, moviliza átomos de Ca<sup>2+</sup> así como activa las vías intracelulares de JAK2, STAT5, la cinasa MAP ERK y Akt, fenómenos que ayudan a activar la respuesta inmunológica (Sutherland *et al.*, 2002; Carayannopoulos *et*

*al.*, 2002). Mientras que DAP10 recluta a través de su motivo citoplásmico (YINM) a la subunidad p85 de la cinasa 3 fosfatidilinositol (PIK3) (Groh *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 1999). MIC también regula la función de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en células infectadas con CMVH (Groh *et al.*, 2001). Sin embargo, esta función es inhibida por la unión de la glucoproteína UL16 (*unique long*) del CMVH con la molécula de MICB (Cosman *et al.*, 2001).

Se ha considerado que las células T $\gamma\delta$  intervienen en el enlace entre la inmunidad natural y la inmunidad adquirida (Mak y Ferrick, 1998), habiéndose sugerido que los linfocitos T $\gamma\delta$  y MICA/B podrían participar en el proceso de eliminación de células dañadas o infectadas al sobreexpresarse las moléculas MIC bajo condiciones de estrés (Cosman *et al.*, 2001).

Los polimorfismos se encuentran dentro de los exones 2-5, que codifica los dominios extracelulares  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  y región transmembranal respectivamente, y es generado por sustituciones no sinónimas y sinónimas (Stephens, *et al.*, 1999). En un modelo propuesto por Li y colaboradores en 1999, se alinearon las posiciones polimórficas no sinónimas de los dominios  $\alpha 1$ -  $\alpha 3$ . **Tabla 2.**

**Tabla 2.** Lista de sustituciones de aminoácidos no sinónimas en los dominios externos de la proteína MICA.

Dominio  $\alpha 1$ , exón 2 n=5

<b>Codón:</b>	6	14	24	26	36
<b>Consenso:</b>	Arg	Trp	Thr	Val	Cys
<b>Variante:</b>	Pro	Gly	Ala	Gly	Tyr

Dominio  $\alpha 2$ , exón 3 n=14

<b>Codón:</b>	91	105	114	122	124	125	129	142	151	156	173	175	179	181
<b>Consenso:</b>	Arg	Arg	Gly	Leu	Thr	Lys	Met	Val	Met	His	Lys	Gly	Val	Thr
<b>Variante:</b>	Gln	Lys	Arg	Val	Ser	Glu	Val	Ile	Val	Leu <sup>1</sup>	Glu	Ser	Ile	Arg

Notas: 1 En este codón también puede codificar una Arg (MICA\*043).

Dominio  $\alpha 3$ , exón 4 n=9

<b>Codón:</b>	206	208	210	213	215	221	251	256	271
<b>Consenso:</b>	Gly	Tyr	Arg	Thr	Ser	Val	Gln	Arg	Pro
<b>Variante:</b>	Ser	Cys	Trp	Ile	Thr	Leu	Arg <sup>1</sup>	Ser	Ala

Notas: 1 En este codón también puede codificar una Glu (MICA\*045).

La región transmembranal estabiliza a la molécula en la membrana celular, y la mayoría de su secuencia consiste de aminoácidos hidrofóbicos. El exón 5 tiene una región microsatelital que codifica polialaninas dependiendo del número de repeticiones del triplete (GCT) que existan. Los microsatélites reportados hasta el momento son: A4, A5, A6, A7, A9 y A10 (Rueda *et al.*, 2002).

Se ha definido otro microsatélite, A5.1, contiene cinco repeticiones del triplete y una inserción de un nucleótido (GGCT), que origina un codón de término (TAA), por lo que se pierde la región transmembranal de la molécula de MICA, generando una molécula soluble (Muzuki *et al.*, 1997; Groh *et al.*, 2002; Rueda *et al.*, 2002).

Hasta abril del 2005 se han reportado 58 alelos para MICA y 18 alelos para MICB ([http:// www.anthonynolan.org.uk](http://www.anthonynolan.org.uk)).

### 1.2.1 Los microsatélites de MICA y su asociación con enfermedades

A partir del descubrimiento del gen MICA, la región microsatelital se ha relacionado con la susceptibilidad o protección de enfermedades en distintas poblaciones. En la **Tabla 3**, se describen algunos ejemplos.

**Tabla 3.** Relación de enfermedades que presentan una **susceptibilidad** con los microsatélites de MICA en diferentes poblaciones.

Microsatélite	Enfermedad	Población	Referencia
A4	Artritis psoriática	Croata	Grubic, 2004
A4	Enfermedad de Kawasaki	Tailandesa	Huang, 2000
A4 y A9	Fiebre mediterránea familiar	Francesa	Touitou, 2001
A5	Enfermedad de Grave's	Tailandesa	Lo, 2003
A5	Diabetes mellitus tipo I	Suiza	Singal, 2001
A5.1	Psoriasis vulgaris	Coreana y China	Cheng, 2000, Choi, 2000
A5.1	Enfermedad de Addison	Italiana	Gambelunghe, 1999
A6	Artritis reumatoide	Caucásica	Singal, 2001
A6	Colitis ulcerativa	Caucásica	Sugimura, 2001
A6 y A9	Enfermedad de Behçet	Caucásica	Wallace, 1999
A9	Artritis psoriática	Española	González, 2002
A9	Enfermedad de Behçet	Japonesa	Muzuki, 1997

En niños tailandeses con la enfermedad de Kawasaki, se observó la ausencia del microsatélite A4 en el desarrollo de aneurismas coronarias (Huang *et al.*, 2000). Por otro lado, este mismo microsatélite confiere un riesgo al desarrollo de la artritis psoriática en población croata (Grubic *et al.*, 2004), en cambio, en la población española es el microsatélite A9 el que confiere el riesgo, independientemente de su asociación con Cw6. Se han relacionado también los antígenos de HLA-B13, B16, B17 con la artritis psoriática (González *et al.*, 2002).

El microsatélite A5, confiere un riesgo para la enfermedad de Grave's en niños

tailandeses (Lo *et al.*, 2003) y en suizos se ha asociado con diabetes mellitus tipo-1 (Singal *et al.*, 2001).

La frecuencia del microsatélite A5.1 se encontró incrementada en pacientes coreanos y chinos enfermos con psoriasis vulgaris, y se sugiere que este microsatélite al igual que el alelo Cw\*0602, puedan ser marcadores genéticos relacionados en etapas tempranas de ésta enfermedad (Cheng *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2000). En pacientes italianos con la enfermedad de Addison, este microsatélite confiere un riesgo junto con el haplotipo HLA-DR3-DQ2 (Gambelungho *et al.*, 1999).

El microsatélite A6 tiene una relación negativa en el desarrollo de artritis reumatoide en población caucásica (Singal *et al.*, 2001), pero en pacientes con colitis ulcerativa, homocigotos al microsatélite A6, les confiere un riesgo de desarrollar complicaciones secundarias en un tiempo menos prolongado (Sugimura *et al.*, 2001). También se ha reportado que pacientes caucásicos con la enfermedad de Behçet, los microsatélites A6 y A9 presentan un desequilibrio de enlace con HLA-B51 (Wallace *et al.*, 1999) y en población japonesa con la misma enfermedad, el microsatélite A6 presenta una alta frecuencia (Muzuki *et al.*, 1997).

En población francesa, que padece de la enfermedad de fiebre mediterránea familiar (causada por las mutaciones del gen MEFV), el microsatélite A9 genera un riesgo a desarrollar complicaciones (más severas en el curso de la enfermedad) en pacientes con la homocigocidad M694V, mientras que el microsatélite A4 disminuye el riesgo de las complicaciones (Touitou *et al.*, 2001).

### **1.3 Genes del Factor de Necrosis Tumoral (TNF)**

El Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF $\alpha$ ), en forma conjunta con IL-1 e IL-6, participa en la primera fase de la respuesta inmune innata. Se ha encontrado que

en neutrófilos y macrófagos y células del endotelio vascular aumenta la expresión de moléculas de adhesión para iniciar una respuesta inflamatoria dirigida a los sitios de daño (tejidos) e infección; incrementa la temperatura, produce somnolencia, permite la liberación de glucocorticoides (Hermann *et al.*, 1998) y regula la apoptosis mediante la función citotóxica a través de la vía del receptor TNFR-1 (Idriss y Naismith, 2000). En cambio, el Factor de Necrosis Tumoral beta - (TNF $\beta$ ) también conocido como linfotoxina alpha- (LT $\alpha$ ) se ha encontrado en linfocitos T, B y células NK (Beutler, 1992) y su principal función es estimular la neogénesis linfoide y la formación de centros germinales secundarios (Sacca *et al.*, 1997).

En 1984 la purificación de las proteínas TNF $\alpha$  y TNF $\beta$ , a partir de macrófagos activados y células T, reveló que tienen el 30% de homología y presentan una estructura trimérica en forma de pera-cónica (Eck y Sprang, 1989). Dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición a las citocinas, estas activan proteínas G, factores de transcripción (NF-kB, AP-1), proteínas cinasas (CKII, erk-1, erk-2 y MAP2), fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>, PLC, PLD y esfingomielinasa), proteínas mitocondriales (manganeso-superóxido dismutasa) y serina/cisteina proteasas conocidas como caspasas (Idriss y Naismith, 2000).

La citotoxicidad de TNF $\alpha$ , logra que en las células tumorales se alteren la función de los microtúbulos mediante la tubulina-nitrotirosinilada (Idriss y Naismith, 2000).

La familia de genes de TNF se encuentra localizada en la región III del MHC con un total de 7 Kb. Está conformado por los genes: TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  y la Linfotoxina Beta (LT $\beta$ ). En esta región se encuentran incluidos cinco microsatélites (a-e). Los microsatélites TNFa y TNFb, presentan repeticiones GT (99-125) y GA (125-131) respectivamente y se localizan a 3.5 kb corriente arriba del gen TNF $\beta$ . El microsatélite TNFc también presenta, igual que los anteriores, dos marcadores polimórficos que han sido descritos como GA (159-161) ubicados en el primer intrón del gen TNF $\beta$  (Udalova *et al.*, 1993; Alburquerque *et al.*, 1998; Marsh *et al.*,

2003). Los microsatélites TNFd y TNFe contiene los dinucleótidos GA. Ubicados en 124-136 y 98-102 respectivamente, se localizan a 8-10 kb corriente abajo del gen TNF $\alpha$  **Figura 3**. El número de alelos reportados para cada uno de los microsatélites está representado en la **Tabla 4** (Udalova, *et al.*, 1993).

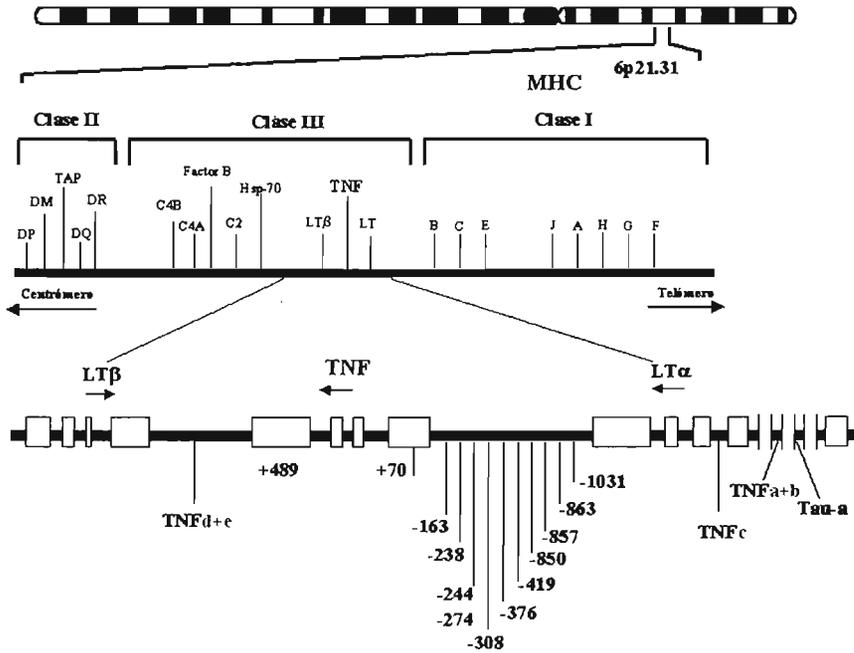
**Tabla 4.** Descripción de las repeticiones, número de alelos y repeticiones de los microsatélites de TNF.

<b>Microsatélite</b>	<b>TNFa</b>	<b>TNFb</b>	<b>TNFc</b>	<b>TNFd</b>	<b>TNFe</b>
Secuencia de repeticiones	(GT)	(GA)	(GA)	(GA)	(GA)
Número de alelos	14	7	2	7	3
Longitud de repeticiones	99-125	125-131	159-161	124-136	98-102

Se han descrito 13 polimorfismos de nucleótido simple (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), de los cuales 11 se encuentran en la región promotora y 2 inserciones incluidas en los exones 1 y 4 respectivamente del gen TNF $\alpha$ .

En la posición +70 existe una inserción de una C. En las posiciones: +489, -163, -238, -244, -274, -308 y -376 hay un cambio de G/A, en las posiciones -850, -857 y -863 se da un cambio de C/T (Bednarczuk *et al.*, 2004) y en la posición -1031 hay una sustitución de T/C. El polimorfismo que se encuentra en la posición -419 se debe a un cambio de G/C. Los polimorfismos -419 y -163 son los menos frecuentes (Mira *et al.*, 1999). **Figura 3**.

**Figura 3.** Localización y organización del gen de TNF. Ubicado en la región de MHC clase III, en el brazo corto del cromosoma 6 humano (6p21). Los cuadros representan exones. Se observan los polimorfismos que mayormente se han asociado a enfermedades. La familia de genes TNF tiene 5 regiones microsatelitales que se observan en color rojo.



Los SNP-308 y -238 son los más estudiados, ya que su efecto biológico está relacionado directamente a la regulación de la producción de esta citocina. Se ha reportado que el alelo TNF $\alpha$ -308\*A tienen una actividad transcripcional mayor que el alelo TNF $\alpha$ -308\*G (Braun *et al.*, 1996). En cambio la presencia de G en la posición -238 y el SNP-376 que coincide con el sitio de anclaje para el factor transcripcional OCT-1, produce una síntesis elevada de TNF $\alpha$  (Huizinga *et al.*, 1997; Knight *et al.*, 1999).

Los polimorfismos localizados en la región promotora presentan desequilibrio (*i.e.* los SNP -1031, -863, -376 y -238). El SNP-308 presenta un desequilibrio de enlace

con el codón 26 de TNF $\beta$  (Hamann *et al.*, 1995). Hay reportes que señalan el desequilibrio de enlace con los antígenos HLA-B8, DR3, DR1, DR4 y DR7 y que están asociados con la síntesis elevada de TNF $\alpha$ , mientras que la asociación con HLA-DR2 y DR5 está relacionada con una disminución en la síntesis de TNF $\alpha$  (Hajeer y Hutchinson, 2000).

Pociot y colaboradores (1993) encontraron que en cultivos de células mononucleares obtenidos de pacientes caucásicos con diabetes mellitus, los haplotipos extendidos A1-B8-DRB1\*0301-TNF $\alpha$ 2-TNF $\beta$ 1-TNF $\gamma$ 1 y B62-DRB1\*0401-TNF $\alpha$ 2-TNF $\beta$ 1-TNF $\gamma$ 1, se relacionaban con una elevada producción de TNF $\alpha$  *in vitro*, en cambio el haplotipo extendido B44-DRB1\*0401-TNF $\alpha$ 6-TNF $\beta$ 5-TNF $\gamma$ 1 se relacionaba con una baja producción de TNF $\alpha$ .

### 1.3.1 TNF y su asociación con enfermedades

La participación de los polimorfismos genéticos de TNF predisponen al desarrollo de determinadas enfermedades como consecuencia de una alteración de la actividad transcripcional del gen (Bednarczyk *et al.*, 2004). En particular algunos SNPs de la región promotora de TNF $\alpha$  se han relacionado con el riesgo o protección de algunas enfermedades en diferentes poblaciones (Hamman *et al.*, 1995). **Tabla 5**

**Tabla 5.** Relación de enfermedades que presentan una susceptibilidad (S) o protección (P) con los polimorfismos de TNF $\alpha$  en diferentes poblaciones.

Polimorfismo	(S) / (P)	Enfermedad	Población	Referencia
TNF-308*A	(S)	Asma o malaria cerebral	Australiana	Albuquerque <i>et al.</i> , 1998
TNF-308*A	(S)	Lepromatosis y lepra tuberculosa	Africana	Hajeer y Hutchinson, 2000
TNF-308*A	(P)	Dengue	Vietnamitas	Loke <i>et al.</i> , 1996
TNF-863*C y -1082*G	(S)	Hepatitis C	Italiana	Lio <i>et al.</i> , 2003
TNFC2	(S)	SIDA	U.S.A.	Brinkman <i>et al.</i> , 1997; Khoo <i>et al.</i> , 1997
TNF+488*A y -859*T	(S)	Cáncer de vejiga, cáncer de próstata, carcinoma de colón y cáncer de laringe	U.S.A.	Marsh, 2003
TNF-308*A	(S)	Enfermedad de Bowel	Caucásica	Hirv, 1999
TNF-308*A	(S)	Sarcoidosis	Caucásica	Somoskövi, 1999

En pacientes australianos con asma o con malaria cerebral, se encontró que el polimorfismo TNF-308\*A, aumentaba 6 veces más la producción de la citosina, ocasionando un daño mayor a estos pacientes en comparación con los que no presentaban este polimorfismo (Albuquerque *et al.*, 1998; Hajeer y Hutchinson, 2000). En pacientes africanos con lepromatosis y lepra tuberculosa se reportó que el TNF-308\*A incrementa el riesgo 3.3 veces más la producción de TNF $\alpha$  (Hajeer y Hutchinson, 2000). Sin embargo, en pacientes vietnamitas que padecen dengue el polimorfismo TNF-308\*A, les confiere una protección (Loke *et al.*, 1996).

Las posiciones -863\*C y -1082\*G se ha asociado con hepatitis C en pacientes sicilianos (Lio *et al.*, 2003).

En estadounidenses que padecen SIDA, se han estudiado varios SNP de la región promotora de  $TNF\alpha$ . En las posiciones -163, -238, -308 y -376 no se encontraron diferencias entre los pacientes que desarrollaban con mayor o menor rapidez la enfermedad. También se reportó que el microsatélite  $TNFc2$  presentaba una mayor frecuencia en pacientes que desarrollan lentamente el SIDA (60.9%), que en aquellos que lo hacían rápido (15%) (Brinkman, 1997; Khoo *et al.*, 1997). Por otro lado, los polimorfismos  $TNF+489*A$  y  $-857*T$ , fueron asociados con la progresión de cáncer de vejiga, de próstata, laringe y colón en esta misma población (Marsh *et al.*, 2003).

En caucásicos la enfermedad de esclerosis múltiple no presentó asociación con el  $TNF-308*A$  (Mäurer *et al.*, 1999), pero si hubo susceptibilidad con el desarrollo de sarcoidosis (Somoskövi, 1999).

En pacientes alemanes con la enfermedad inflamatoria de Bowel, se encontró desequilibrio de enlace entre el SNP-308 de  $TNF\alpha$  y el alelo  $DRB1*1501$  (Hirv *et al.*, 1999).

## 2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una mujer con cáncer cérvico uterino muere cada dos horas diariamente, lo cual representa un problema de salud que afecta a mujeres todavía en edad productiva. La Organización Panamericana de la Salud (miembro de la Alianza para la Prevención de Cáncer Cervical), informó que el CaCu mata cada año casi un cuarto de millón de mujeres a nivel mundial. El CaCu se estima que podría afectar a 750,000 mujeres en el año 2020 y la cifra mundial podría aumentar hasta 1 millón de casos nuevos para el año 2050. En México, diario se diagnostican 60 nuevos casos de CaCu, enfermedad que al año causa más de cuatro mil muertes en la población femenina, a pesar que desde 1974 se implementó el Programa Nacional de Detección Oportuna de Cáncer. Este cáncer es de origen multifactorial, principalmente asociado con la infección por VPH, aunque existen otros factores involucrados (HLA, p53, c-myc, etc.) en generar protección y/o susceptibilidad al desarrollo de CaCu. Algunos genes como  $TNF\alpha$  y MICA, están involucrados en la respuesta inmunológica innata del hospedero y además presentan asociación con diferentes tipos de cánceres epiteliales. El trabajo pretende estudiar si hay alguna asociación con la región microsatelital de MICA y el SNP-308 de la región promotora de  $TNF\alpha$  en mujeres mestizas mexicanas con infecciones por VPH y lesiones neoplásicas precursoras al CaCu, los cuales pudieran tener participación como marcadores de susceptibilidad, de resistencia o relacionarse con un cuadro clínico específico durante el desarrollo de la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero.

## **3.0 OBJETIVOS**

### **3.1 GENERAL**

- Estudiar la asociación de los microsatélites del gen MICA y el polimorfismo -308 de TNF $\alpha$  con las diferentes lesiones del cuello uterino en mujeres mestizas mexicanas.

### **3.2 PARTICULARES**

- Determinar la frecuencia alélica de los microsatélites del exón 5 del gen MICA y el SNP-308 de la región promotora del gen TNF $\alpha$  en pacientes con lesiones neoplásicas del cérvix y en un grupo de mujeres sin lesiones.
- Determinar la frecuencia del genotipo de la región microsatelital de MICA y el SNP-308 de la región promotora del gen TNF $\alpha$ , en pacientes con lesiones neoplásicas en cérvix y en un grupo de mujeres sin lesiones.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los microsatélites de MICA y el SNP-308 de TNF $\alpha$  entre las pacientes y el grupo de mujeres sanas.
- Determinar si existe asociación alélica o genotípica de los microsatélites de MICA y la posición -308 de la región promotora de TNF $\alpha$  con las infecciones por VPHs.

## 4.0 HIPÓTESIS

De los microsatélites del gen MICA (A4, A5, A6 y A9) al menos uno de ellos podría participar como un factor de protección en la asociación con lesiones precursoras al CaCu, mientras que el SNP-308\*G de la región promotora de TNF $\alpha$  estará presente en más del 75.0% en mujeres mestizas mexicanas con y sin infección por VPH.

## 5.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Muestras de controles

Se tomaron 5 ml de sangre periférica a 117 mujeres sanas de la Unidad de Medicina Preventiva de la Clínica núm. 32 del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se incluyeron mujeres con tres resultados negativos anuales de Papanicolaou (PaP) previos a la toma de muestra cervical.

### 5.2 Muestras de pacientes

Se recolectaron 5 ml de sangre periférica y una muestra de células cervicales a 147 mujeres con antecedente del PaP sospechoso de la Clínica de Displasias del Hospital General de Zona No. 1A "Venados" del Instituto Mexicano del Seguro Social. Como procedimiento de rutina los médicos realizan nuevamente el PaP, o biopsia (Bx) y legrado endocervical (LEC) cuando la lesión es mayor, y la colposcopia. En las pruebas de PaP, Bx y LEC se realizó la tinción con Giemsa para observar las alteraciones morfológicas celulares causadas por los VPH (coilocitos). En la colposcopia se efectuó la prueba de ácido acético que identifica las lesiones avanzadas causadas por VPH a través de regiones blanquecinas así como las llamadas "crestas de gallo". Las muestras fueron distribuidas de acuerdo a la clasificación de Bethesda, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado, **LIEBG** (VPH+ y NIC I, n = 109) y Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado, **LIEAG** (NIC II, NIC III e *in situ*, n = 38).

Tanto al grupo control como a las pacientes se les aplicó un cuestionario que incluía, principalmente, preguntas relacionadas a factores de riesgo (*i.e.* número de gestas, partos, hábito de fumar, uso de anticonceptivos, etc.). Así como se les solicitó que firmarán una carta de consentimiento después de explicarles en que consistía el proyecto e invitarlas a participar.

### **5.3 Extracción de DNA de muestras de linfocitos de sangre periférica (LSP)**

Se utilizó una técnica de *salting out* para la extracción de DNA (Miller *et al.*, 1988). A partir de 5 ml de sangre total recolectada en tubos con anticoagulante EDTA. La muestra se centrifugó para obtener el añillo leucocitario que se resuspendió en un buffer con sacarosa para lisar los eritrocitos, los leucocitos se lisaron con un buffer de NaCl y EDTA. El DNA se separó de las proteínas con SDS (20%), NaClO<sub>4</sub> y NaCl (6M) y se precipitó con isopropanol. Después de ser lavado con etanol al 70% se disolvió en agua bidestilada. El DNA fue cuantificado por espectrofotometría y se evaluó su integridad mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%, con TBE 0.5X.

### **5.4 Extracción de DNA de células cervicales**

Se tomaron muestras del cérvix de cada paciente con un cepillo citológico (*Dental Lab*) y se diluyó con 1000 µl de PBS IX. La muestra se centrifugó y el botón se resuspendió en 500 µl de buffer de lisis (Tris, NaCl y Na-EDTA). La separación del DNA de las proteínas se realizó con SDS 10% y proteinasa K (2mg/ml). Posteriormente, se precipitó con 1 volumen de isopropanol por 12 horas. El DNA se disolvió con agua bidestilada. Finalmente se incubó a 100°C por 10 minutos para inactivar restos de la proteinasa K y se procedió a la tipificación de VPH.

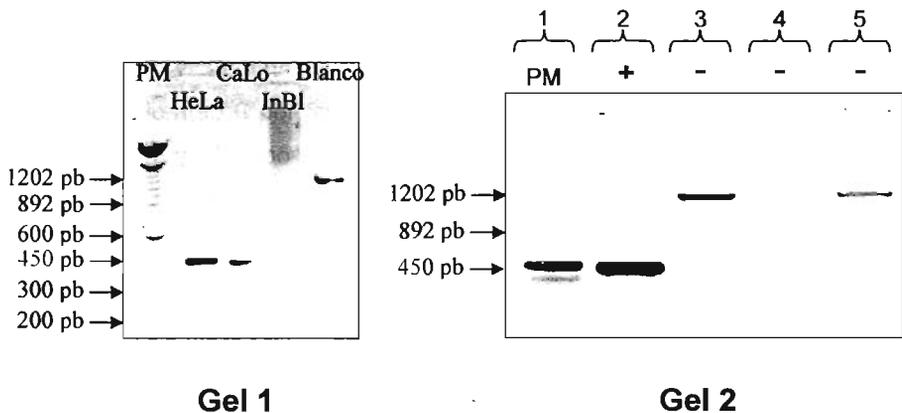
### **5.5 Tipificación de VPH**

La tipificación del VPH se realizó con el *kit* comercial PVHfast 2.0 (*Pharma Gen*, Madrid, España), que amplifica una región del gen L1 de la cápside del virus a partir de DNA de células epiteliales provenientes de la zona del cuello uterino. La reacción de PCR tiene un control interno (1202 pb) que consiste de un plásmido que tiene insertado el gen constitutivo CFTR (892 pb). Después de realizar la reacción de PCR a partir de las condiciones de amplificación dadas por el

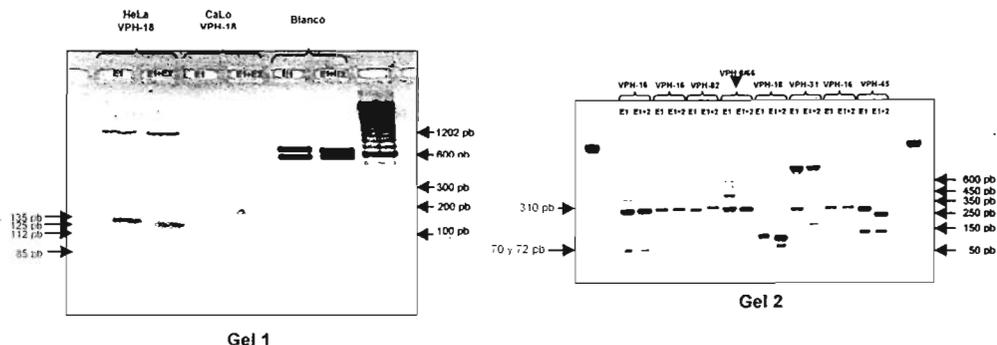
proveedor, se obtuvieron los productos de PCR. Una muestra se consideró positiva a VPH cuando se obtenían productos de 1202 pb (control interno) y 450 pb (región L1) y negativa cuando los productos que se obtenían eran 1202 pb y 892 pb (CFTR). Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1.0%, utilizando como marcador de peso molecular el DNA Molecular Weight Marker VIII (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). **Figura 4**

Mediante la prueba de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) las muestras positivas se digirieron con las dos enzimas -enzima 1 (*RsaI*) y enzima 2 (desconocida), de restricción contenidas en el *kit*. Los productos digeridos fueron observados en geles de agarosa al 3.0%, utilizando el mismo marcador de peso molecular mencionado anteriormente. El tipo de VPH se identificó al comparar los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis de las dos digestiones (E1 y E1+E2 para cada muestra) con la hoja de resultados adjunta en el *kit* (Díaz-Flores, *et al.*, 2000). **Figura 5**

**Figura 4.** Se muestran en dos geles diferentes la amplificación de L1 del VPH por PCR. Gel 1) Líneas Celulares positivas a VPH y Gel 2) muestras del grupo de pacientes. Una muestra es positiva a la infección por VPH cuando se obtiene una banda de 450 pb (Gel 1), mientras que una negativa se considera cuando aparecen bandas de 892 pb (gen CFTR) y una banda de 1202 pb (Gel 2, 3-5). En el Gel 1, la línea celular InBl presenta una infección por VPH, sin embargo, no se observó la amplificación debido a una degradación del DNA.



**Figura 5.** Electroforesis de la digestión de muestras positivas a VPH con las enzimas 1 (E1) v 2 (E1+E2). Gel 1) Líneas Celulares y Gel 2) muestras de pacientes. Se compararon las bandas con la hoia patrón del *kit* PVHfast 2.0. En el Gel 1 se observan bandas de E1 (135pb, 112 pb v 85 pb) y E1+E2 (125pb, 112pb y 85pb) correspondientes a la infección por VPH-18 (HeLa y CaLo), mientras que en la mayoría de las muestras del Gel 2 se observan bandas de E1 y E1+E2 (310pb, 72pb y 70pb) que corresponden a la infección por VPH-16.



## 5.6 Tipificación de los microsatélites de MICA

El producto de PCR que se amplificó para el microsatélite de MICA, incluyó los exones 4 y 5, con la finalidad de poder determinar en un estudio posterior el alelo de MICA (exones 2–5) (Pérez–Rodríguez *et al.*, 2002).

Se amplificaron las muestras del grupo control y pacientes, usando: 0.2 mM de dNTP's, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 pmol de cada iniciador (Pérez–Rodríguez *et al.*, 2002), 0.03 U de *Taq*-polimerasa (*Invitrogene*) y 200ng/μl de DNA. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo a 95°C por 5min; 33 ciclos a 95°C/30s, 65°C/50s, 72°C/30s; y una extensión final a 72°C por 8min. El tamaño del producto de MICA 4-5 fue de 678 bp.

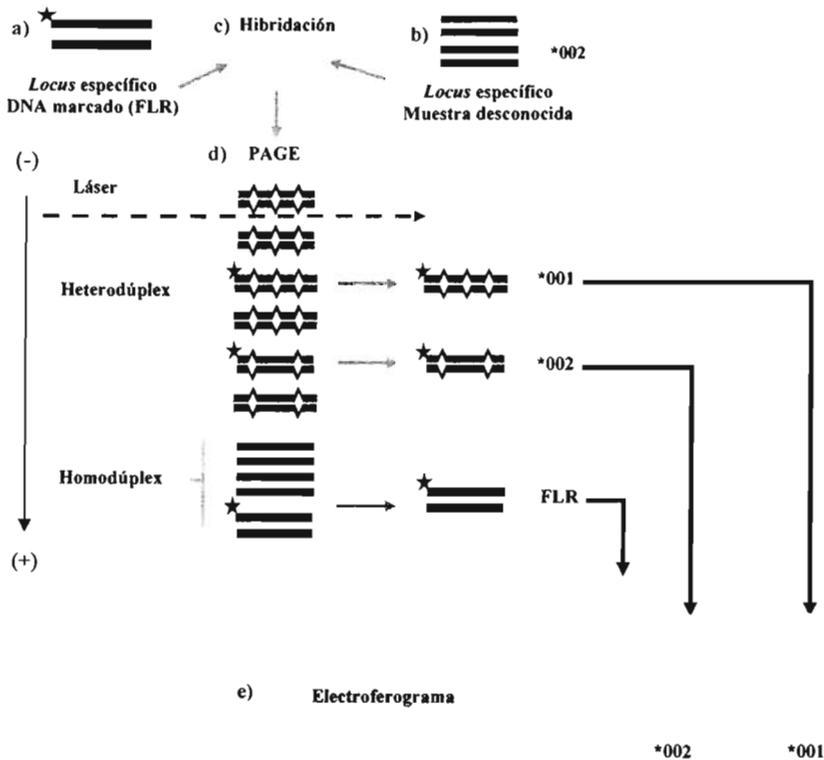
### 5.6.1 RSCA (*Reference Strand mediated Conformation Analysis*)

La técnica de RSCA (Argüello *et al.*, 1998) se utilizó para la tipificación de los microsatélites de MICA. **Figura 6.** El primer paso de RSCA es la amplificación por PCR del *locus* específico que se desea estudiar (exones 4-5) usando un iniciador

marcado, sentido o antisentido, con el fluorocromo carbocianina 5 (Cy5), de tal forma que sólo una de las cadenas del producto de PCR se encuentre marcada. A este producto se le conoce como FLR (*Fluorescence Labelled Reference*) **Figura 6a**. En forma independiente, se realiza una amplificación de la muestra a estudiar usando los mismos iniciadores pero sin marcar **Figura 6b**. Posteriormente las muestras se mezclan y se lleva a cabo la desnaturalización e hibridación de ambas muestras **Figura 6c**, formándose homodúplex y heterodúplex **Figura 6d**. La conformación molecular de los dúplex es única, reflejándose en la movilidad electroforética. La movilidad del DNA de doble cadena en un gel de acrilamida no desnaturalizante PAGE depende únicamente de las condiciones electroforéticas, del peso molecular y de la conformación. Cuando se mantienen constantes las condiciones electroforéticas, la migración de los dúplex dependerá de las diferencias en la conformación molecular. Por último, los picos generados de las muestras se compararon con controles internos que son productos de PCR ya tipificados (*ladders*) **Figura 6e**.

**Figura 6.** Técnica de RSCA (*Reference Strand mediated Conformation Analysis*).

La determinación del polimorfismo por RSCA se fundamenta en las diferentes conformaciones que adquieren los heterodúplex formados entre una referencia marcada con un fluorocromo y el DNA de estudio a causa de la falta de complementariedad de sus secuencias. Estas conformaciones tienen patrones de migración particulares en electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), de forma que pueden ser identificados.



### 5.6.2 Preparación de referencias (FLRs)

Las referencias (FLRs) fueron generadas a partir de líneas celulares linfoblastoides homocigotas para los microsatélites de MICA como se describió anteriormente. Antes de utilizar las FLRs cualquier actividad existente de la Taq polimerasa en el producto de PCR (100 µl) se inactivó con 4 µl de EDTA 0.5M.

### **5.6.3 Hibridación**

La hibridación se realizó con 3  $\mu$ l de producto de PCR y 1  $\mu$ l de FLR, esta mezcla se desnaturalizó a 95<sup>o</sup>C por 4min, enseguida fue llevada a 55<sup>o</sup>C por 5min para permitir la hibridación de las cadenas y después se mantuvo a 15<sup>o</sup>C por 7min. Finalmente se agregó 1  $\mu$ l de buffer de carga de RSCA (Argüello *et al.*, 1998).

### **5.6.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Los dúplex (homodúplex y heterodúplex) fueron separados por electroforesis en un secuenciador automatizado ALFexpress II (*Amersham Pharmacia Biotech*). Un  $\mu$ l de cada muestra preparada fue cargada en un gel no desnaturalizante de 8.0% de bisacrilamida (30.0%) (Sigma, USA). El tamaño del gel fue 21 cm de largo y 0.5 mm de espesor. La electroforesis se llevó a cabo a 40 <sup>o</sup>C, 647 V, 46 mAmp, y 30 W por 480 minutos. Los geles fueron corridos en TBE IX y reutilizados dos veces con buffer nuevo.

### **5.6.5 Análisis de los resultados en el gel de poliacrilamida**

Las movilidades de los diferentes dúplex fueron analizadas con el software Allelelocator 1.03 (*Amersham Pharmacia Biotech*). La corrección del gel y el análisis de los datos se realizó asignando al pico del iniciador fluorescente el valor de 1 y al homodúplex el valor de 1000, logrando alinear de esta forma todos los homodúplex. Así los microsatélites de MICA fueron asignados al compararse los valores de sus movilidades con los controles internos (*ladders*) (Argüello *et al.*, 1998).

## **5.7 Amplificación de la posición -308 de la región promotora de TNF $\alpha$**

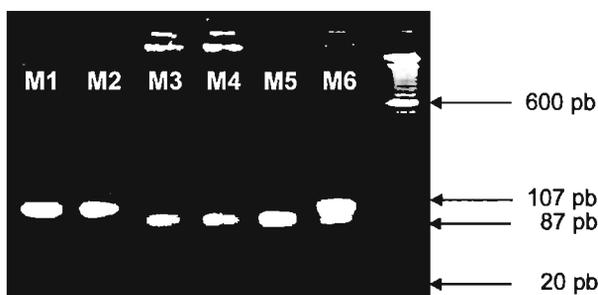
Se tipificaron 100 muestras, 50 controles y 50 de pacientes (25-LIEBG y 25-LIEAG) para el polimorfismo -308 de la región promotora del gen TNF $\alpha$ . La

región se amplificó con 0.2 mM de dNTP's, 1.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 pmol de cada iniciador (Wilson *et al.*, 1993), 0.03 U de *Taq*-polimerasa (*Invitrogene*) y 16ng/μl de DNA. Las condiciones de PCR empleadas fueron de un ciclo a 94°C/3min, 61°C/1min, 72°C/1min; 35 ciclos a 94°C/1min, 61°C/1min, 72°C/1min; finalmente un ciclo a 94°C/1min, 61°C/1min y 72°C/5min. El producto obtenido fue de 107 pb.

### 5.7.1 Tipificación de la posición -308 de TNFα mediante RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

El producto de PCR fue digerido con 5U de enzima de restricción NcoI (Fermentas, USA) a 37°C, durante 12 horas. El producto se visualizó en un gel de agarosa MS al 2.5% en TBE 0.5X a 80v por 85 minutos. El polimorfismo T1 (G) presentó dos fragmentos (87 y 20 pb), mientras que el polimorfismo T2 (A) un fragmento (107 pb). **Figura 7**

**Figura 7.** Electroforesis que permite observar el polimorfismo de la posición -308 de la región promotora de TNFα. De 6 muestras (M1-M6), la M1 y M2 muestran el polimorfismo T2 (A), las muestras M3, M4 y M5 tuvieron el polimorfismo T1 (G) y la M6 presentó un polimorfismo T1/T2 (heterocigoto).



### 5.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante la prueba  $\chi^2$  y la

prueba exacta de Fisher. Para evitar asociaciones significativas al azar se realizó la corrección de Bonferoni que consiste en multiplicar el nivel de significancia ( $p$ ) por el número de especificidades estudiadas ( $pc$ ) (Svejgaard y Ryder, 1994). Se obtuvo la razón de momios (R.M.) de cada evento usando un límite de confianza para todos los ensayos del 95% (Matthews y Farewell, 1985).

El equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) es un modelo teórico para genética de poblaciones. El concepto de equilibrio en el modelo de H-W se basa en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar, (panmixia).
2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos).
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).
4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

El modelo H-W se utiliza para calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas de cada uno de los genes estudiados. Si la prueba de  $\chi^2$  su valor es menor a  $p < 0.05$ , las poblaciones genéticas de estudio no se mantienen en equilibrio H-W (Sham, 1998).

Cuando algún elemento en la tabla de  $2 \times 2$  fue igual a cero, la R.M. fue calculada con la fórmula de Haldane (Bednarczuk *et al.*, 2004).

## 6.0 RESULTADOS

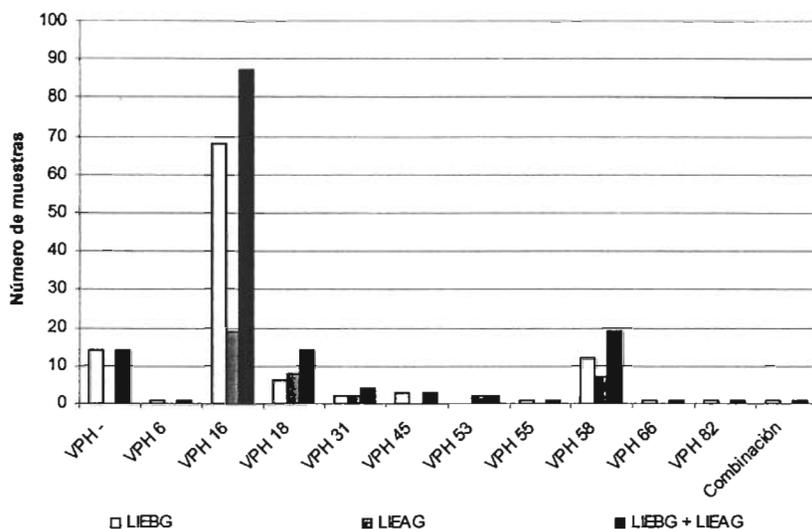
### 6.1 Evaluación de los factores de riesgo en el desarrollo de CaCu

Después de evaluar la información de los cuestionarios aplicados a los grupos, controles y pacientes, se tomó como factores de riesgo aquellos que presentaron resultados estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). Como lo marca la literatura, el número de gestas y partos así como el hábito de fumar y el uso de anticonceptivos continúan siendo los más importantes en el desarrollo del CaCu. Se observó una alta frecuencia en el hábito de fumar. No se observó ninguna diferencia significativa al dividir el grupo de pacientes entre LIEBG y LIEAG.

### 6.2 Tipificación de VPH

Para mostrar la presencia o ausencia del VPH se tomó en cuenta el resultado de PaP y colposcopia ( $n=147$ ). También el resultado de Bx y LEC de los casos obtenidos. Se realizó la prueba de PCR-RFLP a las muestras de DNA cervical de pacientes con LIEBG ( $n = 109$ ) y de pacientes con LIEAG ( $n = 38$ ) para verificar la presencia y determinar el tipo de VPH (Díaz-Flores *et al.*, 2000). En el grupo de LIEBG 95/109 muestras fueron positivas a VPH por PCR y 14/109 resultaron ser negativas. El grupo de LIEAG presentó 38/38 muestras positivas a VPH. **Figura 8**

**Figura 8.** Número de muestras para cada uno de los tipos de VPH tipificados con el kit HPVFast 2.0, distribuidas por grado de lesión y pacientes en total.

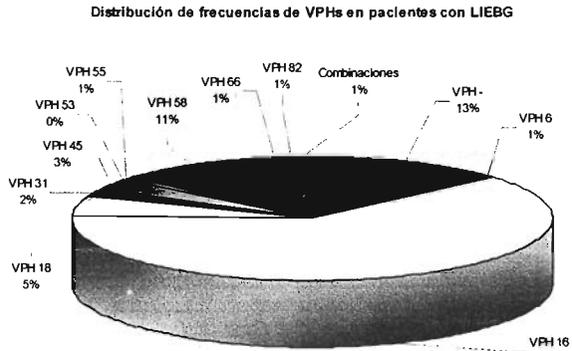


Se observó que en el grupo de pacientes con LIEBG los tipos 16 (62.38%) y 58 (11.0%) fueron más frecuentes, caso contrario para los tipos 6, 55, 66 y 82 que presentaron la misma frecuencia (0.92%). Sólo en una muestra se encontró una co-infección, VPH 6 y -66 (0.92%). **Figura 9 A**

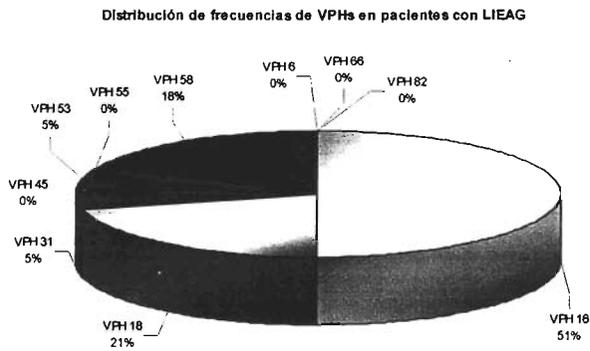
En el grupo de pacientes con LIEAG las mayores frecuencias de los VPH fueron VPH-16 (50.0%), VPH-18 (21.05%) y VPH-58 (18.42%). El tipo 53 sólo se encontró en pacientes con LIEAG con una frecuencia de 5.26%. **Figura 9 B**

Al agrupar a las pacientes de LIEBG y LIEAG (n = 133 VPH+) se observó que los tipos 16 (59.18%), 58 (12.9%) y 18 (9.52%) fueron los más frecuentes. **Figura 9 C**

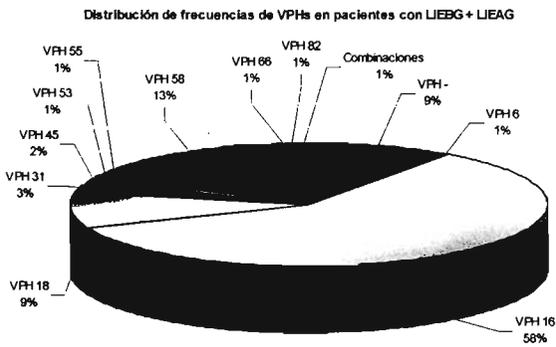
**Figura 9.** Comparación de las frecuencias (%) entre el grupo de pacientes. LIEBG v LIEAG de los tipos de VPH. **A)** Frecuencias de los VPH encontrados en el grupo de pacientes con LIEBG, **B)** Frecuencias encontradas de VPH en pacientes con LIEAG v **C)** Frecuencias de VPH encontrados en el grupo de pacientes con LIEBG + LIEAG.



**A**



**B**



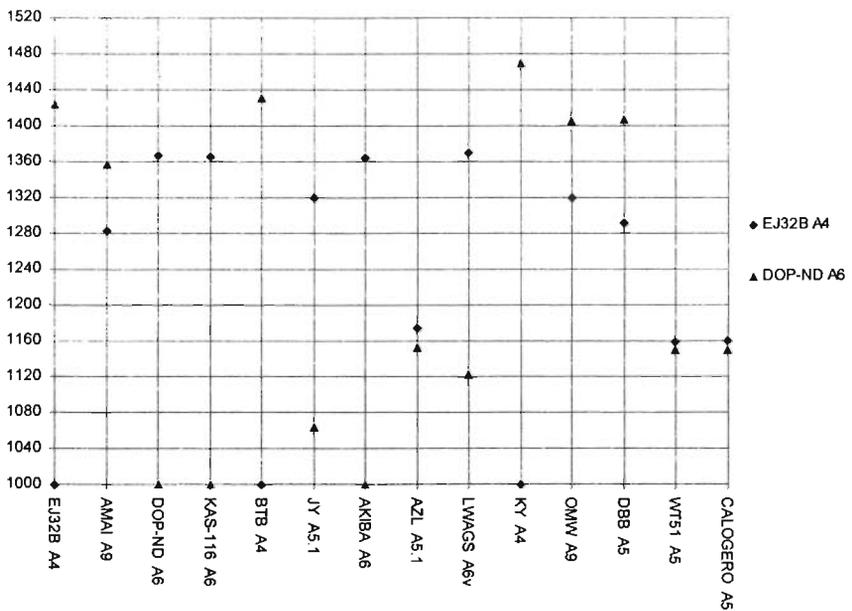
**C**

### 6.3 Selección de FLRs para tipificar los microsatélites de MICA mediante RSCA

Después de probar 12 FLRs los valores de movilidad obtenidos con cada una de ellas fueron combinados independientemente, con la finalidad de seleccionar la mejor combinación de FLRs. De esta forma, las FLRs seleccionadas para el estudio de los microsatélites fueron EJ32B (A4, FLR1) y DOP-ND (A6, FLR2)

**Figura 10**

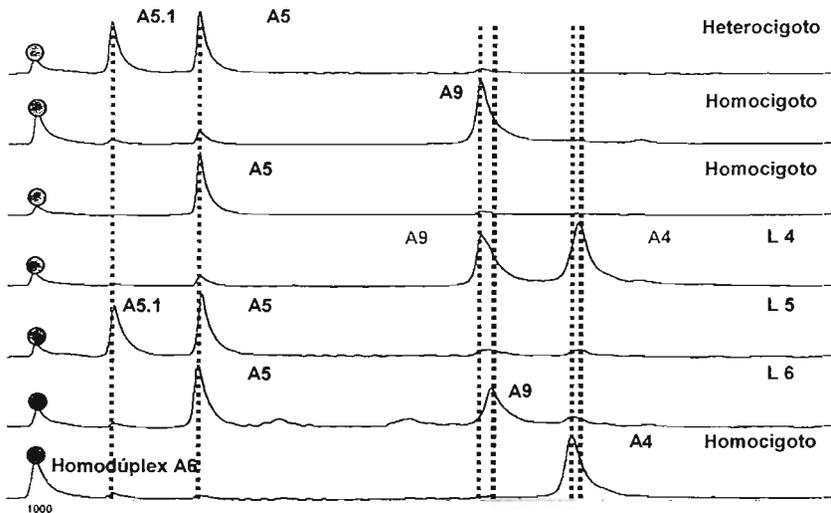
**Figura 10.** Selección de FLRs para tipificar la región de los exones 4-5 de MICA. Se muestran las movilidades de catorce líneas celulares linfoblastoides homocigotas, seleccionadas en el 12° Taller Internacional de Histocompatibilidad (Marsh *et al.*, 1997). Sólo se observan las movilidades obtenidas de la FLR1 (azul) y la FLR2 (rojo). Cada línea celular dio un valor único de movilidad que se utilizó como referencia al comparar las movilidades de las muestras a tipificar.



## 6.4 Selección de controles internos de DNA (*ladders*) para tipificar los microsatélites de MICA mediante RSCA

Se seleccionaron 6 *ladders* (L1-L6) de acuerdo con la movilidad del microsatélite de MICA. Las *ladders* L1 (A6 y A9), L2 (A5 y A5.1) y L3 (A5 y A9) fueron los controles internos para la FLR1 A4, mientras que las *ladders* L4 (A4 y A9), L5 (A5 y A5.1) y L6 (A5 y A9) fueron los controles para la FLR2 A6. **Figura 11.**

**Figura 11.** Electroferograma con la FLR2 A6 que muestra los controles internos (*ladders*) v su comparación con los picos de las muestras. Se señalan con líneas azules las diferentes movilidades de A4 y A9.



## 6.5 Movilidad de los microsatélites A4 y A9

Al analizar el exón 5 se observó que el microsatélite A4 presentaba dos movilidades, al igual que el microsatélite A9. Estas diferencias ya fueron reportadas (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2002) **Figura 11** y se deben a la secuencia del intrón 4.

## 6.6 Frecuencias de microsatélites

En el grupo control se obtuvo la frecuencia de 99/117 controles, 18/117 muestras presentaron resultados discrepantes y aunque se volvieron a analizar el resultado fue el mismo. Las muestras se están preparando para su secuenciación. Los microsatélites más frecuentes en el grupo control fueron A5 (29.3%) y A9 (38.4%). **Tabla 6**

Aunque se estudiaron las 109 muestras del grupo de LIEBG la frecuencia se obtuvo con base a 102/109 muestras. Al igual que el grupo anterior 7/109 muestras se tienen que secuenciar. Sólo la frecuencia del microsatélite A9 estuvo aumentada al comparar a las pacientes con LIEBG (48.5% vs 38.4%,  $p < 0.05$ ) y el grupo control. **Tabla 6**

En el grupo de LIEAG se obtuvo el resultado de 36/38 muestras por RSCA y 2/38 muestras se tienen que analizar por secuenciación. En este grupo el microsatélite A6 mostró una asociación negativa (R.M. 0.25, 0.08-0.71,  $pc < 0.05$ ) el cual conservó su valor significativo después de corregir el valor de  $p$ . **Tabla 6**

Al confrontar a las pacientes (LIEBG y LIEAG,  $n = 138$ ) con el grupo control se observó que el microsatélite MICA A6 (14.49% vs 22.7%,  $p < 0.05$ ) generaba una protección, mientras que el microsatélite MICA A9 producía una susceptibilidad (48.18% vs 38.4%,  $p < 0.05$ ). **Tabla 6**

**Tabla 6.** Frecuencias de los microsatélites de MICA, en el grupo control y grupo de las pacientes clasificadas por el grado de lesión LIEBG y LIEAG. Límite de confianza 95%

Microsatélites	Mujeres	Pacientes	Pacientes	Pacientes
	Controles n=99 198 (%)	LIEBG n=102 204 (%)	LIEAG n=36 72 (%)	LIEBG+ LIEAG n=138 276 (%)
A4	4 (2.02)	5 (2.45)	4 (5.55)	9 (3.26)
A5	58 (29.3)	50 (24.5)	26 (36.1)	76 (27.53)
A5.1	15 (7.57)	15 (7.35)	3 (4.16)	18 (6.52)
A6	45 (22.7)	35 (17.15)	<b>5 (6.94)<sup>2</sup></b>	<b>40 (14.49)<sup>4</sup></b>
A9	76 (38.4)	<b>99 (48.5)<sup>1</sup></b>	34 (47.2)	<b>133 (48.18)<sup>3</sup></b>

1 A9/LIEBG

R.M. = 1.51 (1.0 – 2.3) p<0.05

2 A6/LIEAG

R.M. = 0.25 (0.08 – 0.71) p<0.05

3 A9/Pacientes (LIEBG + LIEAG)

R.M. = 1.49 (1.01 – 2.20) p<0.05

4 A6/Pacientes (LIEBG + LIEAG)

R.M. = 0.58 (0.35 – 0.95) p<0.05

## 6.7 Frecuencias de genotipos de los microsatélites

La combinación de los microsatélites generó 15 genotipos (Tabla 7). Nuestros resultados fueron consistentes con el equilibrio de H-W, excepto las pacientes con LIEBG (p<0.05). En el grupo de LIEBG el genotipo A5A6 fue significativo al compararlo con el grupo control (4.90% vs 13.13%, p<0.05). En las pacientes con LIEAG no se encontró ningún genotipo significativo aunque si se pudo observar una frecuencia alta del genotipo A5A9 cuando se comparó con el grupo control (33.33% vs 18.18%). Al unir los grupos de pacientes (LIEBG y LIEAG, n = 138) el genotipo A5A6 se encontró disminuido al compararse con el grupo control (4.35% vs 13.13%, p<0.05) respectivamente. **Tabla 7**

**Tabla 7.** Comparación de frecuencias de los genotipos de los microsatélites de MICA entre el grupo control y el grupo de pacientes, tomando en cuenta el grado de lesión intrauterina.

Microsatélite	Mujeres Controles n=99 (%)	Pacientes LIEBG n=102 (%)	Pacientes LIEAG n=36 (%)	Pacientes LIEBG + LIEAG n=138 (%)
A4A4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A5	0 (0.0)	2 (1.96)	1 (2.78)	3 (2.17)
A4A5.1	0 (0.0)	1 (0.98)	0 (0.0)	1 (0.72)
A4A6	1 (1.01)	1 (0.98)	1 (2.78)	2 (1.45)
A4A9	3 (3.03)	1 (0.98)	2 (5.55)	3 (2.17)
A5A5	10 (10.10)	9 (8.82)	7 (19.44)	16 (11.60)
A5A5.1	7 (7.07)	3 (2.94)	0 (0.0)	3 (2.17)
<b>A5A6</b>	13 (13.13)	<b>5 (4.90)<sup>1</sup></b>	1 (2.78)	<b>6 (4.35)<sup>2</sup></b>
A5A9	18 (18.18)	22 (21.56)	12 (33.33)	34 (24.64)
A5.1A5.1	1 (1.01)	3 (2.94)	1 (2.78)	4 (2.89)
A5.1A6	4 (4.04)	1 (0.98)	0 (0.0)	1 (0.72)
A5.1A9	2 (2.02)	4 (3.92)	1 (2.78)	5 (3.62)
A6A6	7 (7.07)	7 (6.86)	0 (0.0)	7 (5.07)
A6A9	13 (13.13)	14 (13.72)	3 (8.33)	17 (12.32)
A9A9	20 (20.20)	29 (28.43)	7 (19.44)	36 (26.09)

<sup>1</sup> A5A6/LIEBG R.M.= 0.34 (0.10-1.08) p<0.05

<sup>2</sup> A5A6/Pacientes (LIEBG + LIEAG) R.M.= 0.30 (0.10-0.89) p<0.05

## 6.8 Frecuencias de microsatélites y tipos de VPH

Se decidió evaluar, si las frecuencias de los microsatélites estudiados aumentaban o disminuían el riesgo de desarrollar lesiones intrauterinas con algún tipo de VPH en particular. De las 102 muestras de LIEBG con resultados de microsatélites solo 90 muestras fueron tipificadas a VPH. En las muestras de LIEAG, las 36 muestras que se estudiaron para el microsatélite también fueron tipificadas a VPH. En ambos grupos los VPH-16, -18 y -58 fueron los más frecuentes y el análisis con el microsatélite sólo se realizó en estos tipos. **Tabla 8**

**Tabla 8.** Frecuencias de los microsatélites (GCT) con los VPH-16, -18 y -58. Se compararon las frecuencias con el total de pacientes y por grado de lesión

### VPH-16

<b>Microsatélites</b>	<b>Pacientes VPH-16 LIEBG n=64 128 (%)</b>	<b>Pacientes VPH-16 LIEAG n=17 34 (%)</b>	<b>P / VPH-16 LIEBG + LIEAG n=81 162 (%)</b>
A4	5 (3.90)	2 (5.88)	7 (4.32)
A5	30 (23.43)	13 (38.23)	43 (26.54)
A5.1	12 (9.40)	3 (8.82)	15 (9.26)
A6	21 (16.4)	1 (2.94)	22 (13.58)
A9	60 (46.8)	15 (44.11)	75 (46.29)

### VPH-18

<b>Microsatélites</b>	<b>Pacientes VPH-18 LIEBG n=6 12 (%)</b>	<b>Pacientes VPH-18 LIEAG n=8 16 (%)</b>	<b>P / VPH-18 LIEBG + LIEAG n=14 28 (%)</b>
A4	0 (0.0)	1 (6.25)	1 (3.57)
A5	3 (25.0)	7 (43.75)	10 (35.71)
A5.1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A6	2 (16.7)	0 (0.0)	2 (7.14)
A9	7 (58.3)	8 (50.0)	15 (53.57)

### VPH-58

<b>Microsatélites</b>	<b>Pacientes VPH-58 LIEBG n=11 22 (%)</b>	<b>Pacientes VPH-58 LIEAG n=7 14 (%)</b>	<b>P / VPH-58 LIEBG + LIEAG n=18 36 (%)</b>
A4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A5	6 (27.3)	8 (57.14)	14 (38.88)
A5.1	1 (4.54)	0 (0.0)	1 (2.77)
A6	3 (13.64)	2 (14.28)	5 (13.88)
A9	12 (54.5)	4 (28.57)	16 (44.44)

## 6.9 Frecuencias de genotipos de los microsatélites y tipos de VPH

Con la finalidad de observar si existía una asociación de riesgo o protección con los tipos de VPH más frecuentes y los 15 genotipos de los microsatélites de MICA. Se contrastaron las frecuencias de los genotipos observados por grado de lesión en pacientes infectadas con los VPHs 16, 18 y 58. Nuestros resultados fueron consistentes con el equilibrio de H-W, excepto las pacientes infectadas con el VPH-16 ( $p < 0.05$ ). En ambos grupos de lesión intraepitelial de pacientes por VPH-16 no se encontró ningún genotipo estadísticamente significativo. Sin embargo, en pacientes con LIEBG el genotipo A9A9 presentó una alta frecuencia (29.68% vs 17.64%) al compararlo con el grupo LIEAG. Caso contrario para el genotipo A5A5 (10.93% vs 23.52%). **Tabla 9**

**Tabla 9.** Frecuencias de los genotipos de MICA en pacientes infectadas con VPH-16

Microsatélite	Pacientes VPH-16 LIEBG n=64 (%)	Pacientes VPH-16 LIEAG n=17 (%)	P / VPH-16 LIEBG + LIEAG n=81 (%)
A4A4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A5	2 (3.12)	0 (0.0)	2 (2.46)
A4A5.1	1 (1.56)	0 (0.0)	1 (1.23)
A4A6	1 (1.56)	0 (0.0)	1 (1.23)
A4A9	1 (1.56)	2 (11.76)	3 (3.70)
A5A5	7 (10.93)	4 (23.52)	11 (13.58)
A5A5.1	1 (1.56)	0 (0.0)	1 (1.23)
A5A6	2 (3.12)	0 (0.0)	2 (2.46)
A5A9	11 (17.18)	5 (29.41)	16 (19.75)
A5.1A5.1	3 (4.68)	1 (5.88)	4 (4.94)
A5.1A6	1 (1.56)	0 (0.0)	1 (1.23)
A5.1A9	3 (4.68)	1 (5.88)	4 (4.93)
A6A6	5 (7.81)	0 (0.0)	5 (6.17)
A6A9	7 (10.93)	1 (5.88)	8 (9.87)
A9A9	19 (29.68)	3 (17.64)	22 (27.16)

En pacientes con LIEBG y LIEAG infectadas por VPH-18 y -58 no se encontró

ningún genotipo o tendencia significativa. **Tabla 10** y **Tabla 11**

**Tabla 10.** Frecuencias de los genotipos de MICA en pacientes infectadas con VPH-18

<b>Microsatélite</b>	<b>Pacientes VPH-18 LIEBG n=6 (%)</b>	<b>Pacientes VPH-18 LIEAG n=8 (%)</b>	<b>P / VPH-18 LIEBG + LIEAG n=14 (%)</b>
A4A4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A5	0 (0.0)	1 (12.5)	1 (7.14)
A4A5.1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A6	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A9	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A5A5	0 (0.0)	1 (12.5)	1 (7.14)
A5A5.1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A5A6	1 (16.66)	0 (0.0)	1 (7.14)
A5A9	2 (33.33)	4 (50.0)	6 (42.8)
A5.1A5.1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A5.1A6	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A5.1A9	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A6A6	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A6A9	1 (16.66)	0 (0.0)	1 (7.14)
A9A9	2 (33.33)	2 (25.0)	4 (28.6)

**Tabla 11.** Frecuencias de los genotipos de MICA en pacientes infectadas con VPH-58

<b>Microsatélite</b>	<b>Pacientes VPH-58 LIEBG n=11 (%)</b>	<b>Pacientes VPH-58 LIEAG n=7 (%)</b>	<b>P / VPH-58 LIEBG + LIEAG n=18 (%)</b>
A4A4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A5	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A5.1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A6	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A4A9	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A5A5	1 (9.09)	2 (28.57)	3 (16.66)
A5A5.1	1 (9.09)	0 (0.0)	1 (5.55)
A5A6	0 (0.0)	1 (14.28)	1 (5.55)
A5A9	0 (0.0)	3 (42.85)	6 (33.33)
A5.1A5.1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A5.1A6	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A5.1A9	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
A6A6	1 (9.09)	0 (0.0)	1 (5.55)
A6A9	1 (9.09)	1 (14.28)	2 (11.11)
A9A9	4 (36.36)	0 (0.0)	4 (22.22)

### **6.10 Tipificación del SNP-308 de la región promotora de TNF $\alpha$ por RFLP**

El polimorfismo bialélico -308 de la región promotora de TNF $\alpha$  se clasificó en alelo T1 (G) y alelo T2 (A) después de digerir el producto de PCR con la enzima NcoI (Fermentas, USA).

No se observó ningún resultado significativo con los grupos de lesión o con el grupo total de pacientes (n=50). Sin embargo, se observa la frecuencia alta del alelo T1 y la frecuencia baja del alelo T2 en los cuatro grupos. **Tabla 12**

**Tabla 12.** Frecuencias encontradas para TNF $\alpha$ -308, al comparar el grupo control y los grupos de pacientes con infección por VPH. Límite de confianza 95%.

<b>Alelos TNF<math>\alpha</math> (-308)</b>	<b>Controles n=50 100 (%)</b>	<b>Pacientes LIEBG n=25 50 (%)</b>	<b>Pacientes LIEAG n=25 50 (%)</b>	<b>Pacientes LIEBG + LIEAG n=50 100 (%)</b>
T1 (G)	88 (88.0)	46 (92.0)	42 (84.0)	88 (88.0)
T2 (A)	12 (12.0)	4 (8.0)	8 (16.0)	12 (12.0)

### **6.11 Identificación de los genotipos de la posición SNP-308 de TNF $\alpha$ del grupo control y pacientes.**

El polimorfismo de los genotipos de la posición SNP-308 de TNF $\alpha$  se clasificó en tres categorías: 1) homocigoto T1T1-308 (G/G), 2) heterocigoto T1T2-308 (G/A) y 3) homocigoto T2T2-308 (A/A). La distribución de los genotipos para TNF-308 fue consistente con el equilibrio de H-W. Al comparar las frecuencias de los genotipos entre el grupo control y el grupo de pacientes, tomando en cuenta los diferentes grados de lesión intrauterina, encontramos que el genotipo T1T1 (G/G) es el más frecuente en todos los grupos, observándose una misma frecuencia en el grupo control, pacientes totales y pacientes con LIEAG (68.0%), mientras que para el grupo de pacientes con LIEBG la frecuencia fue de 76.0%. La frecuencia del genotipo T1T2 (G/A) presentó una frecuencia muy similar en todos los grupos oscilando sus valores en 24.0%-30.0%. No se encontraron diferencias significativas. Por último, la frecuencia del genotipo T2T2 (A/A) fue mayor en el grupo de pacientes con LIEAG (8.0%). **Tabla 13**

**Tabla 13.** Frecuencias de genotipos para la posición -308 de TNF $\alpha$ , al comparar el grupo control y el grupo de pacientes tomando en cuenta el grado de lesión.

<b>Grupos de estudio</b>	<b>T1T1 (G/G)</b>	<b>T1T2 (G/A)</b>	<b>T2T2 (A/A)</b>
Controles n= 50 (%)	34 (68.0)	15 (30.0)	1(2.0)
Pacientes/LIEBG n=25(%)	19 (76.0)	6 (24.0)	0 (0.0)
Pacientes/LIEAG n=25(%)	17 (68.0)	6 (24.0)	2 (8.0)
Pacientes n=50 (%)	34(68.0)	14 (28.0)	2 (4.0)

## 7.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que la multiparidad, el número de parejas sexuales, la edad de inicio de relaciones sexuales, la edad de la menarca, el uso de anticonceptivos y el consumo de tabaco son factores de susceptibilidad a desarrollar lesiones neoplásicas cervicales o cáncer *in situ* (Petry *et al.*, 2002; Au, 2004). Al comparar los factores de riesgo evaluados en el estudio entre el grupo de mujeres sanas y las pacientes, encontramos que el número de gestas y partos así como el uso de anticonceptivos orales incrementan el riesgo a desarrollar una neoplasia. Nuestros resultados concuerdan con estudios que reportan un riesgo de 3.24 veces el desarrollo de cáncer cérvico-uterino en mujeres mexicanas con 7 o más gestas (Lazcano-Ponce *et al.*, 1993) y un riesgo de 2.5 veces en pacientes que hacen uso de anticonceptivos orales (Remoue, 2003). Al respecto se ha comprobado que pacientes con NIC (infectadas por VPH) que utilizaban anticonceptivos a base de hormonas presentaron un aumento en la expresión de receptores para estrógenos y progesterona en la zona de transformación, alterando así la respuesta inmunológica del microambiente local a través de la desregulación (producción y secreción) de citocinas y quimiocinas por parte de las proteínas oncogénicas de los VPH de alto riesgo (Schuurs y Verheul, 1990). También encontramos que el hábito de fumar fue muy frecuente en ambos grupos de estudio (75.0% controles y 64.0% pacientes) por lo que se deduce que las mujeres mexicanas aún conociendo el riesgo que implica para la salud, el estilo de vida que lleva en la actualidad la mujer mexicana ha permitido que se convierta en un hábito rutinario. No importando el riesgo para desarrollar CaCu el cual genera un cambio en las secreciones de moco en el tracto urogenital de la mujer, incluyendo el cérvix lo que genera un riesgo a infecciones bacteriales y virales (Helberg y Stendhal, 2005; Matos *et al.*, 2005).

Todas las muestras cervicales de las pacientes que se recolectaron fueron reportadas con una posible infección por VPH en su prueba citológica (PaP) y en el estudio colposcópico (Lanham *et al.*, 2001). Algunas de ellas fueron

confirmadas por Bx y LEC. En nuestro laboratorio se realizó la prueba de PCR-RFLP para conocer el tipo de VPH, sin embargo 14/147 muestras (9.52%) fueron negativas, aunque en su PaP tuvieron una alteración que sugirió posible infección por VPH. Esto lo atribuimos a un error de manipulación en la obtención de la muestra, ya que siempre se tuvo prioridad con la preparación del material biológico para los estudios ginecológicos de cada paciente en la clínica de displasias. Por lo que, al realizarse la colposcopia a las pacientes se utilizaba una solución de ácido acético al 3% para identificar las citoqueratinas presentes en las células cervicales infectadas por VPH; solución que en el *Kit HPVfast 2.0* hace que las reacciones de PCR se inhiban. Otro problema que presentamos durante la recolección de células cervicales con el cepillo ginecológico fue la alta cantidad de sangre y *detritus* celulares que afectó la obtención de DNA en óptima calidad. También creemos que una interpretación errónea hubiera generado un diagnóstico equivocado (Burd, 2003; García *et al.*, 2003).

Se tipificaron 10 diferentes VPH, todos relacionados a infecciones en mucosas. El tipo más frecuente fue el VPH-16 (59.18%), lo que coincide con otros trabajos en mujeres mexicanas que reportan una alta incidencia de este VPH (25.7%-53.0%) (Stoler *et al.*, 1992; González *et al.*, 1995; Muñoz, 2000). El segundo más frecuente fue el VPH-58 (12.9%), que es un VPH considerado también como de alto riesgo y en mujeres de Yucatán tiene una prevalencia de 28.5%, por arriba del VPH-16 (González-Losa *et al.*, 2004). El VPH-18 (9.52%) se ubicó en tercer lugar con una frecuencia menor a la reportada en Asia y Norte de América (Clifford *et al.*, 2005).

Aunque no fue nuestro principal objetivo en este trabajo, se consideraron los resultados obtenidos de los factores de riesgo (ambientales) al desarrollo del CaCu así como la determinación de los tipos de VPH (infecciosos) más frecuentes en el grupo de pacientes de nuestro estudio, con la finalidad de relacionarlos con los polimorfismos de los genes MICA y la posición -308 de la región promotora de TNF $\alpha$ .

Los polimorfismos de los genes se dan por la variación de las secuencias de DNA (sustituciones nucleotídicas, deleciones, inserciones, secuencias palindrómicas y regiones microsatelitales) con una frecuencia relativamente alta entre los individuos de una población. Se ha reportado que la mayoría de las regiones microsatelitales se localizan dentro del MHC (región I 731, región II 494, región III 297) (Tamiya *et al.*, 1998; Tamiya *et al.*, 1999; Matsuzaka *et al.*, 2000; Matsuzaka *et al.*, 2001), algunos de ellos se han asociado con artritis reumatoide (TNFa6), enfermedad de Beçhet (MIB-348), enfermedad celiaca (TNFa y TNFb) y cáncer (colorectal y nasofaríngeo) (D6S211, D6S510, D6S281, TNFa) (Foissac y Cambon-Thomsen, 1998). Con respecto al gen MICA, su región microsatelital se relaciona con enfermedades autoinmunes, infecciosas y cancerosas (*i.e.* Enfermedad de Addison, artritis psoriática, colitis ulcerativa, cáncer de colon, mama, pulmón, ovario y próstata) (Gambelunghe, 1999; Groh *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004), de ahí que en nuestro estudio tratamos de encontrar alguna relación de susceptibilidad o de protección con el desarrollo de NIC. Se encontró que los microsátélites de MICA más frecuentes, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes, fueron A5 (27.53% vs 29.3%) y A9 (48.18% vs 38.4%), por lo que se consideran son los más representativos de la población mexicana. No encontramos ningún microsátélite A7 y A10 en las muestras estudiadas. Esto puede ser por la falta de estos microsátélites en las líneas celulares que nuestro laboratorio tiene, y no pudieron ser incluidos en las *ladders*. Suponemos que entre las 18 muestras con resultados discrepantes y en espera de ser secuenciadas se encuentren estos microsátélites o es posible que existan microsátélites nuevos no reportados.

Cuando se compararon las frecuencias alélicas entre el grupo control y las pacientes por grado de lesión, encontramos que el microsátélite A6 fue poco frecuente en las pacientes con LIEAG (R.M.=0.25, 0.08-0.71,  $p < 0.05$ ) observándose un efecto asociado a protección (Tabla 6). Nosotros suponemos que debido a la baja frecuencia del microsátélite A6 en este grado de lesión, las pacientes con LIEBG y el grupo control que presentaron una frecuencia mayor de

A6 es suficiente para que la molécula de MICA pueda interactuar con su receptor NKG2D/DAP10 y llevar a cabo una respuesta inmune innata que permita generar una correcta señal intracelular con factores de transcripción que estimulen a su vez la producción de citocinas (Whiteside *et al.*, 1998) y no generar la progresión de la lesión intraepitelial.

Se decidió evaluar, si las frecuencias de los microsatélites estudiados aumentaban o disminuían el riesgo de desarrollar lesiones intrauterinas con los tipos de VPH más frecuentes en nuestro estudio. Las pacientes con LIEAG infectadas por VPH-16 (38.23% vs 26.54%) y -58 (57.14% vs 38.88%) se compararon con el grupo total de pacientes infectadas (**Tabla 8**), observándose una tendencia de susceptibilidad con el microsatélite A5, como fue reportado por Ghaderi y colaboradores (1999) en mujeres suecas con lesiones intraepiteliales cervicales e infección por VPH-18. Sin embargo, nuestros resultados estadísticamente no son significativos por el número pequeño de muestras que analizamos. Por otro lado, suponemos que debido a la infección con el VPH (proteína viral) este puede participar en la obstrucción de MICA con las células NK,  $\gamma\delta$  y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, como es el caso de la proteína UL16 (codificada por CMVH) que se une a MICB evitando así una respuesta inmunológica (Welte *et al.*, 2003).

Para conocer si los genotipos de los microsatélites de MICA se segregaban de acuerdo a las leyes de Mendel, se realizó el análisis de H-W. Al realizar el análisis en el grupo control se observó que los microsatélites de MICA se comportaban en equilibrio H-W (forma azarosa). Posteriormente, al analizar la segregación de los microsatélites y los grados de lesión cervical, encontramos que el grupo de pacientes con LIEBG no se comportaba con el equilibrio de H-W ( $p < 0.05$ ). Esto nos sugiere que las primeras alteraciones celulares que ocurren en el cérvix están influidas por la segregación de los genotipos de los microsatélites de MICA. La misma situación se presentó en el análisis de H-W con los microsatélites de MICA y la infección por VPH, donde hallamos que todas las pacientes (LIEBG y LIEAG) infectadas con VPH-16 no heredaban de forma azarosa los microsatélites de

MICA. Lo que nos hace suponer que el VPH-16 (los componentes del virus) influye en la segregación de ciertos microsatélites de MICA que le favorezcan en la progresión de su infección en la célula epitelial cervical (evasión inmunológica).

También se estudio el polimorfismo de la posición -308 de TNF $\alpha$  y saber si generaba una susceptibilidad o protección con el desarrollo de lesiones intraepiteliales en las pacientes, ya que se ha asociado este SNP con infecciones por VPH-16 en mujeres con NICs del norte de Suecia (Ghaderi *et al.*, 2000; Ghaderi *et al.*, 2001). En nuestros resultados encontramos que tanto el grupo control como el grupo de pacientes (LIEBG y LIEAG), el polimorfismo T1 (G) fue igual de frecuente en ambos grupos (88.0%); por lo que al generarse una respuesta inmunológica creemos que la citocina TNF $\alpha$  no está influyendo en la progresión de lesiones intraepiteliales cervicales. Esta misma distribución de frecuencias para T1 la reportó Kirkpatrick y colaboradores (2004) en pacientes suecas con displasias cervicales.

Por último, quisimos conocer si la segregación de los alelos de la posición -308 de TNF $\alpha$  se comportaban en equilibrio H-W y encontramos que los alelos de la región -308 de TNF $\alpha$  se segregaban de acuerdo a las leyes de Mendel (forma azarosa). Sin embargo, consideramos que nuestros resultados no permiten saber con certeza, si el SNP-308 de TNF $\alpha$  presenta una susceptibilidad o protección en pacientes mestizas mexicanas con algún grado de neoplasia intraepitelial cervical e infectadas por VPH, debido al número de muestras que se analizaron (25 muestras LIEBG y 25 muestras LIEAG). Por lo que, sugerimos que en futuros estudios el número de muestras se incremente para poder especificar si la posición -308 de la región promotora de TNF $\alpha$  está implicada en la protección o riesgo al desarrollo de lesiones precursoras al CaCu.

## 8.0 CONCLUSIONES

1. Los microsatélites A5 y A9 fueron los más frecuentes en la población de estudio (controles y pacientes).
2. El microsatélite A6 se asocia con un efecto de protección en pacientes con LIEAG.
3. No se asocio ningún genotipo de los microsatélites de MICA, con una protección o riesgo en pacientes con lesiones precursoras al cáncer cérvico uterino.
4. El polimorfismo T1 (G), fue el más frecuente en la población de estudio y no se encontró relación con las infecciones por VPH y el desarrollo de lesiones neoplásicas.
5. No hubo asociación de los genotipos de la posición -308 de TNF $\alpha$  con la susceptibilidad a desarrollar infecciones por VPH o lesiones intraepiteliales precursoras de CaCu.

## 9.0 BIBLIOGRAFÍA

- Alburquerque, VR. Hayden, MC. Palmer, JL. Laing, Al. Rye, JP. Gibson, AN, Burton, RP Goldblatt, J. Lesouéf, NP. 1998. *Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma*. Clin and Exp Allergy 28:578-584.
- Alonso de Ruiz, P., Lazcano Ponce, E.C., Hernández, Ávila, M. 2000. *Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, Prevención y Control*. Ed. Médica Panamericana. Cap.16 pag. 187-201.
- Argüello, JR., Little, AM., Pay, AL., Gallardo, D., Rojas, I., Marsh, SG., Goldman, JM., Madrigal, JA. 1998. *Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis*. Nat Genet 18:192.
- Arias-Pulido, H., Joste N., Wheeler, CM. 2004. *Loss of heterozigosity on chromosome 6 in HPV-16 positive cervical carcinomas carrying the DRB\*1501-DQB1\*0602 haplotype*. Genes Chromosomes Cancer 40(4):277-84.
- Au, WW. 2004. *Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer*. Toxicology 198:117-120.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Stinle, A., Phillips, JH., Lanier, LL., Spies, T. 1999. *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science 285:727-9.
- Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, DE, Spies, T. 1994. *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes*. Proc Natl Acad Sci. USA 91:6259-63.
- Bahram S., Mizuki, N., Inoko, H., Spies t. 1996. *Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene*. Immunog 44:80-1.
- Bahram, S. 2001. *MIC genes: from genetics to biology*. Adv Immunol 76:1-60.
- Bednarczuk, T. Hiromatsu, Y. Seki, N. Ploski, R. Fukutani, T. Kurytowicz, A. Jazdzewski, K. Chojnowski, K. Itoh, K. Nauman, J. 2004. *Association of Tumor Necrosis Factor and Human Leukocyte Antigen DRB1 Alleles with Grave's ophthalmopathy*. Hum Immunol 65:632-639.
- Berek, S.J. 2003. *Simplification of the New Bethesda 2001 Classification System*. Am J Obstet Gynecol 188:S2-5.
- Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A. 2001. *Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study*. J Natl Cancer Inst. Sep 5;93(17):1325-30.
- Beutler, B. 1992. *Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine*. Raven Press, New York.
- Braun, N., Michel, U., Ernst, BP., Metzner, R., Bitsch, A., Weber, F., Rieckmann, P. 1996. *Gene polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and it's influence on the regulation of TNF-alpha production*. Neurosci Lett 215:75-78.

- Brinkman, BM., Keet, IP., Miedema, F., Verweij, CL., Klein, MR. 1997. *Polymorphism within the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human immunodeficiency virus type-1 seropositive persons.* J Infect Dis 175(1):188-90.
- Burd, M.E. 2003. *Human Papillomavirus and Cervical Cancer.* Clin Microbiol Reviews. Jan, Vol. 16 No. 1: 1-17.
- Chan PK, Chan MY, Li WW, Chan DP, Cheung JL, Cheng AF. 2001. *Association of human beta-herpesviruses with the development of cervical cancer: bystanders or cofactors.* J Clin Pathol. Jan;54(1):48-53.
- Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Murmu N, Jana S. 2001. *Prevalence of human papillomavirus infection among prostitutes in Calcutta.* J Environ Pathol Toxicol. Oncol 20(2):113-7.
- Cheng, L. Zhang, SZ. Xiao, CY. Hou, YP, Li, L. Luo, HC. Jiang, HY, Zuo, WQ. 2000. *The A5.1 allele of the major histocompatibility complex class I chain-related gene A is associated with psoriasis vulgaris in Chinese.* Br J Dermatol 143(2):324-9.
- Clifford, G.M., Rana, R.K., Francheschi, S., Smith, J.S., Gough, G., Pimenta, J.M. 2005. *Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer.* Can Epidemiol Biomar Prev. 14(5):1157-64.
- Choi, HB. Han, H., Youn, JI. Kim, TY, Kim, TG. 2000. *MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population.* Tissue Antigens 56(6):548-50.
- Cosman, D., J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, N. J. Chalupny. 2001. *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor.* Immunity 14:123.
- Cortinas, C. 1998. *Cáncer. Herencia y Ambiente.* La Ciencia/96 para todos. pp. 1-24.
- Dao DD., Sierra-Torres CH., Robazetti SC., de Gomez MN., Konig R., Lema, C., Lester LJ., Au, WW, Tying SK. 2005. *HLA-DQB1 and cervical cancer in Venezuelan women.* Gynecol Oncol 96(2):349-54.
- Dehaghani, AS., Amirzargar, A., Farjadian, S., Ghaderi, A. 2002. *HLA-DQB1 alleles and susceptibility to cervical squamous cell carcinoma in Southern Iranian patients.* Pathol Oncol Res 8(1):58-61.
- DeVita, T.V., Hellman, S., Rosenberg, A.S. 1993. *Cancer: Principles & Practice of Oncology.* 4<sup>th</sup> edition. Vol 1. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. pp. 1168-1181.
- Davidson, E.J., Kitchener, HC., Stern, PL. 2002. *The Use of Vaccines in the Prevention and Treatment of Cervical Cancer.* Clin Oncol 14:193-200.
- Díaz-Flores, E.F., Martínez-Barona, S.J.A., Pérez, C.A., y Hernández, C.C. 2000. *Estudio de la prevalencia de los subtipos del virus del papiloma humano mediante el análisis de fragmentos de restricción por la reacción en cadena de la polimerasa.* Quím Clín. 19 (3): 195-198.
- Eck, MJ., y Sprang, SR. 1989. *The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6. A resolution Implications for receptor binding.* J. Biol Chem 264:17595-17605.

- Ferrera, A., Olivo, A., Alaez, C., Melchers, W.J., Gorodezky, C. 1999. *HLA DQA1 and DQB1 loci in Honduran women with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma and their relationship to human papillomavirus infection.* Hum Biol 71(3):367-79.
- Flores-Luna L, Salazar-Martinez E, Escudero-De los Rios P, Gonzalez-Lira G, Zamora-Munoz S, Lazcano-Ponce E. 2001. *Prognostic factors related to cervical cancer survival in Mexican women.* Int J Gynecol Obstet 75(1):33-42.
- Fodil, N., Laloux, L., Wanner, V., Pellet P., Hauptmann, G., Mizuki, N., Inoko, H., Spies T., Theodorou I., Bahram, S. 1996. *Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene.* Immunog 49:557-60.
- Foissac, A., Cambon-Thomsen, A. 1998. *Microsatellites in the HLA region: 1998 update.* Review Tissue Antigens 52:318-352.
- Fowler, NL. y Frazer, IH. 2004. *Mutations in TAP genes are common in cervical carcinomas.* Gynecol Oncol Mar,92(3):914-21.
- Ghaderi, M., Hjelmsström, Hallmans, G., Wiklund, F., Lenner, P., Dillner, J., Sanjeevi, C.B. 1999. *MICA Gene Polymorphism and the Risk to Develop Cervical Intraepithelial Neoplasia.* Hum Immunol 60:970-973.
- Ghaderi, M., Nikitina, L. Peacock, SC. Hjelmsström, p, Hallmans G. Wiklund, F. Lenner, P. Blackwell, MJ. Dillner, J. Sanjeevi, BC. 2000. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -11 and DR15-DQ6 (B\*0602) Haplotype Increase the Risk for Cervical Intraepithelial Neoplasia in Human Papillomavirus 16 Seropositive Women in Northern Sweden.* Can Epidemiol, Biomarkers & Prevention. 9:1067-1070.
- Gadheri, M. Zake, NL. Wallin, LK. Wiklund, F. Hallmans, G. Lenner, P. Dillner, J. Sanjeevi, BC. 2001. *Tumor Necrosis Factor A and MHC Class I Chain Related Gene A (MIC-A) Polymorphisms in Swedish Patients with Cervical Cancer.* Hum Immunol 72:1153-1158.
- Gambelunghe, G. Falomi, A. Ghaderi, M. Laureti, S. Tortoioli, C. Santeusano, F. Brunetti, P. Sanjeevi, BC.1999. *Microsatellite polymorphism of the MHC Class I Chain-Related (MICA and MICB) Genes Marks the Risk for Autoimmune Addison's Disease.* J Clin Endocrinol & Metabolism. 84(19):3701-3707.
- García, F., Méndez de Galaz, E., Baldwin, S., Papenfuss, M., Giuliano, A.R., Hatch, K., Davis, J. 2003. *Factors that affect the quality of cytologic cervical cancer screening along the Mexico-United States border.* 189:467-72.
- González, R.I., Nazabal, M., Claro, L.A., Peralta, A., Méndez del Castillo, D. y Cruz, C.M.E.1995. *Presencia de Papiloma Virus Humano en Lesiones Genitales.* Bioquímica 2 XX (79):266-270.
- Gonzalez, S. Martinez-Borra, J. Lopez-Vazquez, A. Garcia-Fernandez, S. Torre-Alonso, JC. Lopez-Larrea, C. 2002. *MICA rather than MICB, TNFA, or HLA-DRB1 is associated with susceptibility to psoriatic arthritis.* J Rheumatol 29(5):973-8.
- González-Losa, MR. Rosado-Lopez, I. Valdez-Gonzalez, N. Puerto-Solis, M. 2004. *High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients.* J Clin Virol 29:202-205.

- Gostout, BS., Poland, GA., Calhoun, ES., Sohni, YR., Giuntoli, RL 2nd., McGovern RM., Sloan, JA., Cha SS., Persing, DH. 2003. *TAP1, TAP2, and HLA-DR2 alleles are predictors of cervical cancer risk.* Gynecol Oncol Mar;88(3):326-32.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., Spies, T. 1996. *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium.* Proc Natl Acad Sci USA 93:12445-50.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., Spies, T. 1998. *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial  $\gamma\delta$  T cells.* Science 279:1737-40.
- Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R Riddell, and T. Spies. 2001. *Costimulation of CD8 $\alpha$ beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.* Nat Immunol. 2: 255.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T. 2002. *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation.* Nature 419:734-738.
- Grubic, Z. Ćroc, Eeewl-Jelicic, E. Zunnec, R. Stingl, K. Crukovic, B. Kerhin-Brkljajic, V. 2004. *The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic arthritis in the Croatian population.* Eur J Immunogenet 31(2):93-8.
- Hamann, A., Mantzoros, C., Vidal-Puig, A., Flier, JS. 1995. *Genetic variability in the TNF- $\alpha$  promoter is not associated with type II diabetes mellitus (NIDDM).* Biochem Biophys Res Commun 211:833-839.
- Hajeer, AH., y Hutchinson, IV. 2000. *TNF- $\alpha$  Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications.* Micros Res and Techn 50:216-228.
- Helberg, D., Stendhal, U. 2005. *The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer.* Antican Res 25(4):3041-6.
- Helland A., Borrensen AL., Kaern J., et al. 1994. *HLA antigens and cervical carcinoma.* Nature 356:23.
- Hermann, DM., Mulington, J., Hinze-Selch, D., Schreiber, W., Galanos, C., Pollmacher, T. 1998. *Endotoxin-induced changes in sleep and sleepiness during the day.* Psychoneuroend 2:427-437.
- Hirv, K. Seyfarth, M. Uibo, R. Kull, K. Salupere, R. Latza, U. Rink, I. 1999. *Polymorphisms in Tumour Necrosis Factor and Adhesion Molecule Genes in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Associations with HLA-DR and -DQ Alleles and Subclinical Markers.* Scand J Gastroenterol 34:1025-1032.
- Ho, G.Y., Burk, R.D., Klein, S., Kadish, A.S. Chang, C.J., Palan, P., Bacu, J., Tachezy, R., Lewis, R., Romney, S. 1995. *Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia.* J. Natl. Cancer. Inst. 87(18):1365-1371.
- Huang, Y. Lee, YJ. Chen MR. Hsu, CH. Lin, SP, Sung, TC. Chang, SC. Chang JG. 2000. *Polymorphism of transmembrane region of MICA gene and Kawasaki disease.* Exp Clin Immunol 17(3):130-7.

- Huizinga, TW., Westendorp, RG., Bollen, EL., Keijsers, V., Brinkman, BM, Langermans, JA, Bredweld, FC., Verweij, CK, van de Gaer, L., Dams, L., Crusius, JB., Garcia-González, A., van Oosten, BW, Polman, CH., Pena, AS. 1997. *TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients.* J Neuroimmunol 72:149-153.
- Idriss, H.T. y Naismith, JH. 2000. *TNF $\alpha$  and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s).* Micros Res and Tec 50:184-195.
- INEGI, 2004. Sección de mortalidad y morbilidad en la población.
- Juárez-Figueroa LA, Wheeler CM, Uribe-Salas FJ, Conde-Glez CJ, Zampilpa-Mejia LG, Garcia-Cisneros S, Hernandez-Avila M. 2001. *Human papillomavirus: a highly prevalent sexually transmitted disease agent among female sex workers from Mexico City.* Sex Transm Dis. Mar;28(3):125-30.
- Kandil, E., Noguchi, M., Ishibashi, T., Kasahara, M. 1995. *Structural and phylogenetic analysis of the MHC class I like Fc receptor gene.* J Immunol 154(11):5907-18.
- Kirkpatrick, A. Bidwell, J. van den Brule, AJC. Meijer, CJLM. Pawade, J. Glew, S. 2004. *TNF $\alpha$  polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia.* Gynecol Oncol 94:675-679.
- Khoo, SH., Pepper, L., Snowden, N., Hajeer, AH., Vallely, P., Wilkings, EG., Mandal, BK., Ollier, WE. 1997. *Tumor necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression.* AIDS 11(4):423:8.
- Knight, JC., Udalova, I., Hill, AV., Greenwood, BM, Peshu, N., Marsh, K., Kwiatkowski, D. 1999. *A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria.* Nat Genet 22:145-150.
- Koenig, UD., Muller, N., Schrieweis, KE. 1976. *Herpes simplex type 2 antibodies and HLA B12 in cervical cancer.* Lancet II:857.
- Krul, EJT., Schipper, RF., Schreuder, GM., Fleuren, GJ., Kenter, GG., Melief, CJM. 1999. *HLA and Susceptibility to Cervical Neoplasia.* Hum Immunol 60:337-342.
- Lanham S, Herbert A, Basarab A, Watt P. 2001. *Detection of cervical infections in colposcopy clinic patients.* J Clin Microbiol. Aug;39(8):2946-50.
- Lazcano-Ponce E.C., Rojas-Martínez, R., López-Acuña MP., López-Carrillo L., Hernández-Ávila, M. 1993. *Reproductive risk factors and uterine cervix cancer in Mexico City.* Sal Púb Mex 35:65-73.
- Lazcano-Ponce E., Herero R., Muñoz, N., Cruz, A., Shah, KV, Alonso, P., Hernández P., Salmerón, J., Hernández, M. 2001. *Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology.* Int J Cancer. 91(3):412-20.
- Li, P. et al. 1999. *Cristal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a  $\gamma\delta$  T cell ligand.* Immun 10:577-584.
- Lio, D. Caruso, C. Di Stefano, R. Colonna R.G. Ferraro, D. Scola, L. Crivello, A. Licata, A. Valenza, ML. Candore, G. Craxí, A. Almasio, LP. 2003. *IL-10 and TNF- $\alpha$  Polymorphisms and the Recovery From HCV Infection.* Hum Immunol 64, 674-680.

- Lo, FS. Lee, YJ. Huang, CY. Lin, CH. Chang, SC. Dang, CW. Liu, HF. 2003. *Polymorphism in the transmembrane region of the major histocompatibility complex class I chain-related gene A: association of five GCT repetitions with Graves' disease in children.* *Tryroid* 13(9):839-43.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, SL., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2002. *Biología Celular y Molecular.* 4ta edición. Ed. Médica Panamericana. pp. 1055-1063
- Loke, H. Bethell, D. Day, N. White, NJ, Hill AVS. 1996. *A TNF promoter variant, HLA and dengue in Vietnam.* *Hum Immunol* 47:680.
- Mak, T. W., y D. A. Ferrick. 1998. The gamma-delta T-cell bridge: linking innate and acquired immunity. *Nat Med* 4:764.
- Marsh, S.G.E., Packer, R., Heyes, J.M., Bolton, B., Fauchet, R., Charron, D., Bodmer, J.G. 1997. *The 12<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop cell lines panel. In: Genetic diversity of HLA functional and medical implication (ed. D. Charron).* Vol. 1, p.26. EDK, Medical and Scientific International Publisher, Paris, France.
- Marsh, HP. Haldar, NA. Bunce, M. Marshall, SE. le Monier, K. Winsey, SL. Christodoulos, K. Cranston, D. Welsh, KI. Harris AL. 2003. *Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation.* *British J Can* 89:1096-1101.
- Matos, A., Mouthino, J., Pinto, D., Mendeiros, R. 2005. *The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a southern European population.* *Eur J Can Prev.* 14(5):485-91.
- Matthews DE y V Farewell. 1985. *Using and understanding medical statistics.* S Karger. New York. p39.
- Matsuzaka, Y., Makino, S., Nakajima, K. et al. 2000. *New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class II region.* *Tissue Antigens* 56:492-500.
- Matsuzaka, Y., Makino, S., Nakajima, K., Tomizawa, M., Oka, A., Bahram, S., Kuiski, J.K., Tamiya, G., Inoko, H. 2001. *New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region.* *Tissue Antigens* 57:397-404.
- Mäurer, M. Kruse, N. Gless, R. Kyrillalis, K. Toyka, VK. Rieckmann, P. 1999. *Gene polymorphism at position -308 of the tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter is not associated with disease progression in multiple sclerosis patients.* *J Neurol* 246:949-954.
- Miller SA, KK Dykes and HF Plesky. 1988. *A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell.* *Nucleic Acid Res.* 16:1215.
- Mira, JP., Cariou, A., Grall, F., Deklaux, C., Losser, MR., Heshmati, F., Cheval, C., Monchi, M., Teboul, JL., Riche, F., Lelau, G., Arbibe, L., Mignon, A., Delpech, M., Dhainaut, JF. 1999. *Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study (see comments).* *JAMA* 282:561-568.
- Muñoz, N. 2000. *Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence.* *J Clin Virol* 19(1-2):1-5.

- Muzuki, N., Masao, O. Minoru, K., Sigeaki, O., Hitoshi, A., Yoshihiko, K., Masaaki, Y., Koji, W., Kaori, G., Satoshi, N. Seiamak, B., Hidetoshi, I. 1997. *Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1298-1303.
- Oerke, S., Hohn, H., Zehbe, I., Pilch, H., Schicketanz KH., Hitzler WE., Neukirch, C., Freitag, K., Maeurer, MJ. 2005. *Naturally processed and HLA-B8- presented HPV 16 E7 epitope recognized by T cell from patients with cervical cancer*. Int J Can 114(5):766-78.
- Odunsi, KO., y Ganesan, TS. 1997. *The Roles of the Human Major Histocompatibility Complex and Human Papillomavirus Infection in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer*. Clin Oncol 9:4-13.
- Pérez-Rodríguez, M. Argüello, R., Fisher, G., Correl, A., Cox, S.T., Robinson, J., Hossain, E., McWhinnie, A., Travers, P.J., Marsh, S.G.E., Madrigal, J.A. 2002. *Further polymorphism of the MICA gene*. Eur J Immunogenet 29(1):35-46.
- Petry, U.K. Böhmer, G. Iftner, T., Davies, P. Brummer, O., Kühnle, H. 2002. *Factors associated with an increased risk of prevalent and incident grade III cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer among women with Papanicolaou tests classified as grades I or II cervical intraepithelial neoplasia*. Am J Obstet Gynecol 186:28-34.
- Pociot, F., Briant, L., Jongeneel, CV., Molvin, J., Worsaae, H., Abbal, M., Thomsen, M., Nerup, J., Cambon-Thomsen, A. 1993. *Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus*. Eur J Immunol 23:224-231.
- Polendnak, P.A. 1993. *Estimating Cervical Cancer Incidence in the Hispanic Population of Connecticut by Use of Surnames*. Cancer 71:3560-4
- Pontén, J., Adami, O.H., Bergstrom, R., Dilliner, J., Friberg, G.L., Gustafsson, L., Miller, B.A., Parkin, m.D., Sparén, P. y Trichopoulos, D. 1995. *Strategies for Global Control of Cervical Cancer*. Int. J. Cancer 60:1-26.
- Remoue, F. Jacobs, N. Miot, V. Boniver, J. Delvenne, P. 2003. *High intraepithelial expression of estrogen and progesterone receptors in the transformation zone of the uterine cervix*. Am J Obstet Gynecol, 189:1660-5
- Rueda, B. Pascual, M. Lopez-Nevot, MA. Gonzalez, E, Martin, J. 2002. *A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats*. Tissue Antigens 60(6):526-8.
- Salud Pública de México 2004. *Estadísticas de mortalidad relacionada con la salud reproductiva. México, 2002*. Vol. 46, Núm.1 enero-febrero
- Sacca, R. Turley, S. Soon, L. et al. 1997. *Transgenic expression of lymphotoxin restores lymph nodes to lymphotoxin- $\alpha$ -deficient mice*. J. Immunol 159:4252-4260.
- Schuurs, AH. y Verheul, HA. 1990. *Effects of gender and sex steroids on the immune response*. J. Steroid Biochem 35:157-72.
- Sham, Pak. 1998. *Statics in Human Genetics*. Arnold. Chapter 2 pp.39.
- Silva, B., Vargas, AG. Zuñiga, RJ, Rodríguez, RTS. Hernández, MB. Osnaya, N. Kofman,

S. Torres, LA. Granados, J. 1999. *Genetic Features of Mexican Women Predisposing to Cancer of the Uterine Cervix*. Hum Pathol 30:626-628.

- Singal, DP, Li, J., Zhang, G. 2001. *Microsatellite polymorphism of the MICA gene and susceptibility to rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol Jul-Aug 19(4):451-2.
- Somoskövi, A. Zissel, G, Seitzer, U. Gerdes, J. Schlaak, M. Quernheim, M.J. 1999. *Polymorphisms at position -308 in the promoter region of the TNF- $\alpha$  and in the first intron of the TNF- $\beta$  genes and spontaneous and lipopolysaccharide induced TNF- $\alpha$  release in Sarcoidosis*. Cytokine Vo. 11 No. 11: 882-887.
- Steven Piver. 2000. *Oncologia Ginecológica*. 2da edición. Ed. Marban. Pp.85-92
- Stephens, HA. Vaughan, RW. Collins, R. Kondeatis, E. Theron, J. Payne. A. 1999. *Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA encoded by polymorphism in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes*. Tissue Antigens. 53(2):167-74.
- Stoler MH., Rhodes CR, Whitbeck A., Wolinsky SM., Chow LT., Broker TR. 1992. *Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias*. Hum Pathol 23:117-128.
- Sugimura, K., Ota M. Matsuzawa, J. Katsuyama, Y. Ishizuka, K. Mochizuki, T. Mizuki, N. Seki, SS., Honma, T. Inoko, H. Asakura, H. 2001. *A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis*. Tissue Antigens 57(1):9-14.
- Svejgaard, A y Ryder, L.P. 1994. *HLA and disease associations: detecting the strongest association*. Tissue Antigens Jan;43(1):18-27.
- Takasugi, M., Terasaki, PI, Henderson, B., et al. 1973. *Histocompatibility antigens in solid tumours*. Cancer Res. 33:648-50.
- Tamiya, G., Ota, M., Katsuyama, Y. et al. 1998. *Twenty-six new polymorphic microsatellite markers around the HLA-B, -C, and -E loci in human MHC class I region*. Tissue Antigens 51:337-46.
- Tamiya, G., Shiina, T., Oka, A. et al. 1999. *New polymorphic microsatellite markers in human MHC class I region*. Tissue Antigens 54:221-8.
- Tarpley, JL., Chretien PB., Rogentine, N., et al. 1975. *Histocompatibility antigens and solid malignant neoplasma*. Arch Surg 110:269-71.
- Tingxi, Y., Matthew, J.F., Tak Hong, C., Tong, KHC., Yick, FW., Smith D.I. 2005. *The role of viral integration in the development of cervical cancer*. Can Genet and Cytogen 158:27-34.
- Tonon, AS. Picconi, AM. Zinovich, BJ. Nardari, W. Mampaey, M. Badano, I. Di Lello, F. Galuppo, JA. Alonio, VL. Teysse, RA. 2004. *Human papillomavirus cervical infection in Guarani Indians from the rainforest of Misiones, Argentina*. Int J Infect Dis. 8, 13-19.
- Touitou, I. Picot, MC. Domingo, C., Notarnicola, C. Cattani, D. Demaille, J. Kone-Paut, I. 2001. *The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever*. Arthr Rheum. 44(1):163-9.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- Udalova, IA., Nedospasov, SA., Webb, GC., Chaplin, DD., Turestskaya, RL. 1993. *Highly Informative Typing of the Human TNF Locus Using Six Adjacent Polymorphic Markes*. Genomics 16, 180-186.
- Vandenvelde, C., deFoor, M, vanBeer D. 1993. *HLA DQB1\*03 and cervical intraepithelial neoplasia grades I-III*. Lancet 341:442-4.
- Wallace, RG. Verity, HD. Delamaire, JL. Ohno, S. Inoki, H. Ota, M. Mizuki, N. Yabuki, K. Kondiatis, E. Sthephens AFH. Madanat, W. Kanawati, AC. Stanford, RM. Vaghan, VR. 1999. *MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behçet's disease*. Immunoge 49: 613-617.
- Wank, R., Menten Jt, Luande J., et al. 1992. *Cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, and nsk for patients with HLA-DQB1\*0602, \*0301, \*0303 alleles*. Lancet 341:1215.
- Wank, R., schendel, DJ., Thomssen, C. 1993. *HLA antigens and cervical carcinoma*. Nature 356:22-23.
- Welte, S.A., Sinzger, G., Lutz, S.Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K.L., Eknigk, U., Rammensee, H.G., Steinle, A. 2003. *Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein*. Eur J Immunol 33:194-203.
- Wilson AG., di Giovine FS., Blakemore AIF, y Duff GW. 1993. *Single base polymorphism in the human Tumour Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) gene detectable by NcoI restriction of PCR product*. Hum Mol Gen Vol.1(5):353.
- Whiteside, L.T., Friberg, D. 1998. *Natural Killer Cells and Natural Killer Cell Activity in Chronic Fatigue Syndrome*. Am J Med 105(3A):27S-34S.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies T., Lanier, L.L., Phillips, J.H. 1999. *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10*. Science 285:730-732.
- Wu, D.J., Higgins, M.L., Steinle, A., Cosman, D., Haugk, K., Plymate, R.S. 2004. *Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer*. J Clin Invest 114(4):560-568.
- Zwimer NB., Fernández-Viña, MA., Stastny, P. 1998. *MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells and monocytes*. Immunog 47:139-48.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ EN EL LABORATORIO DE HLA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA CMN SXXI, IMSS A CARGO DEL DR. ROBERTO R. KRETSCHMER SCHMID, EN COLABORACIÓN CON LA CLÍNICA DE DISPLASIAS DEL HOSPITAL GENERAL DE ZONA 1-A "VENADOS" Y LA UNIDAD DE MEDICINA PREVENTIVA DEL HOSPITAL GENERAL DE ZONA NO. 32, AMBAS ENTIDADES DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.