



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Análisis del Polimorfismo del Gen MICB en
Lesiones Intraepiteliales Escamosas de
Cérvix.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

EYERAHI BRAVO FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

ASESOR:

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo fue realizado
en el Laboratorio de Histocompatibilidad de la Unidad de
Investigación Médica en Inmunología del Hospital de
Pediatria CMN-SXXI,
bajo la Dirección de la Dra. en Ciencias
Martha Esthela Pérez Rodríguez
y la Asesoría de la Dra. en Ciencias
Sandra Díaz Barriga Arceo
de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

El presente trabajo recibió los siguientes apoyos:

Fondo para el Fomento de la Investigación (FOFOI) IMSS
2005/1/I/016

Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad
Social CONACYT No. 14019.

DEDICATORIA

Durante los años de elaboración de este trabajo dos hechos absolutamente opuestos marcaron mi existencia; experimente el dolor de la pérdida de un ser querido y recibí la dicha de generar una nueva vida; por esto dedico mi más grande logro

A **DIOS**, por ser el gran arquitecto de mi vida y concederme todas las maravillas que tengo en ella.

A **MIS PADRES Macrina y Valentin**, por sus sabios consejos y apoyo infinito e incondicional, sin importar lo que pase.

A **MIS HERMANAS Cynthia y Saayra**, por su comprensión durante mis largas ausencias y poco acertadas dediciones.

A **MIS DOS AMORES Javier y Valentina**, por ser los pilares de mi vida, la fuente de inspiración y el motivo para continuar superándome.

Y a ese **ANGEL**, que desde el cielo ilumina mi vida.

Pues cada uno de ellos ha sido un peldaño que me permitió llegar a la cumbre y conquistar todas mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento

A la **Dra. Martha Estela Pérez Rodríguez** bajo cuya dirección he realizado este trabajo, por su entrega en mi preparación y haber depositado en mí su confianza.

A mis hermanos del alma **Dr. Oswaldo Partida Rodríguez** y **Dra. Miriam Enriqueta Nieves Ramírez** por su apoyo incondicional y los consejos brindados siempre en el momento oportuno.

A **Clemente Angeles, Guillermina Martínez** y sus hijos **Clemente, María Esther, Claudia** y **Rosa**, por su apoyo en los momentos difíciles y acogerme como un miembro más de su familia.

A la **Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional “Siglo XXI” del Instituto Mexicano del Seguro Social**, por recibirme en su laboratorio dandome las facilidades para realizar la parte experimental de este trabajo.

A todos los **integrantes del laboratorio de la UIMI**, por su gran compañerismo.

A mis amigos de la FES-C: **Aida, Alinne, Ana Rosa, Anabel, Ariana, Beatriz, Daniel, Katy, Marisol, Paty** y **Rosario**, por estar conmigo en las situaciones difíciles y compartir los mejores momentos de mi juventud.

A los sinodales del jurado por su valiosa contribución a mi trabajo.

- **Dr. Marco Antonio Vega López**
- **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**
- **Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira**
- **MC. Ana Laura Vázquez Martínez**
- **MC. Maritere Domínguez Rojas**

A la **UNAM** que me dio tanto por tan poco, pero especialmente a la **FES-Cuautitlán** ya que es la forjadora de excelentes profesionales.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE	9
2. RESUMEN	10
3. MARCO TEÓRICO	
3.1. LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE CÉRVIX	
3.1.1. Características de las Lesiones Intraepiteliales Escamosas.....	11
3.2. CANCER CÉRVICO UTERINO	
3.2.1. Definición de Cáncer Cérvico Uterino (CaCu).....	11
3.2.2. Evolución Natural.....	12
3.2.3. Sistemas de Clasificación.....	14
3.2.4. Epidemiología.....	16
3.2.5. Factores de riesgo.....	18
3.2.6. Virus del Papiloma Humano.....	19
3.2.7. Susceptibilidad genética e inmunológica.....	21
3.3. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)	
3.3.1. Localización del MHC.....	22
3.3.2. Organización y estructura génica del MHC.....	22
3.3.3. Propiedades del MHC.....	24
3.3.4. Estructura molecular de las proteínas del MHC.....	24
3.3.5. Función de las moléculas del MHC.....	26
3.4. GENES MIC	26
3.4.1. Diferencias entre MICA y MICB.....	30
3.5. IMPORTANCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL MHC	34
3.6. IMPORTANCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE GENES MIC	35
3.6.1. Asociación de polimorfismos en el gen <i>MICB</i> con diferentes enfermedades.....	36
3.6.2. Asociación de polimorfismos de genes <i>HLA</i> y <i>MIC</i> con CaCu y sus lesiones precuroras.....	37
4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
5. HIPÓTESIS	41
6. OBJETIVOS	
6.1. Objetivo general	42

7. Objetivos particulares.....	42
8. METODOLOGÍA	
8.1. Población de estudio.....	43
8.2. Toma de muestra.....	43
8.3. Extracción, cuantificación y electroforesis de DNA.....	43
8.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	43
8.5. Técnica de SSOP.....	44
8.6. Análisis estadístico.....	44
9. RESULTADOS.....	45
10. DISCUSIÓN.....	54
11. CONCLUSIONES.....	58
12. BIBLIOGRAFÍA.....	59
13. APÉNDICES	
13.1. Apéndice A: Detalles técnicos.....	71
13.2. Apéndice B: Fundamento de SSOP.....	77

1. ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

A	Adenina
AGC	Células Glandulares Atípicas
AGUS	Células glandulares de significado indeterminado
AIS	Adenocarcinoma endocervical <i>in situ</i>
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ASC-H	Células escamosas atípicas en las que no se puede excluir una LIEAG
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
C	Citosina
CaCu	Cáncer Cérvico Uterino
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CIS	Cáncer <i>in situ</i>
cM	Centimorgans
CMVH	Citomegalovirus Humano
CSPD	Disodico 3-4-metoxispiro (1,2-dioxetano-3,2'-5'-cloro) triciclo (3,3,1,1 ^{3,7} decano-4-1-fenil fosfato)
DNA	Acido desoxirribonucleico.
G	Guanina
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HSP	Proteínas de Choque Térmico
IFN- γ	Interferón Gama
kD	Kilodaltons
LIEAG	Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado
LIEGB	Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MIC	Gen relacionado con la cadena de clase I del MHC
MICA	Gen A relacionado con la cadena de clase I del MHC
MICB	Gen B relacionado con la cadena de clase I del MHC
mRNA	Acido Ribonucleico mensajero
NIC	Neoplasia Cervical Intraepitelial
NK	Célula Natural Killer
NKG2D	Receptor del grupo 2D de la célula Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SNP	Polimorfismos de un solo Nucleótido
SSOP	Sondas de Oligonucleótido de Secuencia Específica
T	Timina
TCR	Receptor de la célula T
UEC	Unión Escamo-Columnar
VPH	Virus del Papiloma Humano
β 2-m	Beta 2-microglobulina

2. RESUMEN

En México el Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por neoplasias entre las mujeres mayores de 25 años, lo cual representa un problema de salud que afecta a las mujeres en edad reproductiva. Se ha encontrado que el desarrollo CaCu o lesiones precursoras esta asociado con la infección por VPH; así como con la genética del hospedero, la cual influye en la respuesta inmune tras condicionar a aquellos que están en riesgo para evolucionar a carcinoma invasor. El gen *MICB* esta involucrado en la respuesta inmunológica innata del hospedero y presenta asociación con diferentes tipos de cánceres epiteliales; por tal motivo el objetivo de este trabajo fue la tipificación del gen *MICB* en un grupo de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas en cérvix y mujeres sanas de la Ciudad de México, para identificar una posible asociación de la frecuencia alélica y/o genotípica con este padecimiento; ya que la caracterización mediante un análisis genético de los genes involucrados en el desarrollo de esta enfermedad constituye un instrumento poderoso para revelar las vías que están involucradas en su predisposición o progresión. La *n* estimada para cada uno de los grupos de estudio fue de 50 participantes; el grupo control estuvo conformado por 211 mujeres sanas negativas al Papanicolaou, mientras el grupo de pacientes contó con 195 mujeres positivas a VPH organizadas por clasificación de Bethesda con 62 para LIEAG y 133 para LIEBG. Se genotipificó a cada uno de ellos mediante la técnica de PCR–SSOP utilizando un amplificado del exón 2 al 5 y 47 sondas de oligonucleótidos diferentes. Las frecuencias genotípicas de nuestros grupos de estudio se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas y genotípicas no muestran asociación con el desarrollo de Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Cérvix ni con ninguno de sus grados obteniendo valores de $p > 0.05$, tras realizar el análisis estadístico mediante *p* exacta de Fisher con corrección de Bonferroni. La combinación alélica 00502/*010 no pudo ser diferenciada debido a que la variante se encuentra dentro del exón 6 que no se amplificó, ésta fué la más frecuente tanto en el grupo control (65.9%) como en el de pacientes (70.5%). Se encontraron nuevas variantes intrónicas en los alelos *00201 y *00401 en ambos grupos las cuales se identificaron por cambios en el patrón de hibridación de las sondas de oligonucleótidos, originando la posibilidad de nuevas variantes alélicas dentro de la población de estudio.

3. MARCO TEÓRICO

1.1 LESIONES INTRAEPITELIALES ESCAMOSAS DE CÉRVIX

1.1.1 Características de las Lesiones Intraepiteliales Escamosas

Con la última clasificación de Bethesda en el año 2001 se originó el concepto de lesiones intraepiteliales escamosas; las cuales se dividen en: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG) designadas por una infección productiva con gran formación de viriones complejos, presentados en las células superficiales con signos de coilocitosis; y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) que son las neoplasias invasoras, donde el DNA viral se encuentra habitualmente integrado en el DNA celular y a la histología todo el epitelio esta formado por células inmaduras de tipo basal. **(Solomon *et al.*, 2004)**. En las LIEBG (LSIL = *low-grade squamous intraepithelial lesions*) quedan incluidas las infecciones por papilomavirus humano y la displasia leve o NIC I mientras en las LIEAG (HSIL = *high-grade squamous intraepithelial lesions*) quedan agrupadas las displasias moderada o NIC II y severa o NIC III **(Broso *et al.*, 1993)**. Asimismo las LIEBG se caracterizan por su alto índice de regresión espontánea mientras las LIEAG por presentar la posibilidad de progresión a cáncer invasor **(Kurman *et al.*, 1994, Solomon *et al.*, 2002)**.

1.2 CÁNCER CÉRVICO UTERINO

1.2.1 Definición de Cáncer Cérvico Uterino

El cáncer es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por un crecimiento no controlado, dismedido y desordenado de células que puede afectar a casi cualquier tejido del cuerpo humano **(Farfán-Muñoz *et al.*, 2004, Rojas-Hernández, 2006)**. Esta enfermedad multifacética altera el mecanismo de replicación de una célula, e invade y coloniza territorios que normalmente están reservados para otras células **(Lodish *et al.*, 2002)**.

Existen diversos tipos de cáncer que se clasifican de acuerdo con el tejido y tipo celular de origen. Así, el cáncer que se desarrolla en las células de tejido glandular se denomina adenocarcinoma **(Cortinas, 1998)**, aquel que se produce en tejido conjuntivo o células musculares y vasculatura es llamado sarcoma, también se encuentran las diversas formas de

leucemia y linfomas derivadas de células hematopoyéticas y tejido linfoide, el cáncer originado en el sistema nervioso y el ojo es conocido como glioma y retinoblastoma; y por último el que se genera en las células epiteliales es un carcinoma (**Alberts et al., 1996**), como es el caso del Cáncer Cérvico Uterino (CaCu).

El CaCu se caracteriza por el crecimiento anormal y diseminado de células del epitelio cervical multilaminar que al desarrollarse en forma incontrolada, avanza entre los tejidos normales y los destruye, alterándose así el funcionamiento del organismo (**Alberts et al., 1996, Steven, 2000**).

1.2.2 Evolución natural del Cáncer Cérvico Uterino

La evolución natural de esta enfermedad implica la progresión gradual por etapas de acuerdo a la proporción del grosor del epitelio cervical comprometido (**Richart, 1990**).

Normalmente en el epitelio del cuello uterino la proliferación se produce solo en la capa basal, generando células que entonces se desplazan hacia la superficie exterior, diferenciándose a lo largo de este desplazamiento en células aplanadas ricas en queratina, que no se dividen y que finalmente se descaman de la superficie (**Alberts et al., 1996**). Sin embargo, cuando se presenta una infección persistente y crónica por uno o más de los tipos oncogénicos de papilomavirus humano, este tiende a causar lesiones en un área conocida como unión escamo-columnar (UEC) o zona de transformación; área donde el epitelio escamoso estratificado no queratinizado del exocérvix contacta y gradualmente es sustituido por epitelio columnar del endocérvix, desarrollando la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grados I-III (**Steven, 2000**). La evolución a cáncer invasor, a partir de la lesión inicial, puede durar de 10 a 20 años y no todas las mujeres que presentan las lesiones precursoras desarrollan la forma invasora de esta enfermedad (**Kiviat, 1996, Cortinas, 1998**) **Fig. 1**.

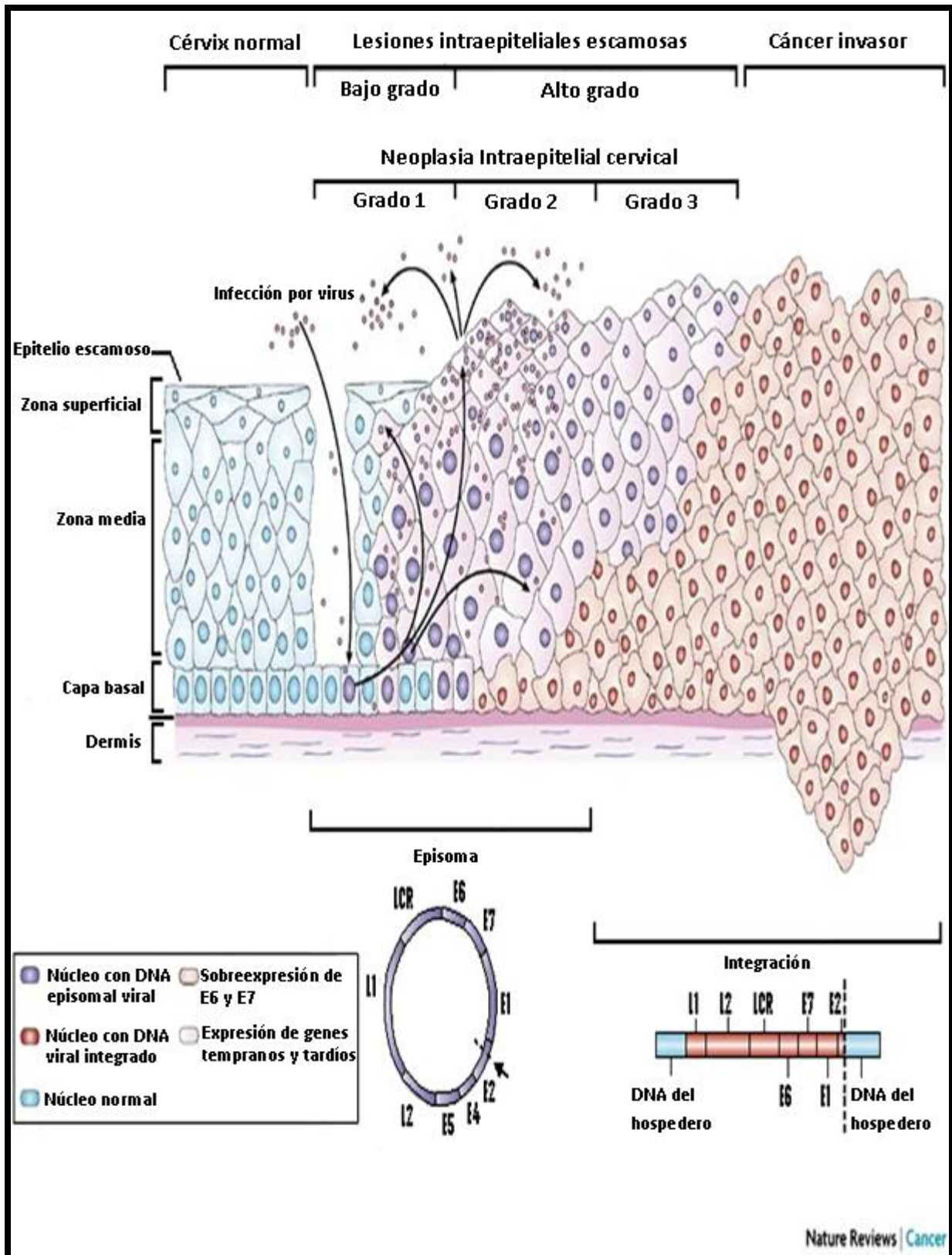


Fig. 1. Historia Natural del Cáncer Cérvico Uterino, su progresión a partir de la infección por VPH hasta Cáncer Invasor (Modificado de Woodman *et al.*, 2007).

Las lesiones premalignas más leves son las NIC I, que consisten en la presencia de células anormales en una tercera parte del epitelio, conservando las otras dos su arquitectura normal. El siguiente cambio; NIC II, consiste en la aparición de células anormales en dos terceras partes del epitelio, presentando diferenciación persistente pero anormal hacia las capas de células espinosas y queratinizadas. A medida que la enfermedad avanza, hay una pérdida progresiva de la diferenciación que afecta a más capas del epitelio, hasta que éste queda sustituido totalmente por células anormales, que no muestran ninguna diferenciación en su superficie; esta lesión pertenece a NIC III o el llamado cáncer *in situ* (CIS); donde las células anormales todavía están confinadas en el lado epitelial de la lamina basal (**Coppleson *et al.*, 1993**). Cuando las células neoplásicas del epitelio cervical logran invadir el estroma hasta la profundidad máxima de 3 mm bajo la base del epitelio y no hay datos de invasión del espacio vascular linfático se le llama cáncer cérvico uterino microinvasor, pero si la profundidad excede de 3 mm o hay invasión del espacio linfático vascular, la lesión se considera como cáncer cérvico uterino invasor (**Depriest *et al.*, 1990**); donde las células se escapan del epitelio cruzando la lamina basal y empiezan a invadir el tejido conjuntivo subyacente con la habilidad de entrar al torrente sanguíneo o en vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo (**Alberts *et al.*, 1996**).

1.2.3 Sistemas de Clasificación del Cáncer Cérvico Uterino

Existen muchos sistemas en el mundo para clasificar y denominar las lesiones precursoras del Cáncer Cérvico Uterino tomando como base la citología y la histología (**López-Cruz *et al.*, 2006**). Las clasificaciones conocidas han evolucionado desde que George N. Papanicolaou en 1954 diseñó el primer sistema de notificación, hasta el actual Sistema de Bethesda 2001 (**Waxman, 2005**) **Cuadro 1.**

Cuadro 1. Evolución en orden cronológico de los Sistemas de Clasificación de las Lesiones Precursoras al Cáncer Cérvico Uterino (Solomon *et al.*, 2002).

CLASIFICACIÓN DE LESIONES PRECURSORAS DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO					
Sistema Papanicolaou	Sistema Descriptivo	Sistema NIC	Sistema Bethesda		
George N. Papanicolaou	James. W. Reagan / OMS	Ralph. M. Richart	United States National Cancer Institute		
1954	1953/1968	1978	1988	1991	2001
Clase I (Benigno)	Negativo a células malignas	Normal	Dentro de límites normales	Dentro de límites normales	Negativo para lesión intraepitelial
Clase II (Atípia metaplasia/displasia)	Atípia inflamatoria	Atípia coilocítica, condilomaplano sin cambios epiteliales	Cambios reactivos	Cambios celulares benignos	Anomalías de células epiteliales
	Atípia escamosa		ASCUS	ASCUS a favor de cambios reactivos ASCUS a favor de LIEBG	ASC-US ASC-H
	Atípia coilocítica		LIEBG	LIEBG	LIEBG
Clase III (Sugestivo para malignidad)	Displasia leve	NIC I	LIEBG	LIEBG	LIEBG
	Displasia moderada	NIC II	LIEAG	LIEAG	LIEAG
	Displasia severa	NIC III			
Clase IV (Positivo a malignidad)	Carcinoma <i>in-situ</i>				
Clase V (Positivo para invasor)	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor
				AGUS	AGC AIS Adenocarcinoma

*La clasificación citológica utilizada en el cribado hace uso del Sistema Papanicolaou y Bethesda mientras la clasificación histológica utilizada en el diagnóstico recurre al Sistema Descriptivo y NIC.

1.2.4 Epidemiología del Cáncer Cérvico Uterino

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en el 2007. Las incidencias de mortalidad más frecuentes en las mujeres son por cáncer de mama, pulmón, estómago, colon-recto y cuello uterino (OMS, 2009). El Cáncer Cérvico Uterino es la segunda neoplasia ginecológica más frecuente a nivel mundial entre todas las neoplasias malignas que afectan a las mujeres, con diferencias en la incidencia y prevalencia de acuerdo con el nivel de desarrollo de los países (Parkin *et al.*, 2005). En el 2005, se registraron más de 500 000 nuevos casos de CaCu, de los cuales 90% correspondía a países en desarrollo, alrededor de 260 000 mujeres fallecieron de la enfermedad y cerca del 95% de esas defunciones ocurrieron dentro de países en desarrollo. La incidencia y mortalidad a causa de dicho cáncer difiere considerablemente entre países desarrollados y en vías de desarrollo (OMS, 2007); siendo mayor en estos últimos donde los programas de detección precoz no han sido exitosos (Berek, 2000), debido a las diferencias en el acceso a los servicios y calidad de los mismos, la ubicación geográfica, la situación socioeconómica y la educación, así como aspectos culturales y psicosociales (Lewis, 2004).

Las mayores tasas de incidencia de CaCu normalizadas por edad se han encontrado en América Central y América del Sur, África Oriental, Asia Meridional y Sudoriental y Melanesia, afectando raramente a las mujeres menores de 30 años y siendo más frecuente en las mujeres de más de 40 años edad. (OMS, 2007) Fig. 2.

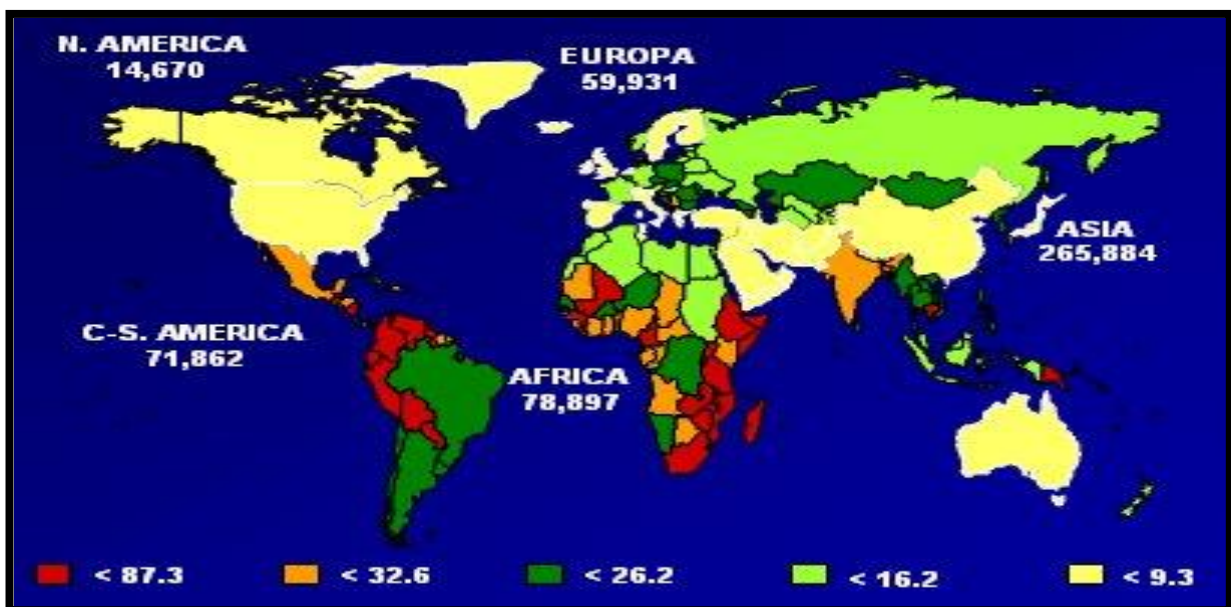


Fig.2. Número estimado de casos de Cáncer Cérvico-Uterino por Región. Tasa de incidencia ajustada por edad de cada 100,000 mujeres por año. (OMS, 2007).

En la Región de las Américas, se pronosticaron 92 136 casos y 37 640 defunciones por CaCu, de las cuales 83.9% correspondía a América Latina y un 81.2% al Caribe respectivamente; presentando estas dos zonas algunas de las tasas de incidencia y mortalidad por este tipo de cáncer más altas del mundo, sólo superadas por las de África Oriental y Melanesia (Lewis, 2004). De los países Latinoamericanos en México, para el 2007, el cáncer representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35 303 defunciones (15.4%); siendo el cáncer de mama (13.8%), de cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%) los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos en las mujeres, determinándose que el CaCu fue la segunda causa de muerte por neoplasias entre las mujeres mayores de 25 años durante este año (INEGI, 2009).

La mortalidad del CaCu en México muestra gran heterogeneidad en diferentes regiones del país, donde la región Central, tiene la tasa de mortalidad más baja y el riesgo más bajo de muerte por cáncer cérvico uterino, mientras que la región del sur tiene la tasa y el riesgo de mortalidad más altos (Illades-Aguilar, 2008). Durante el año 2000, el 61% de las defunciones por cáncer cérvico uterino ocurrieron en 10 entidades federativas del país: Estado de México, Veracruz, Distrito Federal, Jalisco, Puebla, Oaxaca, Michoacán, Guanajuato, Chiapas y Guerrero. Sin embargo, los estados con mayores tasas de mortalidad por cada 100 000 mujeres de 25 años y mayores fueron: Nayarit, Morelos, Yucatán, Chiapas, Campeche, Veracruz, Michoacán, Guerrero y San Luís Potosí, con cifras superiores a 22 defunciones por cada 100,000 mujeres de 25 años y más (Frenk-Mora *et al.*, 2002) Fig. 3.

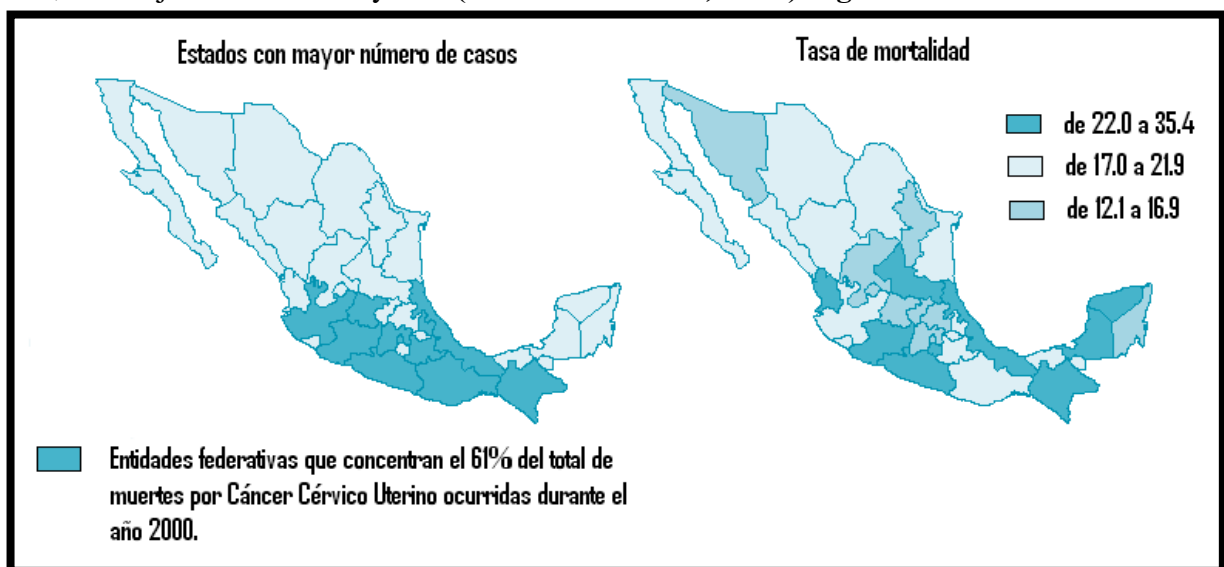


Fig. 3. Mortalidad por Cáncer Cérvico Uterino en México durante el año 2000 (Frenk-Mora *et al.*, 2002).

1.2.5 Factores de riesgo para el Cáncer Cérvico Uterino

Los factores que pudieran influir en el riesgo de la progresión a LIEAG son: factores gineco-obstétricos, socioeconómico-demográficos, relacionados con la salud, factores virales y del hospedero.

Entre los factores gineco-obstétricos de riesgo para contraer cáncer cérvico uterino están: edad temprana al primer embarazo, multiparidad, nunca haberse realizado un estudio citológico, abortos y anticoncepción hormonal (**Kjellberg *et al.*, 2000, Tamayo, 2002**); porque la zona de transformación del exocérvix es más grande durante la pubertad, el embarazo, los traumatismos cervicales en el momento del parto y en mujeres que han tomado anticonceptivos orales durante largo tiempo. Esto puede aumentar la exposición al VPH y facilitar la infección (**OMS, 2007**); promoviendo la integración del DNA viral al genoma del hospedero y estimular la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 involucrados en la carcinogénesis (**Castellsague *et al.*, 2003**).

Los factores de riesgo relacionados con las condiciones socioeconómico-demográficas son: la edad; ya que la mayoría de las mujeres se infectan poco después del inicio de la actividad sexual con mayor prevalencia en mujeres mayores de 25 años (**Castañeda-Iñiguez, 1998**) y el nivel socioeconómico bajo que está asociado con ingresos económicos precarios y analfabetismo, además de acceso limitado a los servicios de salud, ocasionando ausencia de antecedentes de citología vaginal (**Tamayo, 2002**).

También están los factores asociados a la salud como el estado nutricional deficiente en folatos, carotenoides, retinoides y vitaminas A, C y E (**Castañeda-Iñiguez, 1998, Walboomers *et al.*, 1999, Berek *et al.*, 2000,**) el tabaquismo (**Kjellberg *et al.*, 2000, Franco *et al.*, 2001**) ya que se ha demostrado que los productos de desecho y metabolitos carcinógenos del cigarrillo (entre otros la nicotina y la cotidina) se encuentran en las secreciones cérvico vaginales y éstas sustancias pueden dañar directamente el DNA de las células cervicales (**Castellsague *et al.*, 2003**), inhibiendo la presentación de antígenos por parte de las células de Langerhans, evitando posiblemente el reconocimiento del VPH por el sistema inmune (**Berek *et al.*, 2000**), las infecciones de transmisión sexual concomitantes y

persistentes (**Walboomers et al., 1999, Berek et al., 2000, Smith et al., 2002**) debido a la producción de radicales libres y el desarrollo de la inestabilidad genética (**Smith et al., 2002**) y la inmunosupresión (**Berek et al., 2000, Alliance for Cervical Cáncer Prevention, 2004**) por presentar una mayor susceptibilidad de contraer los tipos de VPH altamente oncogénicos así como lesiones precursoras de manera más rápida (**De Sanjose et al., 2002, Clarke et al., 2002, Gaffikin et al., 2003**).

Aun cuando se ha comprobado que la infección por tipos de VPH oncogénicos es el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer cérvico uterino, se ha demostrado que la infección persistente es también una causa necesaria, pero no la única suficiente para que las lesiones precursoras evolucionen a cáncer (**Walboomers, et al., 1999, Wick, 2000**). Otros factores relacionados con el comportamiento sexual que incluyen: inicio de vida sexual activa a edad temprana (heterosexual), número de parejas sexuales, la cervicitis, antecedentes de infecciones de transmisión sexual y relaciones con parejas sexuales promiscuas se les considera en la probabilidad de contraer el VPH, pero no como factores para la evolución de la infección por VPH a cáncer (**Alliance for Cervical Cancer Prevention, 2004, OMS, 2007**). Así mismo; algunos factores del hospedero que pueden actuar influyendo en la inmunidad, como la genética, están íntimamente relacionados (**Magnusson et al., 1999, Kjellberg et al., 2000**); ya que distintos polimorfismos en los genes de HLA (**Franco et al., 2001**), específicamente algunos haplotipos, se han relacionado con susceptibilidad o resistencia a las infecciones virales (**Gostout et al., 1996, Magnusson et al., 1999, Fowler et al., 2004**) y una mayor facilidad para la progresión de NIC a cáncer (**Gostout et al., 1996, Fowler et al., 2004, Lerma et al., 2005**).

1.2.5.1 Virus del Papiloma Humano y Cáncer Cérvico Uterino

Los papilomavirus son un género de virus agrupados, por su tumorigenicidad y la homología de su secuencia de DNA, que afectan a vertebrados (**Jensen, 1990, Schiffman, 1995**). Estos son virus epitelio-trópicos (**zur Hansen, 1996**) que tienen su propia predilección de tejido y espectro de enfermedad (**Schiffman, 1995**), mostrando cada tipo un tropismo particular por sitios anatómicos específicos; siendo comunes en las infecciones de piel y mucosas del tracto oral, respiratorio y anogenital (**Jensen, 1990**).

Actualmente casi 100 tipos de VPH han sido descritos en seres humanos (**Muñoz, 2003, de Villiers, 2004, Torres, 2004**) y se han identificado más de 50 tipos diferentes que infectan los tractos anales y genitales principalmente. Los VPH genitales son clasificados de acuerdo con su potencial de producir transformación maligna (**Muñoz, 2003**). En el 2005 se llegó a la conclusión de que los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 son cancerígenos para los seres humanos y han sido clasificados como de alto riesgo o tipos oncogénicos (**Cogliano, 2005**). Aunque algunos autores consideran que es arbitrario clasificar al VPH 66 como cancerígeno y proponen que este papilomavirus así como los tipos 26, 53, 68, 73 y 82 deben ser considerados probablemente cancerígenos. Los VPH 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89 están clasificados como tipos de bajo riesgo, mientras para los VPH 2a, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90, 91 el riesgo de cáncer cervical es indeterminado (**Muñoz, 2006**); mientras el VPH 55 fue reclasificado como un subtipo de VPH 44 y es considerado como de bajo riesgo (**Calleja-Macías, 2005**).

Los tipos más frecuentes que causan cáncer son el 16 y el 18; los cuales se encuentran aproximadamente en el 70% de todos los cánceres cérvico uterinos comunicados. Otros tipos oncógenos (por ejemplo, el 31, el 33, el 45 y el 58) son menos frecuentes y su prevalencia puede variar según la zona geográfica, mientras los tipos de VPH de bajo riesgo 6 y 11 no se asocian con cáncer, pero causan verrugas genitales (**OMS, 2007**).

Los virus del papiloma humano infectan células epiteliales escamosas de sitios epiteliales y mucosos a través de dos moléculas de la familia de las integrinas $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$ que fueron identificadas como los receptores del VPH, las cuales están expresadas en la superficie de las células basales (**Evander et al., 1997**). El genoma del VPH se encuentra como episoma en el núcleo de células infectadas de cérvix normal; sin embargo, en algunas LIEBG y en la mayoría de las LIEAG de cuello uterino, incluyendo el cáncer, el genoma del VPH se ha encontrado integrado en el genoma de hospedero (**Lehn, 1988**). Durante la integración del DNA de VPH se produce la pérdida de los genes tempranos E1 y E2 útiles para la replicación viral extracromosomal; la pérdida de E2 resulta en la expresión incontrolada e incrementada de las oncoproteínas E6 y E7, cuya función es la inmortalización y transformación celular (**Doobar, 1991, Jeon, 1995**). Esto resulta en la transformación maligna de las células

hospederas y la formación del tumor, ya que estas proteínas interactúan con las proteínas celulares p53 y pRB, provocando su degradación y el desajuste del ciclo celular **(Scheffner, 1990, Boyer, 1996)**; pues están involucradas en su control, la apoptosis y la inestabilidad genómica **(Fan, 2004)**, que parece ser particularmente importante para el establecimiento y el desarrollo de un tumor invasor **(Nishimura *et al.*, 2000)**.

1.2.5.2 Susceptibilidad genética e inmunológica al Cáncer Cérvico Uterino

Las diferencias genéticas del hospedero influyen en la respuesta inmunitaria y podrían condicionar a aquellos que están en riesgo para la evolución al carcinoma invasor, pues se ha demostrado que la susceptibilidad genética juega un papel importante en el desarrollo de muchos cánceres humanos **(Chaudhuri *et al.*, 2000)**.

En los últimos años, algunos *loci* polimórficos dentro y fuera de la región del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) se ha identificado que pueden influir en el resultado de procesos infecciosos por VPH y su progresión a cáncer cérvico uterino **(Maciag *et al.*, 1999, Kwiatkowski, 2000a, Hill, 2001)**. El polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) en estos *loci* modifica la respuesta inmune a agentes infecciosos alterando el balance de las respuestas inmunes celular y humoral **(Maciag, 1999, Kwiatkowski, 2000b, Hill, 2001)**. Así la influencia de un polimorfismo del MHC en una correcta o defectuosa presentación antigénica, se relaciona con la posible susceptibilidad o resistencia a infección por VPH y el desarrollo de enfermedades neoplásicas como el CaCu **(Marinic *et al.*, 2000)**; pues cambios en la expresión de estas moléculas, tanto en la célula neoplásica como en los componentes celulares de la respuesta inmune pueden alterar el reconocimiento de los antígenos tumorales **(Bateman *et al.*, 1999, Koopman *et al.*, 1999, Gudmundsdottir *et al.*, 2000)**.

Pero existen algunos mecanismos que pueden actuar para reconocer, suprimir, y/o eliminar células tumorales. Uno de los mecanismos clave en la inmunidad adaptativa involucra el reconocimiento del complejo MHC/péptido por células T, donde las células tumorales que expresan productos de oncogenes mutados pueden ser eliminadas *in vivo* por células T CD8⁺ específicas para tumor que reconocen estos complejos. Sin embargo, algunas células tumorales pueden librarse de la detección y sobrevivir cuando los productos del gen mutado en

cuestión no son presentados como complejo MHC / péptido (Wu *et al.*, 2003b). Por otro lado la respuesta inmune innata detecta a una gran variedad de células anormales con transformación celular, infección y estrés, específicamente en aquellos casos en que la expresión de moléculas del MHC clase I se ha perdido o ha disminuido su regulación, donde las células NK pueden reconocer y matar células que sobreexpresaron los ligandos de NKG2D (Wu *et al.*, 2003b).

Evidentemente estos dos mecanismos inmunológicos son complementarios y trabajan en diferentes etapas de la interacción del hospedero con el tumor, proveyendo la protección *in vivo* contra la persistencia de diferentes clases de células tumorales (Nakachi *et al.*, 2004).

1.3 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

1.3.1 Localización del MHC

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) es una densa región de genes que se encuentra en distintas especies (Kelley *et al.*, 2005). En humanos está localizado sobre el brazo corto del cromosoma 6 en la porción distal de la banda 6p21.31 (Guillaudoux *et al.*, 1998, Shiina *et al.*, 1999a, Stewart *et al.*, 2004, Kelley *et al.*, 2005, Traherne *et al.*, 2006), éste es un segmento de DNA que mide exactamente 3.6 Mb (Okamoto *et al.*, 2003, Kelley *et al.*, 2005), aproximadamente 4 centimorgans (cM) de DNA (Janeway *et al.*, 2003).

1.3.2 Organización y estructura génica del MHC

La organización de los genes del MHC en ratones y humanos es similar; están divididos en tres grandes regiones (en orden de Centrómero a telómero): clase II (1 Mb), clase III (1 Mb), y clase I (2 Mb) (Guillaudoux *et al.*, 1998, Shiina *et al.*, 1999a, Okamoto *et al.*, 2003, Kelley *et al.*, 2005), incluyendo regiones de clase I y clase II extendidas (Kelley *et al.*, 2005).

La región de clase II contiene genes que codifican moléculas de clase II (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ), dos genes inmunológicos: el que codifica subunidades del proteosoma (LMP-2 y LMP-7) y el de los transportadores TAP (TAP-1 Y TAP-2) que están asociados con moléculas

de clase I clásicas. La región de clase II extendida contiene principalmente genes no inmunes (HLA-DM y HLA-DO), con la excepción del gen TAPBP, que codifica la tapasina, una molécula chaperona asociada con la presentación de antígeno de clase I. La región de clase III tiene una densa selección de diversos genes inmunes y no inmunes (Kelley *et al.*, 2005); que incluyen genes que codifican componentes del complemento C4 (C4A y C4B), C2 y factor B (Bf), así como genes que codifican citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) y las linfoquinas (LTA y LTB); también se encuentra el gen que codifica la 21- hidroxilasa (CYP 21B) enzima que interviene en la síntesis de esteroides, el pseudogen CYP 21Ps (Janeway *et al.*, 2003), el gen del citocromo P-450 y algunos genes de proteínas de choque térmico (HSP) (Abbas *et al.*, 2005). La región de clase I telomérica se extiende desde MICB hasta HLA-F y se sabe que contiene seis genes HLA de clase I expresados: tres clásicos (HLA-A, HLA-B, y HLA-Cw) (Guillaudeux *et al.*, 1998, Shiina *et al.*, 1999a, Kelley *et al.*, 2005), y cuatro no clásicos (HLA-E, HLA-F, HLA-G y HLA-H), además de presentarse dos genes relacionados con la cadena de clase I (MICA y MICB) (Shiina *et al.*, 1999a). Esta región también abarca 12 pseudogenes HLA de clase I, truncados o fragmentados (HLA-X, -17, -30, -Ly92, -Jy59, -80, -21, -Ky70, -16, -Hy54, -90 y -75) (Shiina *et al.*, 1999a) y cinco pseudogenes relacionados con la cadena de clase I (MICC a MICG) (González *et al.*, 2003) Fig. 4.

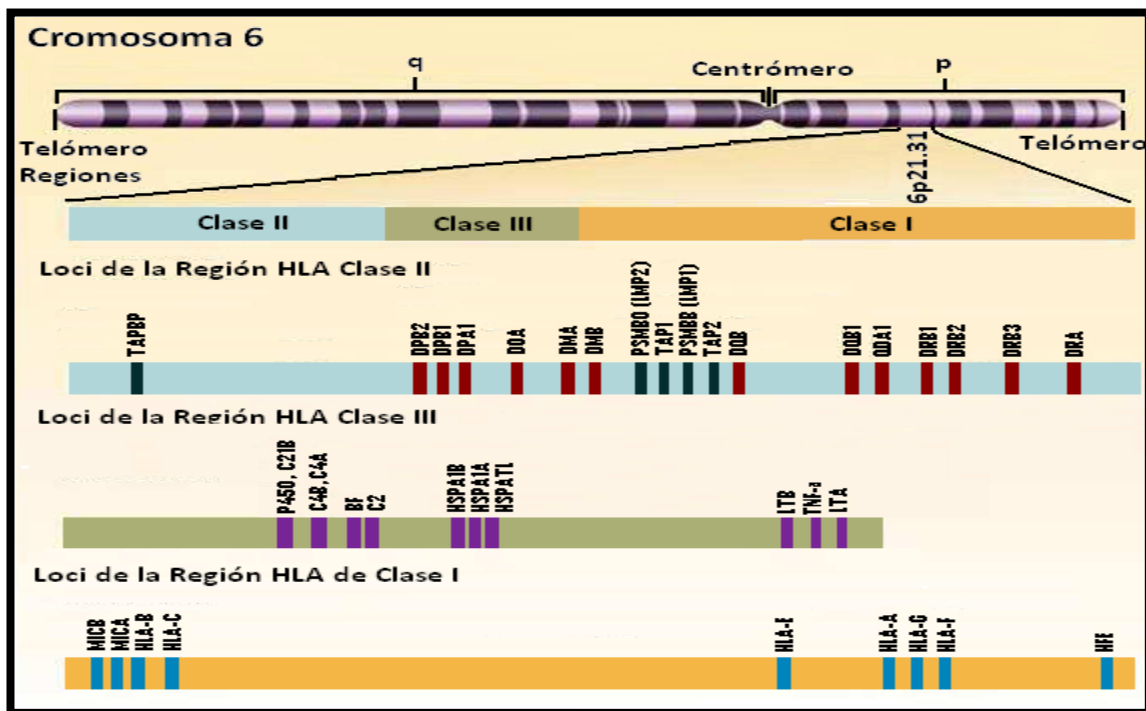


Fig. 4. Localización, organización y estructura génica del Complejo Principal de Histocompatibilidad humano sobre el cromosoma 6 (Modificado de Klein, *et al.*, 2000).

1.3.3 Propiedades del MHC

Dos propiedades del MHC hacen difícil que los agentes patógenos escapen a la respuesta inmunitaria. El MHC es poligénico, existen diversos genes MHC de clase I y II, de manera que cada individuo posee un grupo de moléculas MHC con diferentes espectros de especificidad de unión. Cada persona expresa por lo menos tres tipos de moléculas presentadoras de antígeno MHC de clase I y tres o cuatro moléculas MHC de clase II en sus células. Además el MHC es altamente polimórfico, pues existen múltiples variantes de cada gen en toda la población (**Janeway *et al.*, 2003**), es decir un número extraordinariamente grande de alelos (formas alternativas de un gen) en cada locus, cada uno de los cuales se presenta en una frecuencia relativamente alta en la población (**Alberts *et al.*, 1996**).

La combinación de poligenia y polimorfismo, amplía el abanico de péptidos que pueden presentarse a las células T en cada individuo y en cada población de riesgo ante un agente patógeno infeccioso (**Janeway *et al.*, 2003**).

1.3.4 Estructura molecular de las proteínas del MHC

Las proteínas MHC pueden subdividirse en dos grupos principales: las moléculas MHC de clase I y clase II, ambas presentan estructuras muy similares pues son heterodímeros transmembranales cuyos dominios extracelulares amino terminales se unen al antígeno para su presentación a las células T (**Janeway *et al.*, 2003**).

Las moléculas MHC de clase I se expresan prácticamente en todas las células nucleadas, posiblemente debido a que las células T citotóxicas deben ser capaces de concentrarse en cualquier célula del cuerpo que haya sido infectada por un microorganismo intracelular (**Thompson *et al.*, 1994**). La molécula HLA de clase I está compuesta de una cadena pesada glicosilada de 45 kD (denominada α) que está dividida en tres dominios extracelulares globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ cada uno con no más de 90 aminoácidos de largo), una región transmembranal y una cola citoplasmática, codificados cada uno por exones diferentes. Todas las cadenas α están asociadas de forma no covalente a una pequeña proteína extracelular no glicosilada denominada $\beta 2$ -microglobulina de 12 kD no polimórfica que no atraviesa la membrana y está codificada por un gen que no pertenece al grupo de genes MHC (**Marsh *et***

al., 2000), localizado dentro del cromosoma 15 (Janeway *et al.*, 2003). Los dos dominios amino terminales de la cadena α , ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) que son los más alejados de la membrana, se unen al antígeno de 8 a 10 residuos de aminoácidos y contienen los aminoácidos polimórficos que son reconocidos por las células T mientras el dominio carboxilo esta formado por la cola citoplasmática (Roitt *et al.*, 2000).

Las moléculas MHC de clase II se hallan restringidas a células especializadas como células B, macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (APC), que extraen los antígenos del líquido extracelular e interactúan con las células T CD4⁺ colaboradoras (Thompson *et al.*, 1994). Las moléculas HLA de clase II son heterodímeros compuestos por dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente, una cadena α de 299 aa (32-34 kD) que es ligeramente mas grande que la cadena β de 237 aa (29-32 kD) debido a su mayor glicosilación. Ambas atraviesan la membrana, cada cadena posee dos dominios globulares extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$) con sus respectivos extremos amino terminal y carboxilo terminal intracelular. Las dos son codificadas por diferentes genes del MHC, y ambas son polimórficas (la β más que la α) principalmente en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$; mientras los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ son dos dominios conservados que se hallan próximos a la membrana. (Abbas *et al.*, 2001). Las moléculas MHC de clase II poseen una estructura tridimensional muy parecida a la de las moléculas de clase I, pero su surco de unión al antígeno aloja péptidos mucho mas largos y heterogéneos, alcanzando un tamaño de 15 a 24 residuos de aminoácidos (Roitt *et al.*, 2000) Fig. 5.

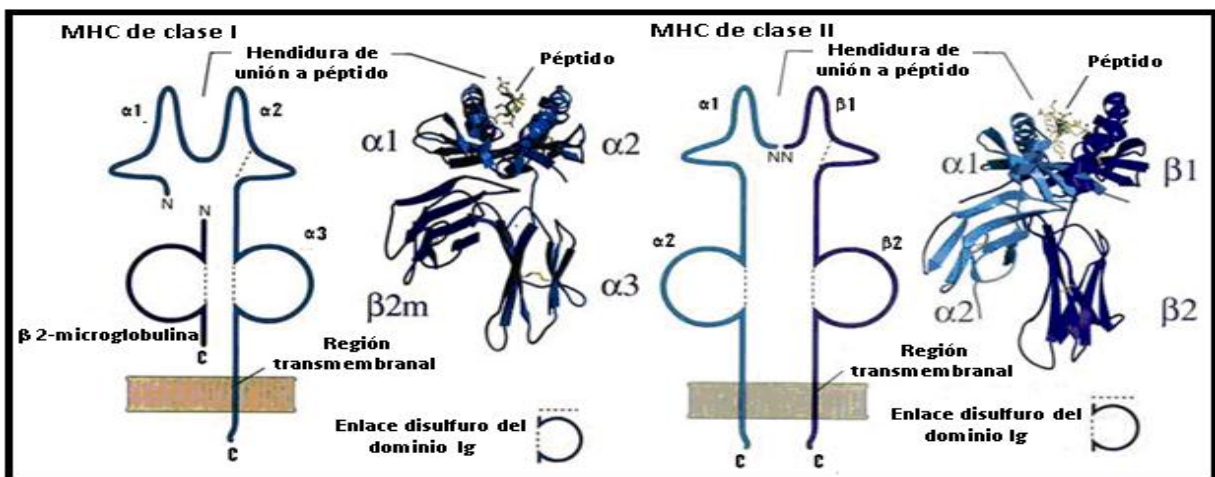


Fig. 5. Estructura molecular del Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase I y Clase II (Modificado de Abbas, *et al.*, 2001).

1.3.5 Función de las moléculas MHC

Los antígenos de clase I y II están involucrados en el control genético de la respuesta inmune adaptativa al procesar péptidos antigénicos para presentarlos en la superficie celular y que sean reconocidos por el receptor $\alpha\beta$ de las células T; lo que conforma una interacción importante para contrarrestar invasiones microbiológicas, controlar la proliferación de células malignas y determinar el éxito de los trasplantes (**Shiina *et al.*, 1999b**).

Generalmente la afinidad de los receptores de la célula T (TCR) hacia los complejos MHC/péptido de la célula diana es demasiado baja para inducir una interacción funcional entre las dos células, por esto son necesarios receptores accesorios (correceptores) que contribuyen a estabilizar dicha interacción aumentando la fuerza de adhesión intercelular. A diferencia de los receptores de la célula T o de las moléculas MHC, los correceptores no se unen al antígeno, son invariables y no polimórficos. Los correceptores más importantes y mejor conocidos de la célula T son las proteínas CD4 y CD8, que son proteínas transmembranales de paso único; las cuales reconocen a las proteínas MHC uniéndose a las zonas no variables de la proteína, lejos del surco de unión al péptido (**Alberts *et al.*, 1996**). CD4 se expresa en las células T colaboradoras y se une a las moléculas MHC de clase II, mientras que CD8 se expresa en las células T citotóxicas y se une a las moléculas MHC de clase I (**Kelley *et al.*, 2005**).

Los péptidos antigénicos se unen, ya sea a las moléculas HLA clase I o HLA clase II y los presentan a los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente. A las moléculas clase I se les unen péptidos que derivan de proteínas del citosol (antígenos intracelulares), mientras que a las moléculas clase II se les unen péptidos derivados de proteínas del endosoma o lisosoma. Así, la localización de un antígeno dentro de la célula dicta el tipo de respuesta inmune que se iniciará; HLA de clase I dirige la respuesta de la célula T CD8⁺ enfocada a virus y tumores mientras HLA II conduce la respuesta a células T CD4⁺ enfocada a patógenos que residen en un compartimiento endosomal/lisosomal o en el medio extracelular (**Van, 2001**).

1.4 GENES MIC

La familia de genes MIC (*MHC class I chain related genes*) (**Kulski *et al.*, 2002**) también conocida como PERB11 (*Perth beta block transcript 11*) (**Choy *et al.*, 2003**), fue descubierta

independientemente por Bahram *et al.*, y Leelayuwat *et al.*, en el año de 1994 (Choy *et al.*, 2003); la cual se encuentra dentro del MHC de clase I (Bahram *et al.*, 1994, Leelayuwat *et al.*, 1994). Está compuesta por dos genes (MICA y MICB), y cinco pseudogenes (MICC a MICG) (González *et al.*, 2003), que han coevolucionado con una serie de duplicaciones, translocaciones y deleciones durante la evolución de los primates (Kulski *et al.*, 1999).

MICA se encuentra solamente a 46.5 kb de HLA-B en dirección al centrómero y MICB a 83kb en la misma dirección de MICA, existiendo por lo tanto, un nivel significativo de desequilibrio de ligamiento entre estos tres genes. Los *loci* MICC, MICD y MICE están ubicados próximamente entre los genes HLA-E, -A y -F respectivamente, MICG está flanqueado por los genes HLA-G y HLA-F, mientras MICF fue identificado a 24kb de HLA-G en dirección hacia el centrómero (Bahram *et al.*, 2000) Fig. 6.

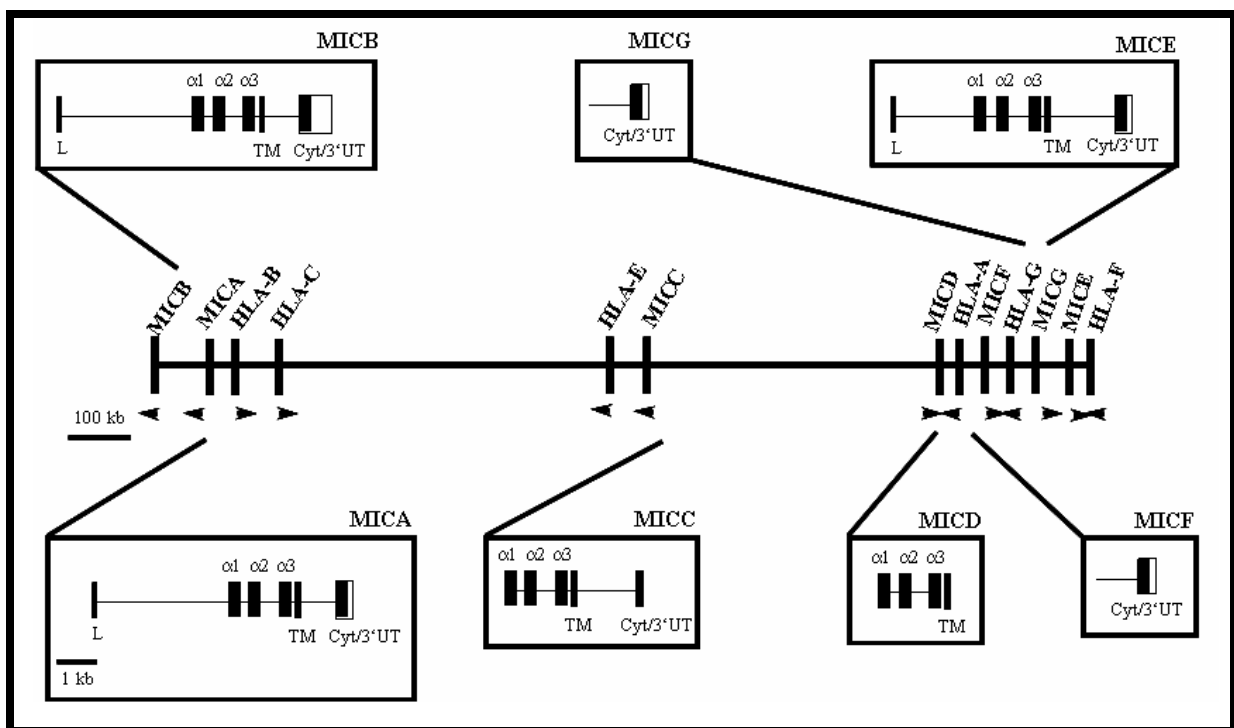


Fig. 6. Familia de Genes y Pseudogenes MIC a lo largo de la región de Clase I dentro del MHC humano (Shiina, *et al.*, 1999b).

Los miembros de la familia de genes MIC también han sido descritos en especies de primates no humanos (Steinle *et al.*, 1998, Pellet *et al.*, 1999, Seo, *et al.*, 1999, Anzai *et al.*, 2003) y

otros mamíferos (Bahram *et al.*, 1994), pero están ausentes en el MHC de roedores como la rata (Günther *et al.*, 2001, Ioannidu *et al.*, 2001) o el ratón (Kumanovics *et al.*, 2002).

Los genes MICA y MICB muestran un alto grado de similitud a los genes MHC de clase I clásicos pero se distinguen por su organización inusual de exones e intrones (Bahram *et al.*, 2000) y presentar una región promotora similar a la de los genes de las proteínas de choque térmico (HSP=Heat Shock Protein) (Groh *et al.*, 1998). Exhiben una estructura tridimensional altamente relacionada con las moléculas de clase I clásicas; pero no se encuentran unidas a péptidos derivados del procesamiento de antígenos, ni se asocian con la β 2-microglobulina (β 2-m) (Groh *et al.*, 1996, 1998, Li *et al.*, 2001, Holmes *et al.*, 2002) y ambas son proteínas de superficie celular altamente glicosiladas que carecen del sitio de unión para CD4 y CD8 (Bahram *et al.*, 1994, Groh *et al.*, 1996) Fig. 7.

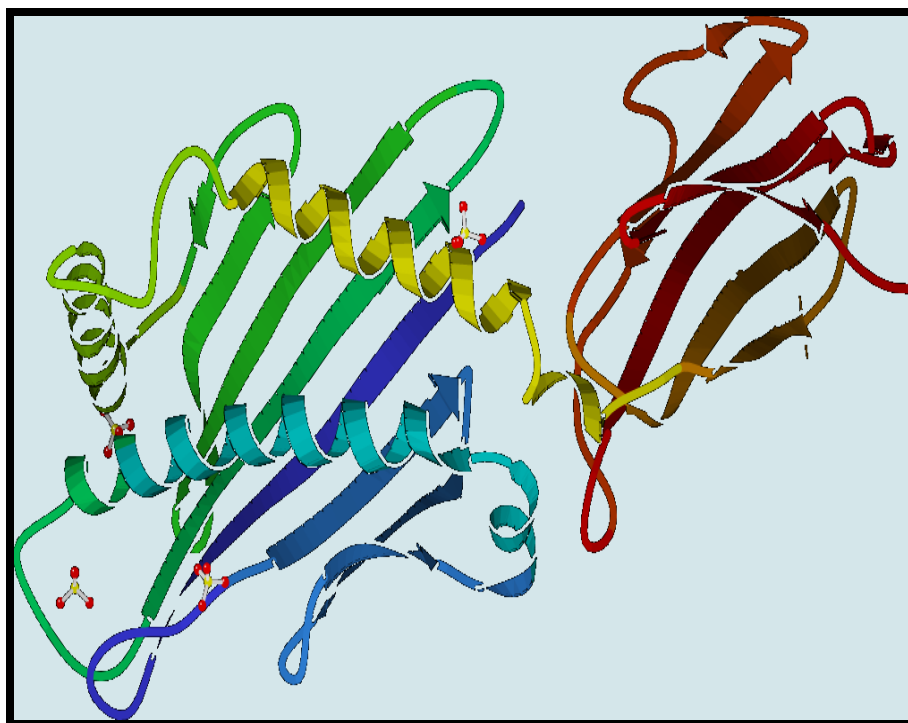


Fig. 7. Estructura tridimensional de la molécula MICB (Entrez Pubmed, 2009).

La expresión de MICA/B esta regulada por la activación de elementos de transcripción de choque térmico (Groh *et al.*, 1996) y el factor nuclear κ B (Molinero *et al.*, 2004); pero no es inducida por interferones tipo I y II (Bahram *et al.*, 2000), aunque se ha demostrado que exclusivamente el IFN- γ induce la regulación de la expresión de moléculas MIC sobre la

superficie de monocitos humanos (**Wang et al., 2008**). Las proteínas de MIC, son fuertemente inducidas sobre la superficie de solo algunas células [endoteliales, fibroblastos, líneas celulares epiteliales, tejido epitelial gastrointestinal, células epiteliales transformadas y en el citoplasma de monocitos, queratinocitos y células T activadas] (**Zwirner et al., 1998, 1999, Groh et al., 1999, Stephens, 2001, Jinushi et al., 2003, Molinero et al., 2004**) en respuesta a estrés celular, proliferación o choque térmico (**Groh et al., 1996, 1998, 1999**), infecciones virales y mycobacteriales (**Das et al., 2001, Groh et al., 2001**), estrés oxidativo (**Yamamoto et al., 2001**), condiciones autoinmunes (**Groh et al., 2003**) y por estrés genotóxico que indica la presencia de DNA dañado para el sistema inmunológico (**Gasser et al., 2005, 2006**); sin embargo, no son transcritas en células T, células B, y células NK (**Zwirner et al., 1998, 1999, Molinero et al., 2004**).

MICA y MICB interactúan con células NK, linfocitos T $\gamma\delta$ así como con subtipos de células T $\alpha\beta$ CD4 + y CD8+ (**Bauer et al., 1999; Li et al., 2001**), a través del receptor NKG2D. Este receptor se asocia con DAP10 (**Raulet, 2003**), molécula adaptadora que produce señales similares a las del CD28 por requerir de fosfatidilinositol 3- cinasa (PI3-kinase) intracelular y activarla (**Wu et al., 1999**).

El NKG2D además de reconocer los ligandos (NKG2DL) humanos MICA y MICB (**Bahram et al., 1996a, Bauer et al., 1999**) interactúa con la familia de proteínas de unión UL-16 (ULBP) codificadas por el citomegalovirus humano (**Cosman et al., 2001**) y los ligandos RAE-1 (*retinoic acid early family of proteins*), H60 (*minor histocompatibility antigen*) (**Diefenbach et al., 2001**) y MULT1 (*murine ULBP like transcript 1*) en el ratón (**Carayannopoulos et al., 2002**) Fig. 8.

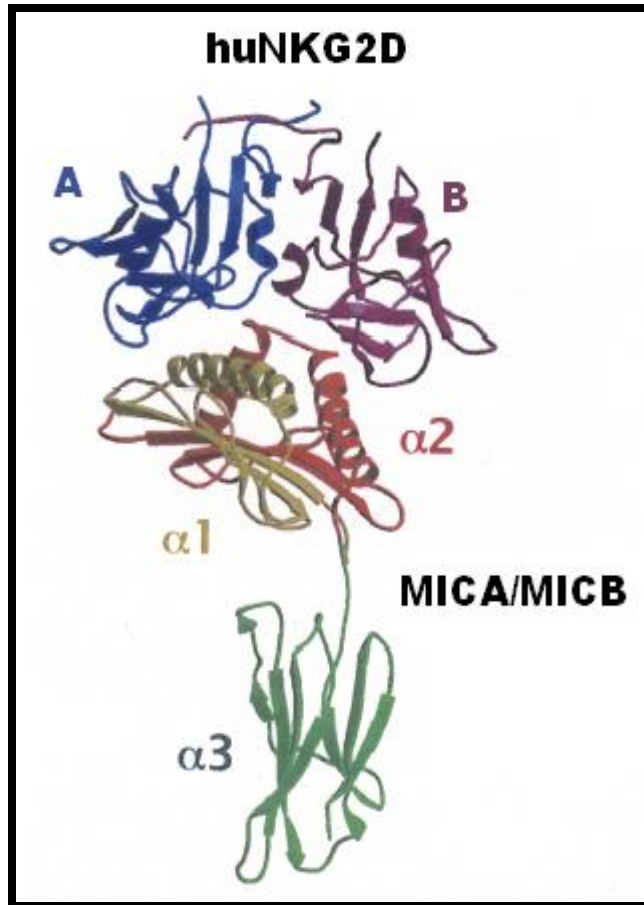


Fig. 8. Estructura tridimensional del complejo formado por el inmunoreceptor NKG2D y los ligandos MICA/MICB (Li *et al.*, 2002).

La función de MIC, como ligando para NKG2D-DAP10, es activar células NK y estimular células T $\gamma\delta$ (Davis *et al.*, 1998); ya que la unión de los ligandos con NKG2D es un estímulo de superficie para activar la citólisis y producción de citocinas por células NK (Raulet, 2003), mientras la interacción NKG2D/MIC es requerida para la respuesta citolítica y secreción de citocinas tipo Th1 por células T $\gamma\delta$ debido a la estimulación insuficiente del TCR por MIC (Wu *et al.*, 2002). Así, el reconocimiento del NKG2D con su ligando juega un papel importante en los sistemas inmunológicos innatos y adaptativos (Jumnainsong *et al.*, 2008).

1.4.1 Diferencias entre MICA y MICB

Los genes MICA y MICB son altamente polimórficos (Bahram *et al.*, 1994, Leelayuwat *et al.*, 1994); sin embargo el polimorfismo de MICB parece ser mas bajo que el de MICA, pues a la fecha se han identificado por lo menos 64 alelos de MICA que codifican 54 proteínas y 30

alelos de MICB que dan origen a 19 proteínas (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> de base de datos de secuencia stats.html).

El gen *MICB* presenta una secuencia nucleotídica de 12930pb (**Bahram et al., 1996b**), cuya secuencia de cDNA es de 2376pb correspondiendo a un mRNA de aproximadamente 2.4 kb (1.4kb en MICA) que codifica un polipéptido de 383 aminoácidos (**Bahram et al., 1994; Bahram et al., 1996c**).

La organización genómica de MICB es similar a la de MICA (**Bahram et al., 1996a**) conteniendo un intrón largo de 7352 pb (6840 pb en MICA) que separa los exones uno y dos, y un exón 6 de 1338 pb (302 pb en MICA) que codifica la cola citoplasmática y la secuencia 3'UT (*3' untranslated sequence*). La expresión de la secuencia 3'UT es la responsable de aproximadamente 1 kb de diferencia entre los transcritos de MICA y MICB (**Bahram et al., 1994; Bahram et al., 1996c**). Comparando los exones e intrones en forma individual de MICB con su contraparte en MICA se obtuvieron los siguientes grados de semejanza: 80% para exón 1, 52% para intrón 1, 91% para exón 2, 86% para intrón 2, 90% para exón 3, 87% para intrón 3, 98% para exón 4, 97% para intrón 4, 73% para exón 5, 83% para intrón 5 y finalmente 82% para exón 6 (**Bahram et al., 1996b**). De esta manera MICA y MICB están estrechamente relacionados, teniendo el 83 % de residuos de aminoácidos idénticos (**Bahram et al., 1996c**). Así, tomando en cuenta la semejanza de sus secuencias y conservación de sus estructuras genómicas únicas, uno esperaría la conservación de los sitios polimórficos, como es el caso para moléculas HLA de clase I (**Figuroa et al., 1988**); pero, a excepción de la posición 256 en el dominio $\alpha 3$ del gen *MICB*, los polimorfismos ocurren en diferentes posiciones del gen MICA (**Stephens, 2001**); es decir ninguno de los reemplazos de aminoácido de MICB coinciden con ningún sitio polimórfico de MICA o HLA de clase I (**Pellet et al., 1997**) Cuadro 2.

Cuadro 2. Posiciones polimórficas dentro de MICA y MICB (Modificado de Stephens, 2001).

Sustituciones de aminoácidos no sinónimas en los dominios externos de la proteína MICA	Sustituciones de aminoácidos no sinónimas en los dominios externos de la proteína MICB
<p>Dominio α-1, exón 2 (seis modificaciones o combinaciones)</p> <p>-Codón: 6 14 24 26 36</p> <p>-Consenso: Arg Trp Thr Val Cys</p> <p>-Variante: <u>Pro</u> <u>Gly</u> <u>Ala</u> <u>Gly</u> Tyr</p> <p>-Localización: beta beta beta beta beta</p>	<p>Dominio α-1, exón 2 (seis modificaciones o combinaciones)</p> <p>-Codón: 16 45 52 57 82</p> <p>-Consenso: Glu Pro Asp Lys Asp</p> <p>-Variante: <u>Gly</u> <u>His</u> <u>Asn</u> <u>Glu</u> <u>Gly</u></p> <p>-Localización: beta alpha alpha coli coli</p>
<p>Dominio α-2, exón 3 (19 modificaciones o combinaciones)</p> <p>-Codón: 91 115 114 122 124 125 129</p> <p>-Consenso: Arg Arg Gly Leu Thr Lys Met</p> <p>-Variante: <u>Gln</u> Lys <u>Arg</u> Val Ser <u>Glu</u> Val</p> <p>-Localización: beta beta coli coli coli coli coli</p>	<p>Dominio α-2, exón 3 (19 modificaciones o combinaciones)</p> <p>-Codón: 98 113 170</p> <p>-Consenso: Ile Asp Arg</p> <p>-Variante: Met <u>Asp</u> <u>Stop</u></p> <p>-Localización: beta coli coli</p>
<p>-Codón: 142 151 156 173 175 176 181</p> <p>-Consenso: Val Met His Lys Gly Val Thr</p> <p>-Variante: Ile Val <u>Leu</u> <u>Glu</u> Ser Ile Arg</p> <p>-Localización: alpha coli alpha coli coli coli coli</p>	
<p>Dominio α-3, exón 4 (11 modificaciones o combinaciones)</p> <p>-Codón: 206 208 210 213 215 221 251</p> <p>-Consenso: Gly Tyr Arg Thr Ser Val Gln</p> <p>-Variante: Ser Cys <u>Trp</u> <u>Ile</u> Thr Leu <u>Arg</u></p> <p>-Localización: beta coli coli beta coli coli coli</p>	<p>Dominio α-3, exón 4 (11 modificaciones o combinaciones)</p> <p>-Codón: 189 192 256 268</p> <p>-Consenso: Thr Glu Arg Gly</p> <p>-Variante: <u>Ile</u> <u>Lys</u> Lys Ser</p> <p>-Localización: beta coli coli beta</p>
<p>-Codón: 256 271</p> <p>-Consenso: Arg Pro</p> <p>-Variante: <u>Ser</u> Ala</p> <p>-Localización: coli beta</p>	

Además, un análisis de ligamiento preliminar de los alelos de MICB con los localizados en los genes de MICA y HLA-B no reveló desequilibrio de ligamiento entre ellos (valor de LD mayor que 3), implicando la presencia de una zona de recombinación potencial entre los genes MICA y MICB (Ando *et al.*, 1997).

La estructura cristalina de MICB exhibe un ángulo en el dominio α 3 intermedio entre las estructuras de MICA sola y en complejo con el receptor NKG2D, reforzando la conclusión de que las proteínas MIC, tienen extremada flexibilidad. Durante el mapeo de las diferencias en las secuencias entre alelos conocidos de MICA y MICB, se encontró que algunas variaciones en los residuos que forman parte de la estructura como la sustitución de triptófano (MICB) por leucina (MICA) en la posición 146, puede afectar la estabilidad de está modificando el empaquetamiento de Tyr157 contra el corazón hidrofóbico de la proteína; así como la sustitución de arginina (MICB) por glutamina (MICA) en la posición 108 puede afectar su

fuerza de unión; mientras las sustituciones se extienden desde muy conservadas (R/K) hasta muy drásticas (P/H) en los residuos de contacto cercano con NKG2D, pero muy lejanos del sitio de unión. Las posiciones de las sustituciones están uniformemente distribuidas aunque se agrupan hacia el dominio $\alpha 2$ en MICA y para un costado de la hélice en la plataforma de MICB, las sustituciones alélicas observadas en las posiciones 52, 57, 82, 98 y 113 no afectan significativamente la estructura de MICB o su interacción con NKG2D; mientras sustituciones en las posiciones 16 y 45 probablemente resultan en cambios para la estructura de MICB pero están lo suficientemente distantes de los residuos de NKG2D que no afectan su unión. MICB carece del enlace disulfuro (Cys36 - Cys41) presente en MICA; además como en la estructura de MICA, y a diferencia de la glicoproteína Zn- $\alpha 2$, no hay densidad electrónica en MICB (Holmes *et al.*, 2002).

El gen *MICB* presenta un microsatélite polimórfico dentro del intrón 1, que es una repetición nucleotídica (CA/TG)_n con un número de 15 alelos diferentes (MICB-CA-14 a MICB-CA-28), (Kimura *et al.*, 1998), a diferencia de MICA que presenta una región microsatelital en el exón 5 que codifica polialaninas dependiendo del número de repeticiones del triplete GCT que existan con 7 alelos (A4, A5, A5.1, A6, A7, A9 y A10), donde el tercero contiene cinco repeticiones del triplete y una inserción de un nucleótido (GGCT) que origina un codón de paro (TAA) por lo que se pierde la región transmembranal de MICA, generando una molécula soluble (Rueda *et al.*, 2002). También se ha descrito un dimorfismo de repeticiones *AluY* dentro del intrón 1 del gen *MICB*, secuencia que está ausente de los otros seis genes MIC (Gaudieri *et al.*, 1997). Un polimorfismo dinucleótido (una sustitución nucleotídica en las posiciones 542 y 543 de GC a AG en la secuencia genómica de MICB) que es parte de este elemento *AluY*, genera la secuencia consenso necesaria para introducir un nuevo sitio de empalme 5' (*splice junction*), que puede producir por *splicing* alternativo un transcrito con exón adicional que contiene un codón de paro prematuro por lo que la transcripción no origina una proteína funcional, resultando en la producción de una molécula trunca; o bien, producir el transcrito de fragmento normal y la proteína funcional (Kulski *et al.*, 2002, Martínez-Borra *et al.*, 2007).

Los diferentes alelos de MICB podrían producir proteínas con características únicas respecto a su expresión basal/apical o su nivel de la expresión (**Hankey et al., 2002**). Además estudios en curso han indicado que al menos del 40-60 % de genes humanos presentan *splicing* alternativo (**Maniatis et al., 2002**), y como un tercio de estos eventos insertan codones de paro prematuros que resultan generalmente en la degradación del mRNA, y suministran un mecanismo para regular los niveles de expresión proteica de estos genes (**Lewis et al., 2003**). El *splicing* alternativo también podría ser usado como un mecanismo general para regular la función del sistema inmunológico (**Lynch, 2004**), y tiene un papel activo en el desarrollo de cáncer (**Venables, 2004**).

MICB, de forma semejante a MICA, es liberada proteolíticamente de células epiteliales y hematopoyéticas por actividad de metaloproteasas (**Salih et al., 2006**); un mecanismo que puede explicar la evasión de la inmunovigilancia para tumores mediada por NKG2D en humanos, donde las células tumorales reducen los niveles de NKG2DL en la superficie liberando a MIC en forma soluble (MICs) (**Groh et al., 2002**); por lo que niveles elevados de NKG2DL solubles pueden ser observados en sueros de pacientes con tumores malignos (**Salih et al., 2006**). Curiosamente, las moléculas de MICA, en contraste con MICB; no son unidas por UL16, una glicoproteína codificada por el Citomegalovirus Humano, que esta involucrada en la evasión inmune de este virus (**Cosman et al., 2001**); ya que UL16 retiene a MICB en el retículo endoplasmico evitando su recuperación de la red trans de Golgi, impidiendo su expresión en la superficie celular, y por consiguiente, la coestimulación de la respuesta de células T dependiente de NKG2D específica contra CMVH está reducida (**Wu et al., 2003a**). Estudios recientes identificaron que el dominio $\alpha 2$ de MICB es el responsable de la unión de la UL16, y se cree que el alto polimorfismo visto en MICA podría ser el resultado de la no unión de MICA y UL16 (**Spreu et al., 2006**).

1.5 IMPORTANCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL MHC

En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos en identificar frecuencias polimórficas presentes en una población que puedan influir en el riesgo de padecer una enfermedad (**Iniesta et al., 2005**), utilizando los polimorfismos como marcadores de ciertas enfermedades (**Checa, 2007**).

La estructura alélica y genética del MHC es compleja (**Traherne *et al.*, 2006**). Debido a varios criterios destaca su presencia dentro del genoma humano como son: su alta densidad de genes (**Shiina *et al.*, 1999a, Kelley *et al.*, 2006**), su marcado desequilibrio de ligamiento genético (**Kelley *et al.*, 2006**), su falta de recombinación alélica homóloga (**Traherne *et al.*, 2006**) y su alto grado de polimorfismo genético (**Shiina *et al.*, 1999^a, Kelley *et al.*, 2006**); por lo que el MHC ha sido durante mucho tiempo considerado como la región más importante en el genoma humano con respecto a la infección, inflamación, autoinmunidad (**Miretti *et al.*, 2005, Horton *et al.*, 2008**) y medicina de trasplante (**Horton *et al.*, 2008**), ya que contiene genes críticos que participan en: condiciones autoinmunes, resistencia a la infección (**Kelley *et al.*, 2006**), respuesta inmune adaptativa, rechazo a injertos y susceptibilidad a enfermedades (**Shiina *et al.*, 1999a**).

Como el MHC juega un papel importante en erradicación viral, así como en la vigilancia inmune contra ciertas neoplasias, alguna asociación entre el polimorfismo de HLA y cáncer cervical o sus lesiones precancerosas puede existir debido a una relativa inhabilidad para erradicar la infección o proveer una vigilancia inmune contra el tejido displásico; ya que la expresión de las moléculas HLA se ve alterada en células cervicales cancerosas (**Brady *et al.*, 2000**).

1.6 IMPORTANCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE GENES MIC

El significado funcional de los polimorfismos de los genes MIC es menos claro que para los genes de clase I clásicos. La selección positiva, demostrada por los altos valores de sustituciones nucleotídicas no sinónimas contra las sustituciones nucleotídicas sinónimas, reportadas sobre los exones de MICA y MICB que codifican para los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ donde se encuentran dispersas sin estar enfocadas, origina sustituciones alélicas que podrían producir diferencias en la afinidad de unión entre los diversos alelos de MICA o MICB y el altamente conservado NKG2D (**Elsner *et al.*, 2001**) lo cual puede provocar que las células NK no puedan reconocer y matar células que sobreexpresaron los ligandos de NKG2D (**Wu *et al.*, 2003b**).

Por lo tanto, los polimorfismos alélicos de MICA y MICB podrían ser muy relevantes al desempeñar un papel importante en el trasplante de órganos, autoinmunidad, tumores, reconocimiento de virus y/o inmunopatogénesis de las enfermedades (**Gao et al., 2006, Martínez-Borra et al., 2007**).

1.6.1 Asociación de polimorfismos en el gen *MICB* con diferentes enfermedades.

La magnitud de los polimorfismos de MICB, su distribución en diferentes poblaciones y su potencial asociación con diferentes enfermedades permanece bajo investigación (**Jumnainsong et al., 2008**); pero su importancia funcional no ha sido evaluada todavía (**González et al., 2003**).

Al estudiar la relación del gen *MICB* con algunas enfermedades; éstas no han mostrado alguna asociación después de realizar la corrección múltiple de Bonferroni (*Pc*); pero muchos otros han mostrado evidencias de asociación entre varias enfermedades y alelos de MICB, tal como se muestra en la **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Enfermedades asociadas con polimorfismos del gen *MICB*.

Enfermedad	Alelo asociado	Pc	Tipo de asociación	Población	Referencia
Enfermedad de Behcet			N.S	Oriental (Japoneses)	Kimura <i>et al.</i> , 1998
Enfermedad de Addison Autoinmune	MICB-CA25	0.047	Positiva		
	MICB-CA17	0.03	Negativa	Caucásica (Italianos)	Gambelunghe <i>et al.</i> , 1999.
Colangitis Esclerosa Primaria	MICB*CA24	<0.0000001	Positiva	Caucásicos (Noruegos)	Wiencke <i>et al.</i> , 2001.
Enfermedad Celiaca Típica y Atípica	MICB0106	<0.000001	Positiva		
	MICB0106	<0.0033	Positiva	Caucásica (Españoles)	González <i>et al.</i> , 2004.
Enfermedad de Behcet			N.S	Caucásica (Ingleses)	Hughes <i>et al.</i> , 2005
Tumores Malignos Cancer de pulmón	MICBs	0.022	Positiva	Caucásica (Alemanes)	Holdenrieder <i>et al.</i> , 2006.
	MICB*CA16	0.033	Positiva		
	MICB*CA19	0.019	Positiva	Asiáticos	
Lepra Paucibacilar	MICB*CA21	<0.001	Negativa	(Sur de India)	Tosh <i>et al.</i> , 2006.
	MICB*CA22	0.006	Negativa		
Enfermedad Celiaca	MICB*002	<0.0001	Positiva		
	MICB*008	<0.0001	Positiva	Caucásica (Españoles)	Rodríguez-Rodero <i>et al.</i> , 2006.
	MICB*00502(DMO.2)	0.015	Negativa		
Colitis Ulcerativa	MICB-CA18	0.024	Positiva	Orientales (Chinos)	Li <i>et al.</i> , 2006.
	MICB-CA18 (s.f)	0.008	Positiva		
Artritis Reumatoide	MICB*004	0.01	Positiva	Caucásica (Españoles)	López-Arbesu <i>et al.</i> , 2007.
	MICB0106	<0.001	Positiva		
Colitis Ulcerativa	MICB0106 (s.m)	0.000	Positiva		
	MICB0106 (<40 años)	<0.001	Positiva	Orientales (Chinos)	Li <i>et al.</i> , 2008.
Esclerosis múltiple	MICB*004	<0.001	Positiva	Caucásica (Españoles)	Fernández-Morera <i>et al.</i> , 2008a.
Esclerosis Múltiple	MICBs	<0.01	Positiva	Caucásica (Españoles)	Fernández-Morera <i>et al.</i> , 2008b.
Diabetes Tipo1	MICB*005	0.03	Positiva	Caucásica (Europeos)	Field <i>et al.</i> , 2008.
Cáncer Colorectal Metastasis Estados avanzados	MICB-CA14	0.045	Positiva	Caucásica (Alemanes)	Kopp <i>et al.</i> , 2009.
	MICB-CA21	0.047	Positiva		

*Asociación positiva: Riesgo a padecer la enfermedad.

*Asociación negativa: Protección para padecer la enfermedad.

*Pc: P corregida por el número de comparaciones.

*n.s: No hay asociación

*s.f: Sexo femenino

*s.m: Sexo masculino

1.6.2 Asociación de polimorfismos en genes *HLA* y *MIC* con CaCu o sus lesiones precursoras.

Varios alelos y haplotipos de HLA de clase I y II han sido descritos asociados a susceptibilidad a Cáncer Cervical e infección por VPH; sin embargo los reportes de asociaciones entre polimorfismos de genes MIC y carcinoma cervical no han presentado una asociación en particular con algún alelo, tal como se muestra en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Polimorfismos de genes HLA y MIC asociados con CaCu o sus lesiones precursoras.

Enfermedad	Alelo asociado	Pc	Tipo de asociación	Población	Referencia
Tumores Malignos Cáncer ginecológico	MICBs	0.028	Positiva	Caucásica (Alemanas)	Holdenrieder <i>et al.</i> , 2006.
Cáncer Cervical LIEBG	MICB*00502	0.0009	Negativa	Asiática (Noreste de Tailandia)	Jumnainsong <i>et al.</i> , 2008.
LIEAG	MICB*00502	<0.001			
Neoplasia Intraepitelial Cervical	MICA-TM	0.013	n.s	Caucásica (Suecas)	Ghaderi <i>et al.</i> , 1999.
Cáncer Cervical	MICA		n.s	Caucásica (Norte de Suecia)	Ghaderi <i>et al.</i> , 2001.
Cáncer Cervical	MICA-TM		n.s	Asiática (Taiwanesas)	Chen <i>et al.</i> , 2005
Cáncer Cervical	MICA		n.s	Asiática (Noreste de Tailandia)	Jumnainsong <i>et al.</i> , 2007.
Cáncer Cervical	HLA-DR2 HLA-B7	<0.05	Positiva	Caucasica (Finlandesas)	Castro <i>et al.</i> , 2007.
Cáncer Cervical	HLA-B15	<0.05	Negativa	Oriental (Chinas)	Liang <i>et al.</i> , 2008.
	HLA-DPB1*1301	<0.05	Positiva		
	HLA-DPB1*0202				
	HLA-DQB1*030302				
CIN3/Carcinoma invasor de células escamosas	HLA-DRB1*13-DQB1*06	<0.05	Negativa	Sudamericana (Argentinas)	Eiguchi <i>et al.</i> , 2008.
Cáncer Cervical	HLA-DRB1*04 HLA-DQB1*0302	<0.05	Positiva		
Cáncer Cervical	HLA-DRB1*13 HLA-DQB1*02 HLA-DQB1*0301	<0.05	Negativa		
Cáncer Cervical	HLA-DQB1*0402 HLA-DQB1*0602 HLA-A*0201-B*4402-	<0.05	Positiva	Caucásica (Suecas)	Ivansson <i>et al.</i> , 2008.
Carcinoma de Células Escamosas Cervicales	HLA-A*0201-B*4402- Cw*0501-DRB1*0401- DQB1*0301	<0.05	Positiva	Norteamericana (U.S.A)	Madeleine <i>et al.</i> , 2008.
	HLA-B*4402-DRB1*1101- DQB1*0301				
	HLA-Cw*0701				
	HLA-DQB1*02	<0.05	Negativa		
	HLA-DQB1*03	<0.05	Positiva		
NIC de Alto Grado	HLA-DRB1*13				
Cáncer Cervical	HLA-B7-DRB1*1501-DQB1*0602	<0.05	Negativa	Norteamérica (Canadienses)	Ades <i>et al.</i> , 2008.
Lesiones precancerosas	HLA-DRB1*15-DQB1*06	<0.05	Positiva	Asiática (Norte de India)	Kohaar <i>et al.</i> , 2009.
	HLA-DRB1*04-DQB1*03	<0.05	Negativa		
	HLA-DRB1*15-DQB1*06	<0.05	Positiva		

*Asociación positiva: Riesgo a padecer la enfermedad.

*Asociación negativa: Protección para padecer la enfermedad.

*Pc: P corregida por el número de comparaciones.

*n.s: No hay asociación

4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con la OMS a nivel mundial, el Cáncer Cérvico Uterino es la segunda neoplasia ginecológica más frecuente, cuya incidencia y mortalidad difieren considerablemente entre países desarrollados y países en vías de desarrollo; siendo mucho mayor en estos últimos, donde los programas de detección precoz no han sido exitosos debido a las diferencias en el acceso y calidad de los servicios, la ubicación geográfica, la situación socioeconómica y la educación, así como aspectos culturales y psicosociales. De acuerdo con el INEGI, en México este padecimiento es la segunda causa de muerte por neoplasias entre las mujeres mayores de 25 años, lo cual representa un problema de salud que afecta a las mujeres en edad reproductiva. Se ha encontrado que la infección por VPH podría constituir una causa necesaria de neoplasia cérvico uterina, pero no todos los casos de infección con este virus desarrollan cáncer o lesiones precursoras; esto hace suponer que existen otros factores asociados con el incremento en la probabilidad de desarrollar estos padecimientos, como las condiciones genéticas del hospedero, que influyen en la respuesta inmune y podrían condicionar a aquellos que están en riesgo para evolucionar a carcinoma invasor, ya que se ha demostrado que la susceptibilidad genética juega un papel importante en el desarrollo de muchos cánceres humanos. El MHC juega un papel importante en erradicación viral, así como en la vigilancia inmune contra ciertas neoplasias y en los últimos años, se ha informado sobre la influencia del polimorfismo de HLA en el resultado de procesos infecciosos por VPH y su progresión a Cáncer Cérvico Uterino; ya que puede provocar cambios en la expresión de estas moléculas, tanto en la célula neoplásica como en los componentes celulares de la respuesta inmune y alterar el reconocimiento de los antígenos tumorales; presentándose una relativa inhabilidad para erradicar la infección o para proveer una vigilancia inmune contra el tejido displásico; ocasionando susceptibilidad o resistencia a desarrollar enfermedades neoplásicas. Pero existen algunos otros mecanismos de la respuesta inmune innata que pueden actuar para reconocer, suprimir, y/o eliminar células tumorales; específicamente en aquellos casos en que la expresión de moléculas de HLA de clase I se ha perdido o ha disminuido su regulación, donde las células NK pueden reconocer y matar células que sobreexpresaron los ligandos de NKG2D como lo son las proteínas MIC; cuyos genes son altamente polimórficos.

Actualmente muchos investigadores centran sus trabajos en estudios de asociación para identificar genes candidatos presentes dentro una población, los cuales influyen en la patogénesis de una enfermedad; ya que la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los polimorfismos genéticos que pueden ser empleados como marcadores moleculares para predecir mejor quien tiene mayor susceptibilidad o resistencia a desarrollar algún padecimiento. Por todo lo anterior resulta importante tipificar el polimorfismo del gen *MICB* en mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix; ya que éstos podrían ser muy relevantes al desempeñar un papel importante en la susceptibilidad o resistencia a desarrollar algún tipo de lesión precursora o cáncer en células cervicales.

5. HIPÓTESIS

Si existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas y/o genotípicas del polimorfismo presente en el gen *MICB* entre los grupos de estudio, entonces existirá una vinculación con la susceptibilidad o resistencia para el desarrollo de Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Cérvix.

6. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GENERAL

Tipificar el gen *MICB* en un grupo de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas en cérvix y mujeres sanas (grupo control) de la Ciudad de México, utilizando la técnica de PCR–SSOP para identificar una posible asociación de la frecuencia alélica y/o genotípica con este padecimiento.

b. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseñar las sondas de oligonucleótidos de secuencia específica para la tipificación del gen *MICB*.
2. Estandarizar las temperaturas de hibridación y lavado para las sondas de oligonucleótidos de secuencia específica.
3. Interpretar los resultados para establecer las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *MICB* en cada uno de los grupos de estudio.

7. METODOLOGÍA

1.1 Población de Estudio.

Esta investigación se realizó en un total de 406 mujeres Mexicanas con dos generaciones anteriores originarias de México; las cuales se clasificaron en dos grupos: grupo controles con 211 muestras de mujeres clínicamente sanas con dos citologías previas anuales consecutivas, resultado negativo a infección por virus del papiloma humano y diagnosticadas sin lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix procedentes de la Clínica No.32 del IMSS y grupo pacientes con 195 muestras de mujeres enfermas con dos citologías previas anuales consecutivas, resultado positivo a infección por virus del papiloma humano y diagnosticadas histológicamente con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix procedentes de la Clínica Venados del IMSS, ambas ubicadas dentro de la Ciudad de México.

1.2 Toma de muestra.

Se tomó una muestra de sangre periférica con Vacutainer en un tubo de 13x100 con EDTA al 10% como anticoagulante (tubo con tapón morado).

1.3 Extracción, cuantificación y electroforesis de DNA

La extracción se realizó a partir de sangre total mediante la técnica de perclorato de sodio. La cantidad de DNA obtenido se evaluó espectrofotométricamente usando una dilución con agua destilada 1:50 y la calidad del material obtenido se verificó mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio utilizando TBE 0.5X.

1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Cada reacción de PCR se realizó a una concentración final de: 1x para buffer No.1 que contiene 17.5 mM de MgCl₂ (*kit Expand Long Template PCR System*, Roche) y 0.056mM de dNTP's, 0.35pmol para los iniciadores 5' y 3', 0.075U/μl de Taq polimerasa y 20ng/μl de DNA en un volumen final de 25 μl. La amplificación del gen *MICB* se produjo dentro de un termociclador con el programa ELT observando los productos de PCR obtenidos (2,307 pb) mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio usando solución amortiguadora TBE 0.5X y un marcador de peso molecular de 250 pb.

1.5 Técnica de SSOP (*Sequence Specific Oligonucleotides Probes*)

Las sondas de oligonucleótido se marcaron en forma individual utilizando el *Kit DIG oligonucleotide 3'-End Labelling 2nd. Generation* y se prepararon los *Dot Blots* sobre membranas de nylon cargadas positivamente. Posteriormente el DNA unido en la membrana se incubó con la sonda marcada para su hibridación por complementariedad y con lavados de alta astringencia las sondas que no se unieron adecuadamente fueron removidas. Para verificar la hibridación de las sondas se realizó una reacción secundaria quimioluminiscente sobre una película de rayos X, utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a la enzima fosfatasa alcalina y el sustrato CSPD. Las membranas fueron re-hibridadas con otras sondas después de incubar la membrana con solución removedora.

1.6 Análisis Estadístico

Para estudiar la asociación entre una enfermedad y el *locus* marcador se realizó una tabla de contingencia de 2x2. En esta se asume la existencia de dos grupos tomados al azar (uno con la enfermedad y el otro control negativo para dicho padecimiento), cada grupo formado por individuos clasificados por tener un alelo marcador o no. Sin embargo, la asociación de una enfermedad con un marcador genético perteneciente a un sistema altamente polimórfico como lo es MICB requiere el análisis de un gran número de especificidades antigénicas, lo cual puede originar asociaciones significativas al azar, por este motivo se redujo el número de inferencias incorrectas mediante la corrección de Bonferroni que consiste en multiplicar el nivel de significancia (p), obtenido por χ^2 o mediante p exacta de Fisher, por el número de antígenos evaluados (**Hawkins,1981, Svejggard *et al.*, 1994**).

8. RESULTADOS

Para detectar algunas variaciones nucleotídicas que determinan los alelos del gen *MICB* se usaron 47 sondas de oligonucleótidos de secuencia específica que se hibridaron sobre productos de PCR que contenían del exón 2 al exón 5. Las condiciones experimentales de la técnica de SSOP que fueron previamente descritas para 42 sondas de *MICB* por Fischer y colaboradores en el año 2000 con sus respectivas modificaciones; así como las condiciones estandarizadas para las 5 nuevas sondas empleadas se muestran en el **Cuadro 5**.

Cuadro 5. Condiciones experimentales para la hibridación y lavados de las sondas de oligonucleótidos de secuencia específica.

SONDA	T _H (°C)	T _L (°C)	SONDA	T _H (°C)	T _L (°C)
1	50	58	25	50	58
2	50	58	26	50	58
3	50	58	27	50	60
4	50	64	28	50	62
5	50	60	29	50	60
6	50	62	30	50	64
7	50	60	31	45	54
8	50	60	32	45	54
9	45	56	33	45	56
10	50	64	34	50	64
11	50	60	35	45	58
12	50	64	36	50	60
13	43	48	37	45	50
14	43	50	38	50	64
15	45	50	39	45	52
16	45	52	40	50	64
17	50	56	41	50	54
18	50	62	42	45	50
19	50	56	43	50	56
20	50	58	44	50	60
21	43	52	45	50	54
22	43	56	46	50	54
23	50	58	47	50	56
24	50	58			

*T_H=Temperatura de Hibridación

*T_L= Temperatura de Lavado

El patrón de hibridación de las 47 sondas en los 30 alelos de *MICB* reportados se encuentra representado en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Patrón de hibridación de las sondas de oligonucleótido de secuencia específica para alelos del gen MICB.

UBICACIÓN DE LA SONDA		PATRON DE HIBRIDACIÓN MICB																																																		
		EXÓN 2										EXÓN 3						EXÓN 4										EXÓN 5		EXÓN 6		INTRÓN 2						INTRÓN 4														
DESIGNACIÓN ANTERIOR	ALELOS/SONDA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	43	44	45	46	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	47	29	30	48	49	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42		
MICB0101	MICB*001	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
MICB0103101	MICB*0020101	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB0103101	MICB*0020102	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB0105	MICB*003	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB0104	MICB*0040101	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB0104	MICB*0040102	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB005	MICB*0050101	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB01021	MICB*0050201	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB01021	MICB*0050202	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB01021	MICB*0050203	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB01021	MICB*0050204	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB01022	MICB*00503	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB01023	MICB*00504	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB-01021V	MICB*00505	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB006	MICB*006	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB0103103	MICB*007	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB0106	MICB*008	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB0107N	MICB*009N	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB-004	MICB*010	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB-005	MICB*011	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB-006	MICB*012	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB01022v	MICB*013	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB0103101v	MICB*014	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICB	MICB*015	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICBH0160101	MICB*016	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICBH0190101	MICB*018	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICBH0200101	MICB*019	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICBH0210101	MICB*020	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICBH0140101N	MICB*021N	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MICBH0150101	MICB*022	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

En la estandarización de las temperaturas de hibridación y lavado de las 42 sondas previamente reportadas y para las 5 sondas que se diseñaron (sondas 43, 44, 45, 46 y 47), se utilizaron como controles 15 líneas celulares homocigotas linfoblastoides B del *12th International Histocompatibility Workshop*; cuyos alelos se describen en el **Cuadro 7**.

Cuadro 7. Líneas celulares homocigotas para alelos de MICB utilizadas como controles para la estandarización de temperaturas de hibridación y lavado.

Línea Celular	Alelo	Sonda																	
Hela	MICB*001	P02	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P30	P43	P45	P27
YAR	MICB*0020101	P01	P03	P06	P07	P09	P11	P14	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
MCF	MICB*0020102	P01	P03	P06	P07	P09	P11	P14	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
DBB	MICB*003	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P18	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
BM14	MICB*0040101	P01	P03	P05	P08	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
APD	MICB*0040102	P01	P03	P05	P08	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
FPAF	MICB*0050101	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P28	P29	P43	P45	P27
PF97	MICB*0050201	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
MOU	MICB*0050202	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
WT51	MICB*0050204	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
E4181	MICB*00503	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P22	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
RML	MICB*00504	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P17	P19	P21	P24	P25	P27	P29	P43	P45	P27
SPACH	MICB*006	P01	P03	P05	P07	P09	P11	P13	P15	P17	P20	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
WT49	MICB*008	P01	P03	P06	P07	P09	P12	P14	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P27
EMJ	MICB*014	P01	P03	P06	P07	P09	P11	P14	P15	P17	P19	P21	P23	P25	P27	P29	P43	P45	P47

La hibridación de las sondas (43-47) con cada uno de los controles se muestra en la **Fig. 9**; donde la sonda 43 y 45 son positivas para todas las líneas celulares, la sonda 44 y 46 son negativas en todos los controles; mientras la sonda 47 solo es positiva para la línea celular EMJ.



Fig. 9. Placas de rayos X después de la reacción de quimiluminiscencia tras realizada la hibridación de las sondas sobre la membrana de nylon que contenía el amplificado.

Se tipificó el polimorfismo del gen *MICB* en 406 mujeres mexicanas que integraron 2 grupos de estudio. El primero constituido por 211 mujeres diagnosticadas sin lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix (grupo control) y el segundo por 195 mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix (grupo de pacientes), obteniéndose las frecuencias alélicas y genotípicas reportadas en las **Tablas 1 y 2**.

Tabla 1. Distribución de la frecuencia alélica del gen *MICB* en el grupo control y grupo de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix.

Alelo	Controles		Pacientes LIEBG + LIEAG		LIEBG		LIEAG	
	2n=422	(%)	2n=390	(%)	2n=266	(%)	2n=124	(%)
MICB*00201	28	7.0	26	7.0	18	7.0	8	6.0
MICB*00201v	8	2.0	15	4.0	9	3.0	6	5.0
MICB*003	6	1.0	6	2.0	4	2.0	2	2.0
MICB*00401	37	9.0	27	7.0	15	6.0	12	10.0
MICB*00401v	10	2.0	14	4.0	11	4.0	3	2.0
MICB*0050101	3	1.0	2	1.0	0	0.0	2	2.0
<i>MICB*00502/*010</i>	281	67.0	275	71.0	194	73.0	81	65.0
MICB*00503	1	0.0	2	1.0	2	1.0	0	0.0
MICB*00504	3	1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00505	12	3.0	11	3.0	4	2.0	7	6.0
MICB*008	3	1.0	3	1.0	3	1.0	0	0.0
MICB*009N	14	3.0	4	1.0	3	1.0	1	1.0
MICB*013	2	0.0	1	0.0	0	0.0	1	1.0
MICB*018	1	0.0	3	1.0	2	1.0	1	1.0
MICB*019	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>MICB*00201/*019</i>	2	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>MICB*00401/*020</i>	2	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>MICB*00401/*00505</i>	7	2.0	1	0.0	1	0.0	0	0.0
<i>MICB*00504/*022</i>	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

En itálicas grupo de alelos formados después de no poder definir el alelo presente en la muestra.
v indica una variante intrónica.

La tipificación alélica en algunas muestras no fue específica, clasificándose en grupos de alelos los cuales se muestran dentro de la **Tabla 1** en itálicas.

La prueba estadística del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó por el método de Sasiani con el programa *Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium* que se encuentra disponible en

la red (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Como se observa en la **Tabla 2**; las frecuencias genóticas cumplieron con este parámetro estadístico ya que se obtuvieron $P > 0.05$ para cada uno de los diferentes grupos de estudio.

Tabla 2. Distribución de la frecuencia genotípica del gen *MICB* en el grupo control y grupo de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix.

Genotipo		Controles		Pacientes					
		n=211	(%)	LIEBG + LIEAG		LIEBG		LIEAG	
		n=195	(%)	n=133	(%)	n=62	(%)		
MICB*00201	MICB*00201	0	0.0	1	1.0	1	1.0	0	0.0
MICB*00201	MICB*00201v	0	0.0	2	1.0	2	2.0	0	0.0
MICB*00201	MICB*003	0	0.0	1	1.0	0	0.0	1	2.0
MICB*00201	MICB*00401	1	0.0	1	1.0	1	1.0	0	0.0
MICB*00201	MICB*00502/*010	21	10.0	19	10.0	12	9.0	7	11.0
MICB*00201	MICB*00504	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00201	MICB*009N	2	1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00201v	MICB*00502/*010	8	4.0	13	7.0	7	5.0	6	10.0
MICB*003	MICB*00401	2	1.0	1	1.0	0	0.0	1	2.0
MICB*003	MICB*00502/*010	4	2.0	4	2.0	4	3.0	0	0.0
MICB*00401	MICB*00502/*010	21	10.0	13	7.0	9	7.0	4	6.0
MICB*00401	MICB*00505	12	6.0	11	6.0	4	3.0	7	11.0
MICB*00401	MICB*008	0	0.0	1	1.0	1	1.0	0	0.0
MICB*00401	MICB*009N	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00401v	MICB*0050101	0	0.0	1	1.0	0	0.0	1	2.0
MICB*00401v	MICB*00502/*010	9	4.0	13	7.0	11	8.0	2	3.0
MICB*00401v	MICB*013	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*0050101	MICB*00502/*010	3	1.0	1	1.0	0	0.0	1	2.0
MICB*00502/*010	MICB*00502/*010	99	47.0	101	52.0	72	54.0	29	47.0
MICB*00502/*010	MICB*00503	0	0.0	1	1.0	1	1.0	0	0.0
MICB*00502/*010	MICB*00504	2	1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00502/*010	MICB*008	3	1.0	2	1.0	2	2.0	0	0.0
MICB*00502/*010	MICB*009N	9	4.0	4	2.0	3	2.0	1	2.0
MICB*00502/*010	MICB*013	1	0.0	1	1.0	0	0.0	1	2.0
MICB*00502/*010	MICB*018	1	0.0	2	1.0	1	1.0	1	2.0
MICB*00502/*010	MICB*019	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00503	MICB*018	0	0.0	1	1.0	1	1.0	0	0.0
MICB*00201	MICB*00401/*00505	3	1.0	1	1.0	1	1.0	0	0.0
MICB*00201/*19	MICB*00401/*020	2	1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00401/*00505	MICB*00503	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00401/*00505	MICB*00504/*022	1	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
MICB*00401/*00505	MICB*009N	2	1.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Equilibrio de Hardy-Weinberg	P	0.60		1.00		1.00		0.44	

Valores de $P < 0.05$ no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El análisis de asociación de las frecuencias alélicas y genóticas del gen *MICB* entre el grupo control (sin LIE) y el grupo de pacientes (con LIE) fue realizado con el programa EPI INFO16

mediante tablas de contingencia de 2x2 para obtener la P exacta de Fisher y las razones de momios con sus intervalos de confianza al 95%, tomándose como significativo cualquier valor de $P < 0.05$. Para descartar asociaciones significativas al azar y establecer una verdadera asociación de la enfermedad con este marcador genético altamente polimórfico se aplicó la corrección de Bonferroni a todo valor de P significativo. La prueba de asociación entre los diferentes grupos de estudio no mostró diferencias significativas (**Tabla 3 a 6**), obteniéndose una $P_c > 0.05$ para cada alelo o genotipo que resulto con un valor de P exacta de Fisher significativo.

Fueron 12 muestras del grupo control (MICB*00201/*019 (2), MICB*00401/*020 (2), MICB*00401/*00505 (7) y MICB*00504/*022 (1)) y una muestra de LIEBG (MICB*00401/*00505) con resultados discrepantes, las cuales no se pudieron tipificar completamente y se clasificaron en grupos de alelos posibles de acuerdo al patrón de hibridación que presentaron; estas muestras no se tomaron en cuenta para el análisis ya que tienen que ser clonadas y secuenciadas para determinar su genotipo. Los alelos del grupo MICB*00502/*010 si se tomaron en cuenta para el análisis, porque a diferencia de los grupos anteriores en éste solo falta estudiar un SNP.

Tabla 3. Asociación de la frecuencia alélica del gen *MICB* en el grupo control y grupo de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix.

Alelo	Controles		Pacientes		P	Pc	OR (95% IC)
	2n=422	%	2n=390	%			
MICB*00201	28	7.0	26	7.0	0.986		
MICB*00201v	8	2.0	15	4.0	0.094		
MICB*003	6	1.0	6	2.0	0.891		
MICB*00401	37	9.0	27	7.0	0.330		
MICB*00401v	10	2.0	14	4.0	0.305		
MICB*0050101	3	1.0	2	1.0	0.718		
MICB*00502/*010	281	67.0	275	71.0	0.229		
MICB*00503	1	0.0	2	1.0	0.517		
MICB*00504	3	1.0	0	0.0	0.095		
MICB*00505	12	3.0	11	3.0	0.984		
MICB*008	3	1.0	3	1.0	0.923		
MICB*009N	14	3.0	4	1.0	0.027	0.81	0.30 (0.08-0.99)
MICB*013	2	0.0	1	0.0	0.610		
MICB*018	1	0.0	3	1.0	0.595		
MICB*019	1	0.0	0	0.0	0.336		

Se toma como significativo cualquier valor de $P_c < 0.05$

En negritas alelos con valor de $P < 0.05$ pero con un valor de $P_c > 0.05$

OR=Razón de Momios

95% IC=Intervalo de Confianza al 95%

P=P exacta de Fisher

Pc=Corrección de Bonferroni

Tabla 4. Asociación de la frecuencia alélica del gen *MICB* en el grupo control y grupo de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix.

Alelo	Controles		Pacientes					
	2n=422	%	LIEBG		P	LIEAG		P
			2n=266	%		2n=124	%	
MICB*00201	28	7.0	18	7.0	0.946	8	6.0	0.942
MICB*00201v	8	2.0	9	3.0	0.156	6	5.0	0.068
MICB*003	6	1.0	4	2.0	0.930	2	2.0	0.876
MICB*00401	37	9.0	15	6.0	0.131	12	10.0	0.755
MICB*00401v	10	2.0	11	4.0	0.019	3	2.0	0.975
MICB*0050101	3	1.0	0	0.0	0.168	2	2.0	0.354
MICB*00502/*010	281	67.0	194	73.0	0.080	81	65.0	0.793
MICB*00503	1	0.0	2	1.0	0.318	0	0.0	0.587
MICB*00504	3	1.0	0	0.0	0.168	0	0.0	0.346
MICB*00505	12	3.0	4	2.0	0.256	7	6.0	0.135
MICB*008	3	1.0	3	1.0	0.567	0	0.0	0.346
MICB*009N	14	3.0	3	1.0	0.072	1	1.0	0.133
MICB*013	2	0.0	0	0.0	0.261	1	1.0	0.660
MICB*018	1	0.0	2	1.0	0.318	1	1.0	0.356
MICB*019	1	0.0	0	0.0	0.427	0	0.0	0.587

Se toma como significativo cualquier valor de $P < 0.05$

P=P exacta de Fisher

Pc=Corrección de Bonferroni

Tabla 5. Asociación de la frecuencia genotípica del gen *MICB* en el grupo control y grupo de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix.

Genotipo		Controles		Pacientes		P
		n=211	%	n=195	%	
MICB*00201	MICB*00201	0	0.0	1	1.0	0.298
MICB*00201	MICB*00201v	0	0.0	2	1.0	0.140
MICB*00201	MICB*003	0	0.0	1	1.0	0.298
MICB*00201	MICB*00401	1	0.0	1	1.0	0.955
MICB*00201	MICB*00502/*010	21	10.0	19	10.0	0.944
MICB*00201	MICB*00504	1	0.0	0	0.0	0.336
MICB*00201	MICB*009N	2	1.0	0	0.0	0.173
MICB*00201v	MICB*00502/*010	8	4.0	13	7.0	0.191
MICB*003	MICB*00401	2	1.0	1	1.0	0.609
MICB*003	MICB*00502/*010	4	2.0	4	2.0	0.910
MICB*00401	MICB*00502/*010	21	10.0	13	7.0	0.232
MICB*00401	MICB*00505	12	6.0	11	6.0	0.984
MICB*00401	MICB*008	0	0.0	1	1.0	0.298
MICB*00401	MICB*009N	1	0.0	0	0.0	0.336
MICB*00401v	MICB*0050101	0	0.0	1	1.0	0.298
MICB*00401v	MICB*00502/*010	9	4.0	13	7.0	0.286
MICB*00401v	MICB*013	1	0.0	0	0.0	0.336
MICB*0050101	MICB*00502/*010	3	1.0	1	1.0	0.354
MICB*00502/*010	MICB*00502/*010	99	47.0	101	52.0	0.326
MICB*00502/*010	MICB*00503	0	0.0	1	1.0	0.298
MICB*00502/*010	MICB*00504	2	1.0	0	0.0	0.173
MICB*00502/*010	MICB*008	3	1.0	2	1.0	0.718
MICB*00502/*010	MICB*009N	9	4.0	4	2.0	0.205
MICB*00502/*010	MICB*013	1	0.0	1	1.0	0.955
MICB*00502/*010	MICB*018	1	0.0	2	1.0	0.517
MICB*00502/*010	MICB*019	1	0.0	0	0.0	0.336
MICB*00503	MICB*018	0	0.0	1	1.0	0.298

Se toma como significativo cualquier valor de $P < 0.05$

P=P exacta de Fisher

Pc=Corrección de Bonferroni

Tabla 6. Asociación de la frecuencia genotípica del gen *MICB* entre pacientes de acuerdo al grado de lesión intraepitelial escamosa y controles sanos

Genotipo		Controles		Pacientes					
		n=211	%	LIEBG			LIEAG		
		n=211	%	n=133	%	P	n=65		P
MICB*00201	MICB*00201	0	0.0	1	1.0	0.207	0	0.0	-
MICB*00201	MICB*00201v	0	0.0	2	2.0	0.074	0	0.0	-
MICB*00201	MICB*003	0	0.0	0	0.0	-	1	2.0	0.065
MICB*00201	MICB*00401	1	0.0	1	1.0	0.741	0	0.0	0.587
MICB*00201	MICB*00502/*010	21	10.0	12	9.0	0.775	7	11.0	0.760
MICB*00201	MICB*00504	1	0.0	0	0.0	0.427	0	0.0	0.587
MICB*00201	MICB*009N	2	1.0	0	0.0	0.260	0	0.0	0.442
MICB*00201v	MICB*00502/*010	8	4.0	7	5.0	0.515	6	10.0	0.065
MICB*003	MICB*00401	2	1.0	0	0.0	0.260	1	2.0	0.659
MICB*003	MICB*00502/*010	4	2.0	4	3.0	0.505	0	0.0	0.275
MICB*00401	MICB*00502/*010	21	10.0	9	7.0	0.308	4	6.0	0.401
MICB*00401	MICB*00505	12	6.0	4	3.0	0.250	7	11.0	0.127
MICB*00401	MICB*008	0	0.0	1	1.0	0.207	0	0.0	-
MICB*00401	MICB*009N	1	0.0	0	0.0	0.427	0	0.0	0.587
MICB*00401v	MICB*0050101	0	0.0	0	0.0	0.209	1	2.0	0.065
MICB*00401v	MICB*00502/*010	9	4.0	11	8.0	0.122	2	3.0	0.714
MICB*00401v	MICB*013	1	0.0	0	0.0	0.587	0	0.0	0.587
MICB*0050101	MICB*00502/*010	3	1.0	0	0.0	0.167	1	2.0	0.912
MICB*00502/*010	MICB*00502/*010	99	47.0	72	54.0	0.192	29	47.0	0.984
MICB*00502/*010	MICB*00503	0	0.0	1	1.0	0.207	0	0.0	-
MICB*00502/*010	MICB*00504	2	1.0	0	0.0	0.260	0	0.0	0.442
MICB*00502/*010	MICB*008	3	1.0	2	2.0	0.951	0	0.0	0.345
MICB*00502/*010	MICB*009N	9	4.0	3	2.0	0.323	1	2.0	0.328
MICB*00502/*010	MICB*013	1	0.0	0	0.0	0.427	1	2.0	0.355
MICB*00502/*010	MICB*018	1	0.0	1	1.0	0.741	1	2.0	0.355
MICB*00502/*010	MICB*019	1	0.0	0	0.0	0.427	0	0.0	0.587
MICB*00503	MICB*018	0	0.0	1	1.0	0.207	0	0.0	-

Se toma como significativo cualquier valor de $P < 0.05$

P=P exacta de Fisher

Pc=Corrección de Bonferroni

9. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de los genes MIC pero la mayoría de las investigaciones se han enfocado a MICA por ser una molécula mucho más polimórfica que MICB. Existen numerosos estudios sobre la asociación de algunos polimorfismos del gen *MICB* con diferentes enfermedades (**Gambelunghé et al., 1999, Wiencke et al., 2001, González et al., 2004, Rodríguez-Rodero et al., 2006, Lü et al., 2006, Holdenrieder et al., 2006, Chung-Ji et al., 2007, López-Arbesu et al., 2007, Fernández-Morera et al., 2008, Field et al., 2008, Kopp et al., 2009**); sin embargo son pocos los estudios que han investigado la relación entre las variantes alélicas de MICB y Cáncer Cérvico Uterino o sus lesiones precursoras (**Holdenrieder et al., 2006, Jumnainsong et al., 2008**). Hasta donde sabemos este es el primer estudio del gen *MICB* relacionado con el desarrollo de Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Cérvix en población mexicana.

Después establecer las temperaturas de hibridación y lavado adecuadas para las sondas 42 previamente reportadas (**Fischer et al., 2000a**) y las 5 nuevas sondas diseñadas para la tipificación de los alelos de MICB, se caracterizó el polimorfismo de MICB sobre cada una de las muestras de los grupos de estudio.

Comparando la distribución alélica de MICB entre pacientes y controles, 14 alelos (MICB*00201, MICB*00201v, MICB*003, MICB*00401, MICB*00401v, MICB*0050101, MICB*00503, MICB*00504, MICB*00505, MICB*008, MICB*009N, MICB*013, MICB*018, MICB*019) fueron encontrados en el grupo de controles (**Tabla 1**); mientras en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de cérvix se identificaron 12 alelos (MICB*00201, MICB*00201v, MICB*003, MICB*00401, MICB*00401v, MICB*0050101, MICB*00503, MICB*00505, MICB*008, MICB*009N, MICB*013, MICB*018) (**Tabla 1**). Los alelos restantes no se detectaron, sugiriendo que estas variantes son muy raras en nuestra población. Los tres alelos más frecuentemente encontrados en ambos grupos fueron MICB*00201 (9%-11%), MICB*00401 (11%-11%) y MICB*00502/*010 (67%-71%) respectivamente, en contraste con los alelos MICB*003, MICB*0050101, MICB*00503, MICB*00504, MICB*00505, MICB*008, MICB*009N y MICB*018 que presentaron la menor frecuencia (del 3 al 1%), datos semejantes a los reportados para la tipificación de MICB en población Caucásica (Españoles); donde a diferencia de la población en estudio encontraron el alelo MICB*008 como uno de los más frecuentes y no encontraron el alelo MICB*009N (**González et al., 2003**); el cual se encontró en un 3.7% en población del Este de

Asia (**Komatsu-Wakui et al., 2001**), pero en una mayor frecuencia en Aborígenes Sudamericanos de Paraguay (**Kayano et al., 2002**).

Entre todos los alelos, MICB*009N se encontró con una mayor frecuencia dentro del grupo control en comparación con el grupo de pacientes (3%-1%) con una $p=0.027$; sin embargo cuando se calculó el valor de P corregida, éste resultó no estar asociado con ningún tipo de Lesión Intraepitelial Escamosa ($P_c=0.81$ y $OR=0.3$ con un $IC_{95\%}$).

No fue posible definir el alelo presente en varias muestras, clasificándolas dentro de 5 grupos de alelos posibles MICB*00201/*19, MICB*00401/*00505, MICB*00401/*020, MICB*00504/*022 y MICB*00502/*010; ya que, con excepción de las muestras clasificadas en este último grupo presentaron resultados ambiguos, mostrando un patrón de hibridación inesperado para algunas sondas, probablemente debido a una nueva substitución nucleotídica que revele una nueva variante alélica de MICB dentro de ésta población de estudio, por lo que dichas muestras deberán ser clonadas y secuenciadas por triplicado. Los grupos de alelos MICB*00201/*19, MICB*00401/*00505, MICB*00401/*020, MICB*00504/*022 se encontraron en 12 muestras del grupo control, mientras en el grupo de pacientes con LIEBG solo se detectó una muestra con el grupo MICB*00401/*00505.

En cambio el grupo MICB*00502/*010 quedó indefinido debido a que el SNP que los diferencia está presente en el exón 6 que no se amplificó en las muestras durante la reacción en cadena de la polimerasa; ya que los *primers* descritos en la literatura (**Fischer et al., 2000a**) utilizados para amplificar el gen *MICB* solo evalúan los exones que hasta ese momento se sabía presentaban polimorfismo, sin tomar en cuenta el descubrimiento de las recientes secuencias alélicas y establecimiento de la nueva nomenclatura para este gen por el *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* (**Marsh, 2005**). Este SNP se estudiará en un futuro por la técnica de SSP para definir MICB*00502 y MICB*010.

No se logró discriminar por completo entre los alelos de MICB*00201 (MICB*0020101 y MICB*0020102), MICB*00401 (MICB*0040101 y MICB*0040102) y MICB*00502 (MICB*0050201, MICB*0050202, MICB*0050203 y MICB*0050204), por que sus diferencias se encuentran dentro del intrón 1 que no fue estudiado. La diferencia entre los alelos MICB*0020101 y MICB*0020102 radica en una delección de 4 nucleótidos (TGTG) en el alelo MICB*0020102. Para MICB*004 la diferencia esta dada por el número de repeticiones del nucleótido timina (36 bases para MICB*0040101 y 17 bases en el alelo

MICB*0040102), más la delección de una citosina en la posición 614 para el primer alelo y 615 en el segundo alelo. En el grupo MICB*00502 al compararse las secuencias con el alelo MICB*0050201 existe un cambio de T por A en la posición 81 del alelo MICB*0050202, el alelo MICB*0050203 tiene una variación de G por A en la posición 1020 y por último el alelo MICB*0050204 presenta un SNP en la posición 2008 (A →C). Aunado a los SNPs, se presenta en la posición 254 24 repeticiones del nucleótido Timina en el alelo MICB*005020101, 10 repeticiones en MICB*00500502 y 23 repeticiones para los alelos MICB*0050203 y MICB*0050204 (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/seq/refs/micbref.htm>).

Las variantes alélicas de MICB denominadas como MICB*00201v y MICB*00401v [donde v significa variable (**Fisher et al., 2000b**)] mostraron un patrón de hibridación inesperado para la sonda 32 con el alelo MICB*00201 y 38 con el alelo MICB*00401, sondas que estudian los intrones 2 y 4 respectivamente, debido a que existe probablemente una nueva sustitución nucleotídica de G por A en la posición 7759 en el alelo designado como MICB*00201v y una inserción TGGGG en la posición 9121 dentro del alelo denominado MICB*00401v; tal y como lo reporta Fisher en diferentes líneas celulares linfoblastoides B (**Fisher et al., 2000b**), la cual se debe comprobar con la secuenciación; revelando posiblemente la presencia de nuevos alelos de MICB en la población de estudio. Aunque éstas variantes dentro de una región intrónica no influyen en el producto del gen, pueden tener alguna preponderancia en el origen de nuevos alelos de éste.

Con respecto al grupo MICB*00502/*010 es probable que el alelo MICB*00502 esté presente en la mayoría de nuestra población; ya que un estudio en población española determinó que 72 de cada 100 individuos fueron positivos para el alelo antes mencionado (**González et al., 2003**).

Comparando la distribución genotípica de MICB entre pacientes y controles no se encontraron diferencias significativas, pero fueron 8 los genotipos más frecuentemente hallados, el homocigoto *MICB*00502/*010/MICB*00502/*010* (47%), con los heterocigotos *MICB*00201/MICB*00502/*010* y *MICB*00401/MICB*00502/*010* (10%) para controles; mientras el homocigoto *MICB*00502/*010/MICB*00502/*010* (52%), con los heterocigotos *MICB*00201/MICB*00502/*010* (19%), *MICB*00201v/MICB*00502/*010*, *MICB*00401/MICB*00502/*010* y *MICB*00401v/MICB*00502/*010* (13%) se

encontraron en pacientes; siendo el homocigoto *MICB*00502/*010/MICB*00502/*010*, el genotipo más frecuente en nuestra población de estudio.

Aunque no se encontró alguna asociación entre el gen *MICB* y el desarrollo de lesiones precursoras al Cáncer Cérvico Uterino (LIEAG y LIEBG); pues ninguna variante alélica o genotípica parece proveer riesgo para desarrollar alguno de estos padecimientos tal como se reportó para una población del noreste de Tailandia (**Jumnainsong *et al.*, 2008**), dada la alta prevalencia del CaCu en la población femenina tanto a nivel mundial como en nuestro país (**OMS, 2007**), es importante seguir con estudios de asociación para encontrar marcadores genéticos que nos permitan evaluar el grado de riesgo o protección que puede tener un individuo para padecer ésta enfermedad; tomando en cuenta los criterios para la identificación y caracterización de determinantes genéticos en enfermedades multifactoriales (**Burton *et al.*, 2005**).

Los resultados obtenidos no mostraron ninguna asociación directa entre las variantes del gen *MICB* y el desarrollo de Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Cérvix posiblemente por una inadecuada selección de la muestra, por lo que hace falta determinar marcadores de ancestría que permitan estratificar nuestros grupos de estudio en base a su descendencia étnica por posibles falsos negativos ó positivos, debido a que existen diferencias genéticas entre poblaciones y nuestro país cuenta con una diversidad genética muy amplia (**Rubi-Castellanos *et al.*, 2009**).

A pesar de que la técnica de PCR-SSOP es la técnica de elección para sistemas altamente polimórficos cuando se van a analizar muchos individuos simultáneamente, su desarrollo puede también influir sobre los resultados obtenidos; ya que muchos factores pueden afectar los resultados y dificultar su interpretación, si no se tiene un control perfecto y riguroso sobre el uso de controles adecuados, las condiciones de trabajo y empleo de reactivos en cada uno de los pasos del procedimiento (**Perea *et al.*, 2001**).

10. CONCLUSIONES

La tipificación del polimorfismo del gen *MICB* mediante la técnica de PCR-SSOP en cada uno de nuestros grupos de estudio (casos-contróles) determinó que no existe asociación directa entre las frecuencias alélicas y genotípicas de *MICB* con el desarrollo de las Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Cérvix (LIEBG y LIEAG); estableciendo que éste gen no es un marcador genético para tal padecimiento dentro de la población de estudio.

Las sondas diseñadas para la tipificación de los nuevos alelos de *MICB* cumplieron satisfactoriamente con su función de alineamiento por complementariedad tras establecer las temperaturas de hibridación y lavado adecuadas.

Para tener un panorama más claro sobre la relación de *MICB* con alguno de éstos padecimientos es necesario hacer la estratificación de nuestros grupos de estudio en base a su descendencia étnica mediante marcadores de ancestría, realizar la clonación y secuenciación de los fragmentos amplificados que mostraron patrones de hibridación inusuales para verificar si existen o no nuevas variantes de este gen dentro de nuestra población, efectuar el estudio del SNP 11710 del exon 6 para definir los alelos *MICB**00502 y *MICB**010; así como realizar la tipificación de este gen dentro de población indígena y mestiza para determinar la distribución de *MICB* en población mexicana.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.** (2005). *Inmunología Celular y Molecular*. [Trad.] 5ª ed. Ed. Elsevier. Río de Janeiro. pp. 1156-1158.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S.** (2001). *Celular and Molecular Immunology*. 3ª. ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. New York. USA. pp. 1569-1573
- [Ades S](#), [Koushik A](#), [Duarte-Franco E](#), [Mansour N](#), [Arseneau J](#), [Provencher D](#), [Gilbert L](#), [Gotlieb W](#), [Ferenczy A](#), [Coutlée F](#), [Roger M](#), [Franco EL](#); [Biomarkers of Cervical Cancer Risk \(BCCR\) Study Team](#).** (2008). *Selected class I and class II HLA alleles and haplotypes and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. [nt J Cancer](#).15;122(12):2820-6.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.** (1996). *Biología Molecular de la Célula*. 3ra. ed. Ediciones Omega, S.A. pp. 1317-1335, 1346-1347 y 1353-1354.
- Alliance for Cervical Cancer Prevention.** (2004). *Prevención del Cáncer Cérvico Uterino*. Ficha Descriptiva.
- Ando H., Mizuki N., Ota M., Yamazaki M., Ohno S., Goto K., Miyata Y., Wakisaka K., Bahram S., Inoko H.** (1997). *Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB)*. Immunogenetics; 46:499-508.
- Anzai, T., Shiina, T., Kimura, N., Yanagiya, K., Kohara, S., Shigenari, A., Yamagata, T., Kulski, J.K., Naruse, T.K., Fujimori, Y., Fukuzumi, Y., Yamazaki, M., Tashiro, H., Iwamoto, C., Umehara, Y., Imanishim T., Meyer, A., Ikeo, K., Gojobori, T., Bahram, S., Inoko, H.** (2003). *Comparative sequencing of human and chimpanzee MHC class I regions unveils insertions/deletions as the major path to genomic divergence*. Proc Natl Acad Sci USA; 100:7708-7713.
- Aranega, J.A. y Cols.** (2002). *Aplicación de Técnicas de Biología Molecular en Genética Clínica*. GRANADA. España. pp. 9-25 y 53-70.
- Bahram, S.** *MIC genes: from genetics to biology*. (2000). Advances in immunology; 76:1-60.
- Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D.E., Spies, T.** (1994). *A second lineage of mammalian Major Histocompatibility Complex class I genes*. Proc Natl Acad Sci USA; 91:6259-6263.
- Bahram, S., Mizuk, N., Inoko, H., Spies, T.** (1996a). Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. Immunogenetics; 44:80–81.
- Bahram, S., Shiina, T., Oka, A., Tamiya, G., Inoko, H.** *Genomic structure of the human MHC class I MICB gene*. Immunogenetics (1996b). 45: 161–162.
- Bahram, S., Spies, T.** (1996c). *Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA*. Immunogenetics; 43:230–233.
- Bateman, A. et al.** (1999). *Human leukocyte antigens and cancer: Is it in our genes?*. J Pathol; 3:231-236.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips. J.H., Lanier, L.L., Spies, T.** (1999) *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science; 285:727–729.
- Berek, J.S., Hacker, N.F.** (2000). *Cervical cancer. Practical Gynecology Oncology*. 3th edition. Lippincott Williams & Wilkins . pp 180-203.
- Boyer, S.N., Wazer, D.E., Band, V.** (1996). *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*. Cancer Res, 56:4620-4.
- Brady, C.S., Bartholomew, J.S., Burt, D.J., Duggan-Keen, M.F., Glenville, S., Telford, N., Little, A.M., Davidson, J.A., Jimenez, P., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F., Stern, P.L.** (2000).

Multiple mechanism underlie HLA dysregulation in cervical cancer. Tissue Antigens. 55(5):401-411.

Broso, P.R., Buffetti, G. (1993). *The Papanicolaou classification in the Bethesda System (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland).* Minerva Ginecol; 45: 557-63.

Calleja-Macías, I.E., Kalantari, M., Allan, B., Williamson, A.L., Chung, L.P., Collins, R.J. et al. (2005). *Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and–b.* J Virol; 79:6565–6569.

Carayannopoulos, L.N., Naidenko, O.V., Fremont, D.H., Yokoyama, W.M. (2002). *Cutting edge: murine ULI6-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D.* J Immunol; 169:4079–4083.

Castañeda-Iñiguez, M. (1998). *Factores de riesgo para cáncer cervico uterino en mujeres de Zacatecas.* Salud Pública de México; (40) 4: 330-336.

Castellsague, X., Muñoz, N. (2003). *Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis- role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking.* J Natl Cancer Inst Monog, Bethesda; 31:20-28,

Castro FA, Haimila K, Pasanen K, Kaasila M, Patama T, Partanen J, Surcel HM, Pukkala E, Lehtinen M.(2007). *Geographic distribution of cervical cancer-associated human leucocyte antigens and cervical cancer incidence in Finland.* [nt J STD AIDS.](#) 18(10):672-9.

Clarke, B., Chetty, R. (2002). *“Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer”.* Molecular Pathology; 55(1):19–24.

Cogliano, V., et al. (2005). *Carcinogenicity of human papillomavirus.* Lancet Oncol; 6:204.

Coppleson, M., Dalrymple, J., Atkinson, K.H. (1993). *Diferenciación colposcópica de anomalías que surgen en la zona de transformación.* Clínicas de Ginecología y Obstetricia. Temas actuales. Colposcopia. Ed. McGraw Hill-Interamericana. México. pp. 83-103.

Cortinas, C. (1998). *Cáncer. Herencia y Ambiente.* La ciencia/96 para todos. pp. 1-24.

Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N.J. (2001). *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein ULI6 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor.* Immunity; 14:123–133.

Chaudhuri, S., Cariappa A., Tang, M. (2000). *Genetic susceptibility to breast cancer: HLA DQB*03032 and HLA DRB1*11 may represent protective alleles.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97. Issue 21. pp. 11451-11454.

Checa, M.A. (2007). *Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones.* REV INST NAL ENF RESP MEX. VOLUMEN 20. NÚMERO 3. p.p. 213-221

Chen JR, Lee YJ, Chen T, Wang KL, Dang CW, Chang SC, Liu HF, Yang YC. (2005). *MHC class I chain-related gene A (MICA) polymorphism and the different histological types of cervical cancer.* [Neoplasma.](#) 52(5):369-73.

Choy, M., Phipps M. E. (2003). *Possible Polyphyletic Origin of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A (MICA) Alleles.* J Mol Evol; 57:38–43.

Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C., Spies, T., Bukowski, J.F. (2001). *MIC engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function.* Immunity, 15:83–93.

Davis, M. M., J. J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. (1998). *Ligand recognition by T cell receptors.* Annu. Rev. Immunol. 16:523.

De Sanjose, S., Palefsky, J. (2002). *“Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men”.* Virus Research; 89(2):201–211.

- de Villiers**, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*; 324:17–27.
- degradation of p53*. *Cell*, 63:1129-1136.
- Depriest**, P.D., Van, J.R., Powell, D.E. (1990). *Microinvasive cervical cancer*. *Clin Obstet Gynecol*; 33:846-51.
- Diefenbach**, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., Raullet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*;413:165–171.
- Eiguchi K**, **Tatti S**, **Alonio LV**, **González JV**, **Leirós GJ**, **Fleider L**, **Vighi S**, **Padros K**, **Raimondi E**, **Teyssié A**, **Picconi MA**. (2008). *Association of DRB1 and DQB1 HLA class II polymorphisms in high-grade and neoplastic cervical lesions of women from Argentina*. *J Low Genit Tract Dis*. 12(4):262-8.
- Elsner**, H.A., Schroeder, M., Blasczyk, R. (2001). *The nucleotide diversity of MICA and MICB suggests the effect of overdominant selection*. *Tissue Antigens* 58:419–421.
- Evander**, M., Frazer, I.H., Payne, E. (1997). *Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomavirus*. *J Virol*, v. 71, p. 5449-5459.
- Fan**, X., Chen, J.J. (2004). *Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 14:183-202.
- Farfán-Muñoz**, LC., Barrón-Treviño, E., Jiménez-Domínguez M.E., Vázquez-Morán, E., Ayala-Atrián, S.S. (2004). *Factores socioculturales en mujeres que no acuden a detección oportuna de cáncer Cérvico Uterino*. *Rev. Enferm. IMSS*; 12(3): 123-130.
- Fernández-Morera** JL, Rodríguez-Rodero S, Tunon A, Martínez-Borra J, Vidal-Castineira JR, Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Rodrigo P, González S, Lahoz CH, Lopez-Larrea C. (2008a). *Genetic influence of the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule MICB in multiple sclerosis susceptibility*. *Tissue Antigens*. 72(1):54-9.
- Fernández-Morera**, J.L., Rodríguez-Rodero, S., Lahoz, C., Tuñon, A., Astudillo, A., Garcia-Suarez, O., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., Rodrigo, L., Gonzalez, S., López-Larrea, C. (2008b). *Soluble MHC class I chain-related protein B serum levels correlate with disease activity in relapsing– remitting multiple sclerosis*. *Human Immunology*; 69:235–240.
- Field**, S.F., Nejentsev, S., Walker, N.M., Howson, J.M.M., Godfrey, L.M., Jolley, J.D., Hardy, M.P.A., Todd, J.A. (2008). *Sequencing-Based Genotyping and Association Analysis of the MICA and MICB Genes in Type 1 Diabetes*. *Diabetes* 57:1753–1756.
- Figuroa**, F., Gunther, E., Klein, J. (1988). MHC polymorphism pre-dating speciation. *Nature* 335: 265–267.
- Fischer**, G., Argüello, J.R., Pérez-Rodríguez, M., McWhinnie, A., Marsh, S.G.E., Travers, P.J., Madrigal, J.A. (2000a). *Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B*. *Immunogenetics*. 51:591–599.
- Fischer**, G., Pérez-Rodríguez, M., Argüello, J.R., Cox, S.T., McWhinnie, A., Travers, P.J., Madrigal, J.A. (2000b). *Three novel MICB alleles*. *Tissue Antigens*. 55: 166–170.
- Fowler**, N.L., Frazer, I.H. (2004). *Mutations in TAP genes are common in cervical carcinomas*. *Gynecol Oncol*; 92: 914-21.
- Franco**, E.L., Franco, E.D., Ferenczy, A. (2001). *Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection*. *CMAJ*; 164(7).
- Frenk-Mora**, J., Ruelas-Barajas E., Tapia-Conyer R. (2002). *Programa de Acción: Cáncer Cérvico Uterino*. Secretaría de Salud. pp. 17-21.
- Gaffikin**, L., Ahmed, S., Chen, Y.Q. (2003). *“Risk factors as the basis for triage in low-resource cervical cancer screening programs”*. *International Journal of Obstetrics and Gynecology*; 80:41–47.

- Gambelunghe, G., Falorni, A., Ghaderi, M., Laureti, S., Tortoioli, C., Santeusano, F., Brunetti, P., Sanjeevi, C.B. (1999).** *Microsatellite Polymorphism of the MHC Class I Chain-Related (MIC-A and MIC-B) Genes Marks the Risk for Autoimmune Addison's Disease.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism; 84(10):3701-3707.
- Gao, X., Single, R. M., Karacki, P., Marti, D., O'Brien, S. J., Carrington, M. (2006).** *Diversity of MICA and Linkage Disequilibrium with HLA-B in Two North American Populations.* Human Immunol, New York; 67:152-158.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., Raulet, D.H. (2005).** The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. Nature; 436:1186–1190.
- Gasser, S., Raulet, D.H. (2006).** The DNA damage response arouses the immune system. Cancer Res.; 66:3959–3962.
- Gaudieri, S., Giles, K.M., Kulski, J.K., Dawkins, R.L. (1997).** *Duplication and polymorphism in the MHC: Alu generated diversity and polymorphism within the PERB11 gene family.* Hereditas; 127:37–46.
- Ghaderi M, Hjelmström P, Hallmans G, Wiklund F, Lenner P, Dillner J, Sanjeevi CB. (1999).** MICA gene polymorphism and the risk to develop cervical intraepithelial neoplasia. [Hum Immunol.](#) 60(10):970-3.
- Ghaderi M, Nikitina Zake L, Wallin K, Wiklund F, Hallmans G, Lenner P, Dillner J, Sanjeevi CB. (2001).** Tumor necrosis factor A and MHC class I chain related gene A (MIC-A) polymorphisms in Swedish patients with cervical cancer. [Hum Immunol.](#) 62(10):1153-8.
- Glas, J., Martin, K., Brunnler, G., Kopp, R., Folwaczny, C., Weiss, E.H., Albert, E.D. (2001).** *MICA, MICB and C1_4_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis.* Tissue Antigens; 58:243– 249.
- González, S., Rodrigo, L., López-Vázquez, A., Fuentes, D., Agudo-Ibáñez, L., Rodríguez-Rodero, S., Fdez-Morera, J.L., Martínez-Borra, J., López-Larrea, C. (2004).** *Association of MHC Class I Related Gene B (MICB) to Celiac Disease.* American Journal of Gastroenterology; 676-680.
- González, S., Rodríguez-Rodero, S., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., Rodrigo L., López-Larrea, C. (2003).** *MICB typing by PCR amplification with sequence specific primers.* Immunogenetics; 54:850–855.
- Gostout, B.S., Podratz, K.C., McGovern, R.M., et al. (1996).** *HLA Association with Cervix Cancer in Indian Women.* Gynecol Oncol; 62: 415.
- 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; 93:12445–12450.
- Groh, V., Brühl, A., El-Gabalawy, H., Nelson, J.L., Spies, T. (2003).** *Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in reumathoid arthritis.* Proc Natl Acad Sci USA; 100 (16):9452- 9457.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., Spies, T. (2001).** *Costimulation of CD8 alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.* Nat. Immunol.; 2:255–260.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., Spies, T. (1999).** *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor derived gamma delta T cells of MICA and MICB.* Proc Natl Acad Sci USA; 96:6879–84.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., Spies, T. (1998).** *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells.* Science; 279:1737–1740.

- 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,
- Gudmundsdottir, I. et al.** (2000). *Altered expression of HLA class I antigens in breast cancer: association with prognosis*. *Int J. Cancer*. Nov: 500-505.
- Guillaudeux, T., Janer, M., Wong, G.K.S., Spies, T., Geraghty, D.E.** (1998). *The complete genomic sequence of 424,015 bp at the centromeric end of the HLA class I region: Gene content and polymorphism*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 95, pp. 9494–9499.
- Günther, E., Walter, L.** (2001). *The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*)*. *Immunogenetics*; 53:520–542.
- Hankey, K.G., Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Klassen, D.K., Philosophe, B., Bartlett, S.T.** (2002). *MIC expression in renal and pancreatic allografts*. *Transplantation*;73:304.
- Hawkins, B.E.** (1981). *TABLE OF CRITICAL CHI-SQUARE VALUES FOR INVESTIGATIONS INVOLVING MULTIPLE COMPARISONS*. *Tiss. Ant.* 17:243.
- Hill, A.V.** (2001). *The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility*. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2:373–400.
- Hoffbrand, A. V., Catovsky, D., Tuddenham, E.G.D.** (2005). *Postgraduate Haematology: introduction*. pp 414.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., Nagel, A.P.D., Steinle, A., Salih, H.R.** (2006). *Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA*. *Cancer Immunol Immunother*; 55:1584–1589.
- Holmes M.A., Li P., Petersdorf, E.W., Strong R.K.** (2002). *Structural Studies of Allelic Diversity of the MHC Class I. Homolog MIC-B, a Stress-Inducible Ligand for the Activating Immunoreceptor NKG2D1*. *The Journal of Immunology*; 169:1395–1400.
- Horton, R., Gibson, R., Coghill, P., Miretti, M., Allcock, R.J., Almeida, J., Forbes, S., Gilbert, J.G.R., Halls, K., Harrow, J.L., Hart, E., Howe, K., Jackson, D.K., Palmer, S., Roberts, A.N., Sims, S., Stewart, C.A, Traherne, J.A., Trevanion, S., Wilming, L., Rogers, J., de Jong, P.J., Elliott, J.F., Sawcer, S., Todd, J.A, Trowsdale, J., Beck, S.** (2008). *Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: The MHC Haplotype Project*. *Immunogenetics.* 60:1–18. *Human Immunology* 66, 1022–1024.
- Hughes EH, Collins RW, Kondeatis E, Wallace GR, Graham EM, Vaughan RW, Stanford MR.** (2005). *Associations of major histocompatibility complex class I chain-related molecule polymorphisms with Behcet's disease in Caucasian patients*. *Tissue Antigens.* 66(3):195-9.
- Illades-Aguilar, B., Cortes-Malagon, E.M, Antonio-Vejar, A., Zamudio-Lopez, N., Alarcon-Romero, L.C., Fernandez-Tilapa, G., Hernandez-Sotelo, D., Teran-Porcayo, M.A., Flores-Alfaro, E., Leyva-Vazquez, M.A.** (2008). *Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors*. *Cancer Detection and Prevention*. Article in press.
- Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V.** (2005). *Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos*. *Gac Sanit.* 19(4):333-341.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.** (2009). *“ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER”*. Revisado el 4 de febrero del 2009 en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/default.asp?c=269&e=>.; en el portal: www.inegi.org.mx.
- Ioannidu, S., Walter, L., Dressel, R., Günther, E.** (2001). *Physical map and expression profile of genes of the telomeric class I gene region of the rat MHC*. *J Immunol*; 166:957–3965.

- [Ivansson EL](#), [Magnusson JJ](#), [Magnusson PK](#), [Erlich HA](#), [Gyllensten UB](#). (2008). *MHC loci affecting cervical cancer risk: distinguishing the effects of HLA-DQB1 and non-HLA genes TNF, LTA, TAP1 and TAP2*. [Genes Immun.](#) 9(7):613-23. Epub 2008 Jul 24.
- Janeway**, C.A. Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2003). *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2ª ed. Ed. MASSON. Barcelona. pp. 105 y 155-184.
- Jensen**, A.B., Lancaster, W.D. (1990). *Papillomavirus and human cancer*. Boca Raton: CRC Press.
- Jeon**, S., Lambert, P.F. (1995). *Integration of human papillomavirus type 16 DNA into human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 92: 1654-1658.
- Jinushi**, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Kimura, R., Miyagi, T., Mochizuki, K., Sasaki, Y., Hayashi, N. (2003). *Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid*. *Int. J. Cancer*; 104:354–361.
- Jumnainsong** A, Romphruk AV, Jearanaikoon P, Klumkrathok K, Romphruk A, Luanrattanakorn S, Leelayuwat C. (2007). Association of polymorphic extracellular domains of MICA with cervical cancer in northeastern Thai population. *Tissue Antigens*. 69(4):326-33.
- Jumnainsong**, A., Jearanaikoon, P., Khahmahpahte, S., Wongsena, W., Romphruk, A. V., Chumworathayi, B., Vaeteewoottacharn, K., Ponglikitmongkol, M., Romphruk, A., Leelayuwat, C. (2008). *Associations of MICB with cervical cancer in north-eastern Thais: identification of major histocompatibility complex class I chain-related gene B motifs influencing natural killer cell activation*. *Clinical and Experimental Immunology*. 153: 205–213.
- Kayano**, Aida, Russomando, G., Kikuchi, M., Candia, N., Franco, L., Almiron, M., Ubalee, R., Hirayama, K. *High frequency of MIC null haplotype (HLA-B48-MICA-del-MICB*0107 N) in the Angaité Amerindian community in Paraguay*. *Immunogenetics* (2002) 54:439–441
- Kelley**, J., Walter, L., Trowsdale, J. (2005). *Comparative genomics of major histocompatibility complexes*. *Immunogenetics*. 56: 683–695.
- Kimura**, T., Goto, K., Yabuki, K., Mizuki, N., Tamiya, G., Sato, M., Kimura, M., Inoko, H., Ohno, S. *Microsatellite Polymorphism Within the MICB Gene Among Japanese Patients with Behcet's Disease*. (1998). *Human Immunology*; 59:500–502.
- Kiviat**, N. (1996). *Natural history of cervical neoplasia: overview and update*. *Am J Obstet Gynecol*; 175:1099-1104.
- Kjellberg**, L., Hallmans, G., Ahren, A.M., Johansson, R., Bergman, F., Wadell, G., Angstrom, T., Dillner, J. (2000). *Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection*. *Br. J. Cancer*; 82: 1332-8.
- Klein**, J., Sato, A. (2000). *The HLA system. First of two parts*. *New Engl. J. Med.* 343:702-709.
- [Kohaar I](#), [Hussain S](#), [Thakur N](#), [Tiwari P](#), [Nasare V](#), [Batra S](#), [Singh V](#), [Bhambani S](#), [Das BC](#), [Sarkar DP](#), [Bharadwaj M](#). (2009). *Association between human leukocyte antigen class II alleles and human papillomavirus-mediated cervical cancer in Indian women*. [Hum Immunol.](#) 70(4):222-9.
- Komatsu-Wakui**, M., Tokunaga, K., Ishikawa, Y., Leelayuwat, C., Kashiwase, K., Tanaka, H., Moriyama, S., Nakajima, F., Park, M.H., Jia, G.J., Chinge, N.O., Sideltseva, E.W., Juji, T.

- (2001). *Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians*. *Tissue Antigens*. Jan;57(1):1-8.
- Koopman, L. et al.** (1999). *Human leukocyte antigen Class I- gene mutations in cervical cancer*". *Journal of the National Cancer Institute*. Oct: 1669-1673.
- Kopp, R., Glas, J., Lau-Werner, U., Albert, E.D., Weiss, E.H.** (2009). *Association of MICA-TM and MICB C1_2_A Microsatellite Polymorphisms with Tumor Progression in Patients with Colorectal Cancer*. *J Clin Immunol*.
- Kulski, J.K., Dunn, D.S., Hui, J., Martinez, P., Romphruk, A.V., Leelayuwat, C., Tay, G.K., Oka, A., Inoko, H.** (2002). *Alu polymorphism within the MICB gene and association with HLA-B alleles*. *Immunogenetics*; 53:975–979.
- Kulski, J.K., Gaudieri, S, Martin, A, Dawkins, R.L.** (1999). *Co-evolution of PERB11 (MIC) and HLA class I genes with HERV-16 and retroelements by extended genomic duplication*. *J Mol Evol*; 49:84–97.
- Kumanovics, A., Madan, A., Qin, S., Rowen, L., Hood, L., Fischer-Lindahl, K.** (2002). *QUOD ERAT FACIENDUM: sequence analysis of the H2-D and H2-Q regions of 129/SvJ mice*. *Immunogenetics*; 54:479–489.
- Kurman, R.J. et al.** (1994). *The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis*. New York. Springer Verlag.
- Kwiatkowski, D.** (2000a). *Science, medicine, and the future: susceptibility to infection*. *BMJ*; 321:1061–1065.
- Kwiatkowski, D.** (2000b). *Genetic dissection of the molecular pathogenesis of severe infection*. *Intensive Care Med*. 26:S89–97.
- Leelayuwat, C., Townend, D. C., Degli-Esposti, M. A., Abraham, L. J., Dawkins, R. L.** (1994). *A new polymorphic and multi-copy MHC gene family related to nonmammalian class I*. *Immunogenetics*; 40:339-351.
- Lehn, H., Villa, L.L., Marziona, F., Hilgarth, M., Hillemans, H.G., Sauer, G.** (1988). *Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract*. *Journal of General Virology*, 69: 187-196.
- Lerma, E., Romero, M., Gallardo, A., Fuentes, J., Lloveras, B., Bussaglia, E., Prat, J.** (2005). *SNPs in -670 fas promoter as a risk factor for squamous cell carcinoma of cervix*. *Diagn Mol Pathol* (in press).
- Lewis, B.P., Green, R.E., Brenner, S.E.** (2003). *Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans*. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:189.
- Lewis, M.J.** (2004). *Análisis de la situación del cáncer cérvico uterino en América Latina y el Caribe*. Washington, D.C. OPS/OMS.
- Li, P., McDermott, G., Strong R.K.** (2002). *Crystal Structures of RAE-1 β and Its Complex with the Activating Immunoreceptor NKG2D*. *Immunity*. Vol. 16:77–86.
- Li, P., Morris, D.L., Willcox, B.E., Steinle, A., Spies, T., Strong, R.K.** (2001). *Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA*. *Nat Immunol*; 2:443–451.
- Li, Y., Xia, B., Lü, M., Ge, L.Q., Li, C., Luo, Y., Jiang, T.** (2008). *An association between MICB 0106 allele and ulcerative colitis in Chinese Han in Hubei province*. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 47(3):213-6.
- Liang J, Xu A, Xie Y, Awonuga AO, Lin Z.**(2008). *Some but not all of HLA-II alleles are associated with cervical cancer in Chinese women*. [Cancer Genet Cytogenet](#). 187(2):95-100.

- Lodish, H.**, Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2002). *Biología celular y Molecular*. 4ta. edición. Ed. Médica Panamericana. pp. 1055-1063.
- López-Arbesu, R.**, Ballina-García, F. J., Alperi-López, M., López-Soto, A., Rodríguez-Rodero, S., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., Fernández-Morera, J. L., Riestra-Noriega, J. L., Queiro-Silva, R., Quiñones-Lombrana, A., López-Larrea, C., González, S. (2007). *MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility*. *Rheumatology*; 46:426–430.
- López-Cruz, J.**, Hernández-Martínez, A.C., Gutiérrez-Vega, P.A, Platón-Flores, J. (2006). *Nomenclatura de las lesiones precursoras del cáncer cérvico uterino*. *Rev Sanit Milit Mex*; 60(6). Nov-Dic: 406-410.
- Lü, M.**, Xia, B., Li, J., Ye, M., Zhang, X., Tan, Q. (2006). *MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population*. *Clinical Immunology*; 120:199—204.
- Lynch, K.W.** (2004). *Consequences of regulated PRE-mRNA splicing in the immune system*. *Nat Rev Immunol*; 4:931.
- Maciag, P.C.**, Villa, L.L. (1999). *Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32: 915-992
- Madeleine MM, Johnson LG, Smith AG, Hansen JA, Nisperos BB, Li S, Zhao LP, Daling JR, Schwartz SM, Galloway DA.** (2008). *Comprehensive analysis of HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 loci and squamous cell cervical cancer risk*. [Cancer Res](#). 2008 May 1;68(9):3532-9.
- Magnusson, P.K.**, Sparen, P., Gyllensten, U.B. (1999). *Genetic link to cervical tumors*. *Nature*; 400: 29-30.
- Maniatis, T.**, Tasic, B. (2002). *Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans*. *Nature*; 418:236.
- Marinic, K.**, Habegger de Sorrentino, A., Castillo, Odena M., B. de Mozzati, A., Motta P., M. de Civetta, M. (2000). *Alelos de antígeno leucocitario humano (HLA) clase I en pacientes con cáncer de mama y cuello uterino*. *ONCOLOGIA CLINICA*. Vol. VIII. N° 3. pp. 885 – 888.
- Marsh Steven G. E.** (2005). *Nomenclature for Factors of the HLA System, Update May 2005*.
- Marsh, Steven G.E.**, Parham, P., Barber, L.D. (2000). *THE HLA*. Ed. Academic Press. San Diego Ca. USA. pp. 14, 26 y 44.
- Martínez-Borra, J.**, Rodrigo, L., Rodríguez-Rodero, S., Fernandez-Morera, J.L., Diaz-Peña, R., Pruneda, L., López-Vázquez, Antonio, López-Larrea, C. (2007). *The allele MICB*0050204, over-represented in the Caucasian population, has an additional exon resulting from a new splice junction sequence*. *Human Immunology*; 68:705–707.
- Miretti, M.M.**, Walsh, E.C., Ke, X., Delgado, M., Griffiths, M., Hunt, S., Morrison, J., Whittaker, P., Lander, E.S., Cardon, L.R., Bentley, D.R., Rioux, J.D., Beck, S., Deloukas, P. (2005). *A High-Resolution Linkage-Disequilibrium Map of the Human Major Histocompatibility Complex and First Generation of Tag Single-Nucleotide Polymorphisms*. *Am. J. Hum. Genet*. 76:634–646.
- Molinero, L.L.**, Fuertes, M.B., Girart, M.V., Fainboim, L., Rabinovich, G.A., Costas, M.A., Zwirner, N.W. (2004). *NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes*. *J. Immunol*; 173:5583–5590.
- Muñoz, N.**, Bosch, F.X., Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J. (2003). *International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. *N Engl J Med*; 348 (6):518-527.

- Muñoz, N.**, Castellsague, X., Berrington de González, A., Gissmann, L. (2006). *HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine; 24S3. S3/1–10.
- Nakachi, K.**, Hayashi, T., Imai K., Kusunoki, Y. (2004). *Perspectives on cancer immunology*. Cancer Sci | December | vol. 95 | no. 12 | 921–929.
- Nathan, C.** (2002). *Points of control in inflammation*. Nature; 420: 846–452.
- Nishimura, M.**, Furumoto, H., Kato, T., Kamada, M., Aono, T. (2000). *Microsatellite instability is a late event in the carcinogenesis of uterine cervical cancer*. Gynecol Oncol, 79:201-206.
- Okamoto, K.**, Makino S., Yoshikawa Y., Takaki A., Nagatsuka Y., Ota M., Tamiya G., Kimura A., Bahram S., Inoko H. (2003). *Identification of IkBL as the Second Major Histocompatibility Complex–Linked Susceptibility Locus for Rheumatoid Arthritis*. Am. J. Hum. Genet. 72:303–312.
- Organización Mundial de la Salud.** (2007). *Control integral del cáncer cervicouterino. Guía de prácticas esenciales*. pp. ANOTAR.
- Organización Mundial de la Salud.** (2009). *Cáncer*. Nota descriptiva N°297. Revisado el 6 de enero de 2009 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
- Parkin, D.M.**, Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005). *Global cancer statistics, 2002*. Cancer J Clin; 55:74-108.
- Pellet P.**, Renaud, M., Fodil, N., Laloux, L., Inoko, H., Hauptmann, G., Debre´, P., Bahram, S., Theodorou, I. (1997). *Allelic repertoire of the human MICB gene*. Immunogenetics; 46: 434–436.
- Pellet, P.**, Vaneensberghe, C., Debre, P., Sumyuen, M.H., Theodorou, I. (1999). *MIC genes in non-human primates*. Eur J Immunogenet; 26:239–241.
- Perea, J.**, Torno, A., García, J.L. (2001). *Ingeniería Genética. Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA*. Vol. I. Ed. Síntesis. pp. 57-65 y 82-98.
- Raulet, D.H.** (2003). *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*. Nat Rev Immunol; 3: 781–790.
- Richart, R. M.** (1990). *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia*. Obstet Gynecol; 75: 131-133.
- Rodríguez-Rodero, S.**, Rodrigo L., Fdez-Morera, J.L., Martínez-Borra, J., Lopez-Vázquez, A., Fuentes, D., Lopez-Arbesu, R., Lopez-Soto, A., Gonzalez, S., Lopez-Larrea, C. (2006). *MHC Class I Chain-Related Gene B Promoter Polymorphisms and Celiac Disease*. Human Immunology; 67:208–214.
- Roitt, I.**, Brostoff, J., Male, D. (2000). *INMUNOLOGIA*. 5ª. ed. Ed. Harcoart, S.A. Madrid España. pp. 1-2, 6, 14, 85-86.
- Rojas-Hernández, R.** (2006). *Panorama del cancer Cervico Uterino en México*. Secretaria de Salud de Guanajuato. CONCYTEG. pp. 2-5.
- Rubi-Castellano, R.**, Martínez-Corté, G., Muñoz-Valle, J.F., González-Martín, A., Cerda-Flores, R.M., Anaya-Palafox, M., Rangel-Villalobos, H. *Pre-Hispanic Mesoamerican demography approximates the present-day ancestry of Mestizos throughout the territory of Mexico*. (2009). [American Journal of Physical Anthropology](#). [Volume 139](#). [Issue 3](#), Pages 284 – 294.
- Rueda, B. P.**, López-Nevot, M., González, M. A. Martín, E. J. (2002). *A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven repeats*. Tissue Antigens. 60(6):526-528.
- Salih, H.R.**, Goehlsdorf, D., Steinle, A. (2006). *Release of MICB Molecules by Tumor Cells: Mechanism and Soluble MICB in Sera of Cancer Patients*. Human Immunology; 67:188–195.

- Scheffner**, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., Howley, P. (1990). *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell, 63: 1129-1136
- Schiffman**, M.H., Brinton, L.A. (1995). *The Epidemiology of Cervical Carcinogenesis*. CANCER Supplement. Vol. 76. No. 10. p.p. 1888-1901.
- Seo**, J.W., Bontrop, R., Walter, L., Günther, E. (1999). *Major histocompatibility complex-linked MIC genes in rhesus macaques and other primates*. Immunogenetics; 50:358–362.
- Shiina**, T., Tamiya, G., Oak, A., Talihina, N., Yamagata, T., Kikkoman, E., Iwata, K., Tomahawk, M., Kuaka, N., Kwan, Y., Watanabe, K., Fukuzumi, Y., Itakura, S., Sugawara, C., Ono, A., Yamazaki, M., Tashiro, H., Ando, A., Ikemura, T., Soeda, E., Kimura, M., Bahram, S., Inoko, H. (1999a). *Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region*. PNAS. Vol. 96 / No. 23 / 13282–13287.
- Shiina**, T., Tamiya, G., Oka, A., Takishiina, N., Inoko, H. (1999b). *Genome Sequencing Analysis of the 1.8 Mb Entire Human MHC Class I Region*. Immunol. Rev. 167:193-199.
- Smith**, J.S., Herrero, R., Bosetti, C. *et al.* (2002). “*Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer*”. Journal of the National Cancer Institute; 94(21):1604–1613.
- Solomon**, D. *et al.* (2002). *The 2001 Bethesda system*. JAMA; 287:2114.
- Solomon**, D., Nayart, R. (2004). *The Bethesda system for reporting cervical cytology*. 2nd. ed. New Cork. Springer.
- Spreu**, J., Stehle, T., Steinle, A. (2006). *Human cytomegalovirus-encoded UL16 discriminates MIC molecules by their alpha2 domains*. J Immunol; 177:3143–3149.
- Springer**, P. C., Turner, A. G., Mc Lennan, A.D. Bates, M.R., White, H. (2000). *Molecular Biology*. Second edition. pp. 42-44.
- Steinle**, A., Groh, V., Spies, T. (1998). *Diversification, expression, and $\gamma\delta$ T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules*. Proc Natl Acad Sci USA; 95:12510–12515.
- Stephens**, H. A. F. (2001). *MIC and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?*. Trends Immunol.; 22:378–385.
- Steven**, P. (2000). *Oncología Ginecologica*. 2da. ed. Ed. Marban. pp. 85-92.
- Stewart**, C.A., Horton, R., Allcock R.J.N., Ashurst, J.L., Atrazhev, A.M., Coggill, P., Dunham, I., Forbes, S., Halls, K., Howson, J.M.M., Humphray, S.J., Hunt, S., Mungall, A.J., Osoegawa, K., Palmer, S., Roberts, A.N., Rogers, J., Sims, S., Wang, Y., Wilming, L.G., Elliott, J.F., de Jong, P.J., Sawcer, S., Todd, J.A., Trowsdale, J., Beck, S. (2004). *Complete MHC Haplotype Sequencing for Common Disease Gene Mapping*. Genome Res. 14: 1176-1187.
- Svejgaard**, A., Ryder, L. P. (1994). *HLA AND DISEASE ASSOCIATIONS: DETECTING THE STRONGEST ASSOCIATION*. Tiss. Ant. 43:18.
- Szarewski**, A., Cuzick, J. (1998). “*Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence*”. *Journal of Epidemiological Biostatistics*; 3:229–256.
- Tamayo**, ALS. (2002). *Asociación y predicción del riesgo de lesión intraepitelial escamosa y cáncer cervicouterino en función de los factores: infección por el virus del papiloma humano, ginecoobstétricos, comportamiento sexual, sociodemográficos y antecedentes genéticos en mujeres mayores de 15 años*. Estado de Colima, México. Tesis doctoral. Universidad de Colima.
- Thompson**, M.W., McInnes, R. R., Willar, H. F. (1994). *Genetics in Medicine*. 5th edition. W. B. Saunders Company.

- Torres, L.A., Rojo, H., Torres, R.A., Hurtado, E.G.** (2004). Cáncer del cuello uterino. Panorama actual de su epidemiología y de sus factores de riesgo. *Ginecol Obstet Mex*;72: 466-474.
- Tosh, K., Ravikumar, M., Bell, J.T., Meisner, S., Hill, A.V.S., Pitchappan, R.** (2006). *Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India.* *Human Molecular Genetics*; 15(19):2880–2887.
- Traherne, J.A., Horton, R., Roberts, A.N., Miretti, M.M., Hurles, M.E., Stewart, C.A., Ashurst, J.L., Atrazhev, A.M., Coggill, P., Palmer, S., Almeida, J., Sims, S., Wilming, L.G., Rogers, J., de Jong, P.J., Carrington, M., Elliott, J.F., Sawcer, S., Todd, J.A., Trowsdale, J., Beck, S.** (2006). *Genetic Analysis of Completely Sequenced Disease-Associated MHC Haplotypes Identifies Shuffling of Segments in Recent Human History.* *PLOS Genetics*. Volume 2 | Issue 1 | e9.
- Van, Kaer L.** (2001). *Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides.* *Immunol. Res.* Vol.23-2/3. p.p. 205-214.
- Venables, J.P.** (2004). *Aberrant and alternative splicing in cancer.* *Cancer Res*; 64:7647.
- Walboomers, J.M.M, Jacobs, M.V, Manos, M.M y cols.** (1999). *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.* *J Pathol*; 189: 12-19.
- Wang, H., Ruan, Z., Wang Y., Han, J., Fu, X., Zhao, T., Yang, D., Xu, W., Yang, Z., Wang, L., Chen, Y., Wu, Y.** (2008). *MHC class I chain-related molecules induced on monocytes by IFN- γ promote NK cell activation.* *Molecular Immunology*; 45:1548–1556.
- Waxman, G.A.** (2005). *Guidelines for cervical cancer screening: History and scientific rationale.* *Clin Obst Gyn*; 48(1):77-97.
- Wick, M.J.** (2000). *Diagnosis of human papillomavirus gynaecologic infections.* *Clin Lab Med*; 20:271-87.
- Wiенcke, K., Spurkland, A., Schrumpf, E., Boberg, K.M.** (2001). *Primary Sclerosing Cholangitis Is Associated to an Extended B8-DR3 Haplotype Including Particular MICA and MICB Alleles.* *Hepatology*; 34(4): 625-630.
- Woodman, C. B. J., Collins, S. I., Young, L.S.** (2007). [*The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues.*](#) *Nature Reviews Cancer*.7:11-22.
- Wu, J., Chalupny, N. J., Manley, T.J., Riddell, S.R., Cosman, D., Spies, T.** (2003a). *Intracellular Retention of the MHC Class I-Related Chain B Ligand of NKG2D by the Human Cytomegalovirus UL16 Glycoprotein.* *The Journal of Immunology*; 170: 4196–4200.
- Wu, J., Groh, V., Spies, T.** (2002). *T Cell Antigen Receptor Engagement and Specificity in the Recognition of Stress-Inducible MHC Class I-Related Chains by Human Epithelial $\gamma\delta$ T Cells.* *The Journal of Immunology*; 169: 1236–1240.
- Wu, J., Lanier, L.L.** (2003b). *Natural killer cells and cancer.* *Adv Cancer Res*; 90: 127–56.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B.H., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., Phillips, J. H.** (1999). *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D, and DAP10.* *Science*; 285:730.
- Yamamoto, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Bamba, T., Okabe, H.** (2001). *Oxidative stress increases MIC and MICB gene transcription in the human colon adenocarcinoma cell line CaCo-2.* *Biochim. Biophys. Acta* 1526:10–12.
- zur Hausen, H.** (1996). *Papillomavirus infections a major cause of human cancers.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288: F55-F78.
- Zwirner, N.W., Dole, K., Stastny, P.** (1999). *Differential surface expression of MIC by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes.* *Hum. Immunol.* 60, 323–330.

Zwirner, N.W., Fernandez-Vina, M.A., Stastny, P. (1998). *MIC, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes.* Immunogenetics; 47:139–148.

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> de base de datos de secuencia stats.html

<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>

<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/seq/refs>

12. APÉNDICES

1.1 APÉNDICE A: DETALLES TÉCNICOS

Extracción de DNA a partir de leucocitos (*buffy coat*).

Extracción.

La extracción se realiza a partir de sangre periférica mediante la técnica de *salting out* de Miller (técnica de perclorato de sodio) como sigue:

1. Tomar la muestra de sangre total con Vacutainer en un tubo con EDTA al 10% como anticoagulante (no heparina ya que es un inhibidor de la Taq Polimerasa), homogenizar y centrifugar a 12000rpm/7min.
2. Obtener la capa de leucocitos de la interfase (aproximadamente 700 μ l de *buffy coat*) y colocarla en un tubo Eppendorf cónico de 1.5ml.
3. Agregar 800 μ l de buffer de lisis y agitar fuertemente en el vórtex hasta disgregar el botón.
4. Centrifugar por 3min/12000rpm a 4°C y decantar el sobrenadante dejando únicamente el botón en el fondo del tubo.
5. Repetir los pasos 3 y 4 por triplicado hasta que se obtenga un botón blanquecino y un sobrenadante transparente.
6. Resuspender el botón en 400 μ l buffer de lisis 2 y agitar ligeramente en el vórtex para despegar el botón.
7. Añadir primero 10 μ l SDS al 20%, posteriormente 110 μ l perclorato de sodio 5M y mezclar en el agitador por 10 min.
8. Agregar 200 μ l NaCl 5 M y agitar vigorosamente en vórtex.
9. Centrifugar por 5min/12000rpm a 4°C y pasar 700 μ l de sobrenadante a tubo Eppendorf en punta de 1.5 ml.
10. Añadir al sobrenadante un volumen igual de isopropanol a -20°C y mezclar ligeramente por inversión (observar una hebra blanquecina de DNA).
11. Guardar a -20°C/1 noche o a -70°C/1 hr.
12. Centrifugar por 5min/12000rpm a 4°C y decantar el isopropanol dejando solo en el tubo el botón de DNA.
13. Agregar 1 ml de etanol al 70% a -20°C y agitar ligeramente en el vórtex para desprender el botón.
14. Centrifugar por 5min/12000 rpm a 4°C y decantar el etanol dejando únicamente el botón de DNA en el tubo.
15. Repetir los pasos 13 y 14 por triplicado.
16. Dejar secar el botón a temperatura ambiente/1hr o en speed-back/5min.
17. Añadir 100 μ l de dH₂O estéril y dejar en horno de hibridación a 65°C/30 min. o en el agitador a temperatura ambiente/1 noche para hidratar el DNA.

Cuantificación.

La cantidad de DNA obtenido se evalúa espectrofotométricamente de la siguiente manera:

1. Realizar una dilución 1:50 de cada una de las muestras de DNA (tomar una alícuota de 2 μ l DNA, colocarla en un tubo Eppendorf de 0.6ml y adicionar 98 μ l de dH₂O).
2. Agitar en el vórtex vigorosamente y centrifugar por unos segundos en la microcentrifuga.

3. Calibrar el espectrofotómetro usando como blanco agua dH₂O estéril.
4. Medir la absorbancia a las longitudes de 260 nm (indica concentración de DNA) y 280 nm (revela concentración proteínas) con emisión de luz UV utilizando celdas de 1cm² con volumen de 50µl.
5. Obtener la relación 260/280 para calcular la pureza del DNA (optima 1.8).
6. Evaluar la concentración de DNA utilizando la siguiente ecuación donde la concentración esta dada en ng/µl: [DNA] = Abs 260 * 50 * 50 (los términos involucran: el valor de absorbancia a 260nm, la concentración correspondiente a una unidad de absorbancia, la dilución de la solución de DNA y los factores de conversión de ml a µl y µg a ng).

Electroforesis

La calidad de DNA obtenido se verificará mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%:

1. Pesar 0.8gr de agarosa y colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
2. Agregar 100 ml de buffer TBE 0.5X.
3. Calentar por 1 minuto en horno de microondas (verificar continuamente para evitar proyecciones) y dejar enfriar hasta temperatura media.
4. Agregar 2 µl bromuro de etidio y mezclar perfectamente.
5. Vaciar a la base plástica que contiene los peines para 100 pozos.
6. Dejar solidificar para retirar los peines.
7. Introducir el gel en la cámara de electroforesis que contiene solución amortiguadora de TBE 0.5X.
8. Mezclar perfectamente 1 µl de DNA, 2µl buffer de carga y 1µl de agua destilada.
9. Colocar la mezcla en cada uno de los pozos.
10. Cerrar la cámara de electroforesis y pasar corriente a 90 volts y 500 mA durante 30 minutos, transcurrido el tiempo retirar el gel de la cámara de electroforesis.
11. Colocar el gel sobre un transiluminador de luz UV para observar las bandas de DNA y tomar una fotografía.

Reacción en Cadena de la Polimerasa del gen *MICB*.

Diseño de Iniciadores

La secuencia de los iniciadores 5'-Forward y 3'-Reverse (Tabla A) que se usan para la amplificación del locus *MICB* se encuentran localizados sobre intrón 1 e intrón 5 (*NCBI Sequence NC_000006*) respectivamente; los cuales originan un producto de 2,307 pb.

TABLA (A). Características de los iniciadores para la amplificación del gene *MICB*.

INICIADOR	ORIENTACIÓN	LOCALIZACIÓN	SECUENCIA
5FMICB2-5	5'	Intrón 1 7090-7114	AAg ACC TTC CTT CCA ACA CTg CCT T
3RMICB2-5	3'	Intrón 5 9374-9396	gAA AgC TCC TTT CTA ggC AgT Ag

Condiciones de PCR

La reacción de PCR se realiza a una concentración final de: 1x para buffer No.1 (*Kit Expand Long Template PCR System; Roche Applied Science*) que contiene 17.5 mM de MgCl₂, 0.056mM de dNTP's (*Invitrogen*), 0.35pmol/µl para los iniciadores 5' y 3' (*Invitrogen*),

0.075U/μl de Taq polimerasa (*Kit Expand Long Template PCR System; Roche Applied Science*) y 20ng/μl de DNA en 25μl como volumen final de la siguiente forma:

1. Preparar la mezcla de reacción (sin DNA de las muestras) en un tubo eppendorf de 1.5 ml agregando las cantidades correspondientes de cada reactivo (TABLA B) de acuerdo al número de muestras por amplificar (hacer cálculos según No. muestras a amplificar, agregando control (-) mas una reacción extra).

TABLA (B). Volúmenes para preparar la mezcla de reacción correspondiente a una muestra.

Reactivo	Cantidad en μl por cada muestra
dH ₂ O	18.225
Buffer No.1	2.5
dNTP's	0.7
5' Primer	0.35
3'Primer	0.35
Taq	0.375
Volumen	22.5

2. Posteriormente añadir a cada tubo previamente etiquetado: 22.5μl de la mezcla de reacción (usar la misma punta para todos los tubos) y 2.5μl del DNA a amplificar con una concentración de 200ng/μl o 2.5 μl de agua bidestilada para el control negativo (utilizando una punta diferente para cada muestra).
3. Cubrir perfectamente cada tubo de reacción para evitar evaporación de la muestra, agitar ligeramente en vórtex y centrifugar por unos segundos.
4. Una vez montadas las reacciones de PCR introducir los tubos en un termociclador con el siguiente programa de amplificación (Tabla C).

TABLA (C). Programa ELT para la amplificación del gen MICB

Paso 1	94°C por 2 min.
Paso 2	94°C por 10 seg.
Paso 3	65°C por 30 seg.
Paso 4	68°C por 2 min.
Paso 5	Ir a 2, 10 ciclos
Paso 6	94°C por 10 seg.
Paso 7	65°C por 30 seg.
Paso 8	68°C por 2 min.
Paso 9	Ir a 6, 16 ciclos
Paso 10	68°C por 7 min.
Paso 11	72°C por 8 min.
Paso 12	15°C por siempre.
Paso 13	Fin

5. Observar los productos de PCR obtenidos mediante electroforesis horizontal sobre gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de Etidio y cubierto por solución amortiguadora TBE 0.5X a 90 volts y 500 mA durante 50 minutos; colocando la mezcla de 2.0 μl de buffer de carga y 2μl de producto de PCR en cada pozo, usando un

marcador de peso molecular de 250 pb (*250bp DNA Ladder, Invitrogen*) y colocarlo sobre un transiluminador para observar las bandas con luz UV y tomar una fotografía.

Técnica de SSOP (Sequence Specific Oligonucleotides Probes).

Reconstitución y dilución de sondas

1. Adicionar a cada sonda (Oligonucleotide, Biosource International, Inc e Invitrogen life technologies) 1000ul de H₂O estéril y colocarla en agitación 24hrs.
2. Preparar en un tubo eppendorf de 0.6ml 25µl de sonda a una concentración 25pmol/ul.

Marcaje de sondas.

El marcaje de las sondas se realiza en forma individual utilizando Digoxigenina (*Kit DIG oligonucleotide 3'-End Labelling 2nd. Generation, Roche Applied Science*) como sigue:

1. Preparar de forma individual para cada sonda la siguiente mezcla (TABLA D) en un tubo eppendorf de 0.6 ml (no hacer mezcla maestra):

TABLA (D). Volúmenes para preparar la mezcla correspondiente al marcaje de una sonda, donde X + Y = 10 ul.

Solución	Tubo	Volumen
5X Mailing Buffer	1	4µl
25 mM de CoCl ₂ solución	2	4µl
1 mM DIG/ddUTP	3	1µl
100 pM SSO (25pmol/ul)		X (4µl)
H ₂ O destilada		Y (6µl)
50 U/ml T. Transferasa	4	1µl

2. Incubar los tubos a 37°C/20 min. en baño de agua, mientras se prepara la mezcla de paro (*stop mix*) como sigue (TABLA E):

TABLA (E). Volúmenes para preparar la mezcla de paro que debe ser preparada al momento.

Solución	Tubo	Volumen
Glicógeno solución	8	1µl
0.2 M EDTA (pH 7.8-8.0)		200µl

3. Transcurrido este tiempo pasar los tubos de reacción de 37°C a hielo.
4. Centrifugar en una microcentrifuga.
5. Adicionar 2 ul de mezcla de paro a cada tubo, mezclando suavemente por inversión.
6. Para precipitar la sonda marcada adicionar 2.5 ul de LiCl (4M) recién filtrado mezclando suavemente por inversión.
7. Adicionar 75 ul de Alcohol absoluto a -20°C, mezclando suavemente por inversión.
8. Incubar a -70°C/30min o -20°C/2hrs.
9. Cumplido este lapso centrifugar los tubos a 13,500 rpm/15min.
10. Retirar cuidadosamente el sobrenadante (aproximadamente 75 ul).
11. Adicionar a cada tubo 50 ul de Etanol frío al 70% (-20°C).
12. Centrifugar a 13,500 rpm/15min. para retirar con mucho cuidado todo el sobrenadante.
13. Dejar secar el botón que no siempre es visible a temperatura ambiente.
14. Resuspender el botón en 100 ul de H₂O destilada.

15. Colocar los tubos sobre un homogenizador a temperatura ambiente por 3 a 4 horas para disolverlo.

Preparación de Dot Blots (Transferencia en mancha).

Los Dot blots se realizan sobre membranas de nylon cargadas positivamente cortadas a un tamaño apropiado y cuadrículadas en cuadros de 1 cm² por muestra de la siguiente forma:

1. Desnaturalizar en el termociclador de 8 a 16 muestras usando el siguiente programa (TABLA F):

TABLA (F). Programa DESNATURE para desnaturalización de productos de PCR del gen MICB.

Paso 1	95°C por 5 min.
Paso 2	Por siempre 4°C

2. Una vez terminada la desnaturalización pasar directamente los tubos en hielo para evitar que se vuelva a formar la doble cadena de DNA.
3. Depositar 2 ul del producto de PCR desnaturalizado sobre un área de 1cm² de la membrana (si el producto no es bueno se pondrá el doble).
4. Dejar secar la membrana a temperatura ambiente/10 min.
5. Colocar la membrana seca dentro de un crosslinker UV a 120,000 microjoules/25 seg. para fijar el DNA.
6. Posteriormente colocar la membrana en una hoja de polietileno.
7. Guardar a 5°C hasta que sea utilizada.

Hibridación

Bloqueo de membranas

1. Colocar cada membrana en un tubo (capacidad 100ml) con 5ml de la solución bloqueadora (*Reactivo 1*) previamente fría.
2. Poner los tubos en el hibridador por 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Prender el baño de agua a la temperatura de hibridación para colocar la solución de pre-hibridación (*Reactivo 2*).

Pre-hibridización

4. Sacar los tubos del hibridador para eliminar el Reactivo 1.
5. Adicionar 5ml del Reactivo 2 caliente.
6. Colocar los tubos en el hibridador durante 1 hora a la temperatura de hibridación.
7. Durante el paso 5, preparar la solución de hibridación (*Reactivo 3*).

Hibridación

8. Transcurrido el tiempo de pre-hibridación, eliminar de los tubos el Reactivo 2 y adicionar el Reactivo 3.
9. Colocar nuevamente los tubos en el hibridador durante 90min a la temperatura de hibridación.
10. Al terminar el tiempo de hibridación, rescatar el Reactivo 3 para reusarlo con otras membranas.

Lavado de membranas

11. Hacer 2 lavados dentro de cada tubo con 5 ml de solución de enjuague (*Reactivo 4*) a temperatura ambiente por 10 minutos.
12. Realizar 2 lavados dentro de cada tubo con 5 ml de Reactivo 2 a temperatura astringente por 10 minutos.

Secado de membranas

13. Sacar las membranas de su tubo para colocarlas en una base de papel filtro por 10 min. para que sequen.
14. Meter las membranas en una hoja de acetato.
15. Dejarlas en refrigeración o continuar con el procedimiento de detección.

Detección

1. Ajustar la temperatura del horno de hibridación a 37°C.
2. Lavar las membranas con 5 ml de Buffer 1 (*Reactivo 5*) por 5 min. /37°C.
3. Transcurrido el tiempo eliminar el Reactivo 5.
4. Sacar las membranas de su tubo para ponerlas a secar sobre un papel filtro a temperatura ambiente.
5. Con las membranas dentro de su tubo adicionar 5ml de Buffer 2 (*Reactivo 6*).
6. Colocar los tubos en el hibridador a 37°C/35 minutos.
7. Adicionar a cada tubo 1ul del Fragmento Anti-Dig Fab agitando suavemente.
8. Colocar los tubos en el hibridador a 37°C/40 minutos.
9. Sacar las membranas de los tubos para colocarlas en una base plástica.
10. Hacer 3 lavados de 10 minutos con 100 ml de Reactivo 5 a temperatura ambiente con agitación a 2000rpm.
11. Hacer 1 lavado de 5 minutos con 100 ml Buffer 3 (*Reactivo 7*) a temperatura ambiente con agitación a 2000rpm.

Los siguientes pasos son desarrollados en un cuarto oscuro:

12. Mientras las membranas están en el paso 11, preparar la solución de CSPD (*Reactivo 8*), usando siempre CSPD fresco.
13. Colocar el CSPD en una base plástica.
14. Quitar las membranas del último lavado para colocarlas directamente dentro del CSPD; con el DNA hacia abajo para mayor contacto por 10 minutos.
15. Sacar las membranas del CSPD para ponerlas sobre una base de papel filtro y dejarlas secar.
16. Colocar las membranas ya secas en un fólter de plástico dentro del chasis.
17. Colocar encima una película de rayos X y cerrar el chasis para cubrirlo con una bolsa negra.
18. Incubar en el horno a 37°C / 45 minutos.
19. Sacar la película de rayos X del chasis para revelarla.

Reutilización de membranas

20. Después de la detección, las membranas se colocan en tubos individuales con 10 ml de solución removedora (*Reactivo 9*) dentro del hibridador a 70°C/20 minutos.
21. Sacar las membranas de los tubos y dejarlas secar a temperatura ambiente usando una base de papel filtro.

22. Colocar las membranas en bolsas de plástico estéril o en fólder de plástico para mantenerlas en refrigeración hasta su utilización (las membranas pueden ser re-hibridadas nuevamente con otras sondas).

1.2 APÉNDICE B: FUNDAMENTO DE LA TECNOCA SSOP

La técnica de PCR-SSOP (*Single Strand Oligonucleotide Probe*) hace uso de sondas de oligonucleótidos específicas que reconocen las secuencias polimórficas en los exones o intrones de los diferentes alelos de un gen (**Hoffbrand et al., 2005**). Esta técnica se basa en el Southern Blot, pero la hibridación se realiza sobre un fragmento amplificado por PCR, para la cual se utilizan primers genéricos que se unen a regiones constantes no polimórficas del fragmento a amplificar el cual incluye la región polimórfica (**Springer et al., 2000**). El producto de amplificación se inmoviliza sobre un soporte sólido mediante un proceso conocido como *Dot-Blot*; donde el DNA se desnaturaliza por calentamiento, las dos cadenas de la molécula se separan por la ruptura de los puentes de hidrogeno que las mantienen unidas, la temperatura se disminuye rápidamente para que las cadenas permanezcan separadas, y los grupos fosfato del DNA cargados negativamente interaccionen con las membranas de nylon cargadas positivamente y se fijan con luz UV. A continuación el DNA unido a la membrana se trata con solución de hibridación y agente bloqueante sin sonda para que los lugares de unión no específicos de la membrana queden saturados de polímeros sintéticos y se prevenga la unión inespecífica del anticuerpo a la membrana. Posteriormente la membrana se incuba en condiciones favorables con solución de hibridación que contiene la sonda marcada con un grupo químico reactivo como la digoxigenina (se une a nucleótidos de uridina en la posición 5' de la base pirimidica), lo cual permitirá la reasociación de cadenas sencillas de la sonda con el DNA que posea una secuencia complementaria a través de complejos bicatenarios estables por asociación de las bases mediante la formación de puentes de hidrogeno (3 entre G≡C y 2 entre A=T) y con lavados de mayor o menor astringencia las sondas que no se unieron adecuadamente serán removidas y eliminadas quedando las específicamente unidas. Para detectar la hibridación de las sondas se usa una reacción quimioluminiscente, donde tras incubar la membrana con una solución del anticuerpo antidigoxigenina, los fragmentos Fab unidos a fosfatasa alcalina se conjugan con la digoxigenina, y consecutivamente la membrana portadora de la sonda hibridada y el anticuerpo conjugado reaccionan con el sustrato CSPD que impresiona una placa de rayos X con una señal luminosa (**Aranega et al., 2002**). Esta es la técnica de elección en los casos de sistemas muy polimórficos en donde se van a analizar muchos individuos simultáneamente, siendo mucho más laboriosa y muchas veces la interpretación es difícil si no se incluyen controles adecuados y si no se tiene un perfecto y riguroso control sobre los reactivos y en todos los pasos (**Perea et al., 2001**). **Fig.A**

Los factores que influyen en el resultado de esta técnica son:

Concentración de la molécula de DNA y la composición de sus bases (G≡C mas estables que A=T por que están unidas por 3 puentes de hidrogeno)

Concentración de las sondas, tamaño pequeño monocatenarias de 15-50 nucleótidos y purificadas para eliminar proteínas y nucleótidos no incorporados

Volumen pequeño del medio de hibridación pues la concentración de las hebras aumenta y la hibridación es rápida.

Las temperaturas de prehibridación e hibridación ya que estabilizan enlaces de hidrogeno formados o aumentan puentes inestables que se rompen fácilmente, se producen uniones no fructíferas en regiones no correctas que pueden revertir y la velocidad de hibridación lenta.

La presencia de agentes bloqueantes eliminan la unión inespecífica de la sonda a la membrana y aceleran la reacción.

La severidad del lavado elimina la sonda dependiendo de la fuerza definida por la temperatura y concentración de la solución, si es poco estricto hay mucho fondo por unión inespecífica de sonda y cuando es muy estricto disminuye de la señal por eliminación de sonda o reduce el ruido de fondo apareciendo solo la señal específica (**Perea *et al.*, 2001**).