



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES MICA, TNF α y
LTA EN LESIONES PRE-CANCEROSAS Y CANCEROSAS DEL
CÉRVIX UTERINO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MIRIAM ENRIQUETA NIEVES RAMÍREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTOR:
DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2012



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.

Agradecimientos

- ♣ Al Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM

- ♣ A CONACyT por la beca de doctorado en el periodo Mayo de 2006 a Enero de 2009 con número de registro 176744.

- ♣ A la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS por las becas recibidas con matrícula núm. 99092373 en los siguientes periodos:
 - Mayo 2007 a Febrero 2008, como Becario de Investigación II
 - Agosto 2008 a Febrero 2009, como Becario de Investigación III
 - Octubre 2009 a Febrero 2010, como Becario de Investigación III

- ♣ A los apoyos de los proyectos CONACyT núm. 14019 y FOFOI IMSS 2005/1/016.

- ♣ A los miembros del Comité Tutor:

Dr. Jaime Berumen Campos

Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

A título personal

- ♣ Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez, por aceptarme en su grupo de trabajo y enseñarme que con empeño, tenacidad y paciencia se logran los objetivos en investigación.
- ♣ A los médicos, Dr. Pedro Eduardo Alegre Crespo y Dra. María del Carmen Tapia Lugo por compartir sus experiencias en la consulta médica pero sobre todo por enseñarme la calidez humana.
- ♣ A la Dra. Iris Isabel Trejo Villa, a la Enf. Mónica Pérez Pérez y la Srita. Araceli Ambrosio Montes, miembros de Medicina Preventiva de la Clínica Núm. 32, IMSS por brindarme toda su ayuda en la difusión y exhortación del proyecto para la obtención de muestras.
- ♣ Al personal de rayos X de la UMAE Pediatría CMN-SXXI y de la UMF Núm. 1, IMSS, por su ayuda técnica.
- ♣ A los miembros de mi Comité Tutor; Dr. Berumen y Dr. Zentella de quienes estaré siempre agradecida por sus consejos y sugerencias.
- ♣ A los miembros del jurado de examen de Candidatura por su valiosa ayuda en mi formación.
- ♣ A los miembros de examen de grado por compartir sus conocimientos y tiempo para enriquecer este trabajo.
- ♣ Al la UNAM y el IMSS, por abrirme sus puertas, ayudarme en mi formación y compartir sus recursos y conocimientos.
- ♣ Al Dr. José Manuel Rodríguez por su amistad y ayuda en el análisis estadístico.
- ♣ A todos los miembros de la UIMI de quienes aprendí que el trabajo en armonía y respeto son el motor de las amistades a largo plazo.
- ♣ A toda mi familia de quienes siempre he tenido su apoyo y cariño, pero en particular mi mamá y mi abuelita Chuy, por su amor, ayuda, apoyo y manutención en todo momento. Gracias eternamente.

- ♣ A mi tía Sonrics y mi tío Uli, quienes siempre estuvieron al pendiente de cualquier necesidad que tuviera en CMN-SXXI. Muchas gracias por todo.
- ♣ A la Sra. Gloria Ángeles Rodríguez Hernández, mi suegra, por su cariño y motivación a seguir superándome.
- ♣ A todas mis mascotas por su cariño, consuelo y compañía incondicional que hicieron de mis noches de estudio mas pasaderas.

Gracias a tod@s y cada uno de ustedes

Dedicatorias

- ♣ Este trabajo lo quiero dedicar a todas aquellas mujeres que me toco compartir su angustia, desesperación, dolor y miedo en la clínica de displasias y a todas las mujeres que desafortunadamente perdieron la batalla contra el cáncer cérvico uterino.

- ♣ También quiero dedicarlo al Dr. George Papanicolaou[†] y el Dr. Harold zur Hausen, quienes han aportado mucho en el conocimiento del cáncer cérvico uterino.

- ♥ Y por último y siendo mi mayor homenaje para él, este trabajo quiero dedicárselo muy especialmente a mi compañero y esposo **Oswaldo Partida Rodríguez**, quien compartió en todo momento mis angustias y anhelos para concluir este trabajo. Gracias infinitas por tus palabras de aliento, llamadas de atención, cariño, comprensión, respeto, ayuda y sobre todo tu amor. Un beso.

5.2 Material Biológico	35
5.3 Detección de infección por VPH	36
5.4 Tipificación del VPH	36
5.5 Tipificación de los polimorfismos del gene <i>MICA</i>	38
5.6 Tipificación de los SNPs de la región promotora de <i>TNFα</i>	43
5.7 Tipificación del SNP +252 de <i>LTA</i>	46
5.8 Análisis estadístico	47
6. Resultados	49
7. Discusión de Resultados	70
8. Conclusiones	83
9. Referencias	84

Abreviaturas

CaCu	Cáncer Cérvico Uterino
CaLo	Línea celular de cáncer cervical
CMVH	Citomegalovirus Humano
DIU	Dispositivo Intrauterino
EIP	Enfermedad inflamatoria pélvica
FLR	Referencia marcada con fluorescencia usada en la técnica de RSCA
HeLa	Línea celular de cáncer cervical
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IC	Intervalo de confianza
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
InBI	Línea celular de cáncer cervical
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
Ladder	Control interno utilizado en la técnica de RSCA
LIEC-AG	Lesiones intraepiteliales escamosas cervicales de alto grado
LIEC-BG	Lesiones intraepiteliales escamosas cervicales de bajo grado
LIECs	Lesiones Intraepiteliales Escamosas Cervicales
LTA	Linfotoxina alpha o Factor de necrosis tumoral beta
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MICA	Gene A relacionado con la cadena del MHC clase I
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OTB	Oclusión tubaria bilateral
PA	Proporción atribuible
Pap	Prueba citológica de Papanicolaou
pb	pares de bases
RM	Razón de momios
RSCA	Análisis conformacional usando una cadena sencilla de DNA como referencia
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
TNFα	Factor de necrosis tumoral alpha
VPH	Virus del papiloma humano
VPH (-)	Grupo de pacientes negativas a infección por VPH con la prueba de PCR
VPH (+)	Grupo de pacientes positivas a infección por VPH con la prueba de PCR

Lista de Figuras

Figura 1a.	Representación de los cambios morfológicos que ocurren.	8
Figura 1b.	Esquematación de la expresión de las oncoproteínas del VPH-16.	8
Figura 2.	Tasas de Incidencia y Mortalidad del CaCu a nivel mundial y México	11
Figura 3.	Representación del árbol filogenético de la familia <i>Papillomaviridae</i>	15
Figura 4.	Representación de la progresión de una infección por VPH	17
Figura 5.	Esquema de la interacción ligando-receptor de MICA-NKG2D	25
Figura 6.	Organización de los genes de la familia <i>TNF</i>	28
Figura 7a.	Representación de la proteína TNF α	30
Figura 7b.	Estructura cristalográfica del complejo TNF α -TNFR2	30
Figura 7c.	Representación de la proteína LTA	30
Figura 7d.	Estructura cristalográfica del complejo LTA-TNFR 55 kD	30
Figura 8.	Tipificación de VPH	37
Figura 9.	Técnica de RSCA	39
	a. FLR	
	b. amplificación del locus a estudiar	
	c. desnaturalización e hibridación	
	d. formación de dúplex	
	e. movilidad electroforética	
Figura 10a.	Electroferograma del gene <i>MICA</i> exón 5	42
Figura 10b.	Electroferograma del gene <i>MICA</i> exones 2-3	42
Figura 11.	Membranas pertenecientes a la tipificación del SNP TNF α -1031	46
Figura 12.	Electroforesis de los polimorfismos del SNP +252 de <i>LTA</i>	47
Figura 13a.	Esquema <i>LD Plot</i> del desequilibrio de ligamiento para LIEC-BG	68
Figura 13b.	Esquema <i>LD Plot</i> del desequilibrio de ligamiento para LIEC-AG	68

Lista de Tablas

Tabla 1.	Sistema Bethesda para el diagnóstico e informe de la citología.	9
Tabla 2.	Polimorfismos del gene <i>MICA</i> y su asociación con enfermedades.	27
Tabla 3.	Polimorfismos de los SNPs de <i>TNFα</i> , <i>LTA</i> y microsatélites (<i>TNFα-e</i>).	31
Tabla 4.	Sondas de oligonucleótidos de secuencia específica para <i>TNFα</i>	45
Tabla 5.	Identificación y frecuencias de los tipos de VPH	50
Tabla 6a.	Frecuencias de los microsatélites del gene <i>MICA</i> (exón 5).	52
Tabla 6b.	Frecuencias de los genotipos de los microsatélites de <i>MICA</i> (exón 5).	53
Tabla 6c.	Frecuencias de alelo del gene <i>MICA</i> (exones 2-3 y 4-5).	54
Tabla 6d.	Frecuencias de genotipo del gene <i>MICA</i> (exones 2-3 y 4-5)	56
Tabla 7a.	Distribución de los microsatélites del gene <i>MICA</i> (exón 5) y VPH	57
Tabla 7b.	Distribución de los alelos del gene <i>MICA</i> (exones 2-3 y 4-5) y VPH	58
Tabla 7c.	Distribución de genotipos de los microsatélites del gene <i>MICA</i> y VPH	59
Tabla 7d.	Distribución de genotipos del gene <i>MICA</i> (exones 2-3 y 4-5) y VPH	60
Tabla 8.	Frecuencias de alelo y genotipo de los polimorfismos de <i>TNFα</i> y <i>LTA</i>	63
Tabla 9.	Distribución de genotipos de <i>TNFα</i> y <i>LTA</i> y VPH	66
Tabla 10.	Frecuencias de genotipos relevantes entre los SNPs de <i>TNFα/LTA</i> .	67
Tabla 11.	Haplotipos comunes de los loci <i>TNFα/LTA</i> y análisis de asociación.	69

Resumen

El cáncer cérvico uterino (CaCu), es una neoplasia que se desarrolla en forma progresiva cuyo factor etiológico principal es la infección por virus de papiloma humano (VPH). Se han implicado factores de riesgo inmunogenéticos en el hospedero como los genes *MHC class I chain related gene A (MICA)*, *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α)* y *Lymphotoxin alpha (LTA)*, los cuales están involucrados en la respuesta inmunológica contra virus y neoplasias. Algunos de sus polimorfismos genéticos, se han asociado con susceptibilidad al desarrollo de diferentes tipos de cánceres. Por lo tanto, en este trabajo se determinó la asociación de los polimorfismos del gene *MICA*, los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) de la región promotora de *TNF α* y el SNP +252 de *LTA* con la susceptibilidad al padecimiento de lesiones precursoras al CaCu en mujeres mexicanas. Los polimorfismos de *MICA*, *TNF α* , y *LTA* se analizaron por *Reference Strand Conformation Analysis (RSCA)*, *Sequence Specific Oligonucleotide Probes (SSOP)* y *Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLPs)*, respectivamente. Se tipificaron 196 pacientes VPH(+), subdivididas en 134 mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas cervicales de bajo grado (LIEC-BG) y 62 mujeres de alto grado (LIEC-AG). Las frecuencias de los polimorfismos de las pacientes fueron comparadas con un grupo compuesto por 210 mujeres VPH(-) con citología normal y con el mismo origen étnico. Se observó que el alelo *MICA*002:01* favorece las infecciones por VPH (RM=1.37) y que los SNPs de *TNF α* y *LTA+252* no están relacionados con esta infección. Se encontró que el microsatélite A9 de *MICA*, incrementa el riesgo a desarrollar LIEC-BG (RM=1.53), mientras que el genotipo **002:01/*010* aumenta el riesgo de LIEC-AG (RM=4.30). Por otro lado, se encontró que el alelo *TNF α -376A* y el genotipo *TNF α -376G/A*, incrementan 2.81 y 2.48 veces, respectivamente el riesgo de generar una LIEC-BG. Se observaron 56 combinaciones de genotipos entre *TNF α* y *LTA*, de las cuales la combinación *G/G-G/G-G/G-G/G-G/G-C/T-C/C-T/T-G/A*, mostró una tendencia de riesgo para desarrollar LIEC-AG (p=0.052). A su vez, los haplotipos de *TNF α /LTA*, *GTCTGGGG*, *ATCCGGGG* y *ACACGGGG* aumentan el riesgo en 8.33, 4.36 y 2.68 veces, respectivamente, a desarrollar lesiones precursoras al CaCu. Los resultados sugieren que los polimorfismos de *MICA* y *TNF α* están involucrados en el desarrollo de lesiones precursoras a CaCu en mujeres mexicanas.

Abstract

Cervical cancer (CC) is a malignancy that develops in a progressive manner whose main etiological factor is the infection with human papilloma virus (HPV). Several host immunogenetic risk factors have been implicated such as MHC class I chain related gene A (*MICA*), Tumor Necrosis Factor alpha (*TNF α*) and Lymphotoxin alpha (*LTA*), which are involved in the immunological response to virus and neoplasias, and some of their genetic polymorphisms have been associated with susceptibility to the development of different kinds of cancers. Therefore, in this work we determined whether *MICA* gene polymorphism, *TNF α* promoter region single nucleotide polymorphisms (SNPs) and SNP +252 of *LTA* are associated with susceptibility to precursor lesions of CC in Mexican women. *MICA*, *TNF α* and *LTA* gene polymorphisms were analyzed by Reference Strand Conformation Analysis (RSCA), Sequence Specific Oligonucleotide Probes (SSOP) and Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLPs), respectively. We genotyped 196 HPV(+) women, that were subdivided into 134 women with cervical squamous intraepithelial lesions of low grade (LSIL) and 62 of high grade (HSIL). Polymorphisms frequencies of the patients were compared with a group of 210 HPV(-) women with normal cytology from the same ethnical origin. We observed that the allele *MICA**002:01 favors HPV infection (OR=1.37) and that the *TNF α* y *LTA*+252 SNPs are not related to this infection. We found that the *MICA* A9 microsatellite increases the risk to develop LSIL (OR=1.53), whereas the genotype *002:01/*010 increases the risk of HSIL (OR=4.30). We also found that allele *TNF α* -376A and the genotype *TNF α* -376G/A, increase 2.81 and 2.48 times respectively, the risk to generate a LSIL. We found 56 genotype combinations between *TNF α* and *LTA*, of which, the combination G/G-G/G-G/G-G/G-G/G-C/T-C/C-T/T-G/A showed a risk trend for HSIL (p=0.052). Moreover, the haplotypes GTCTGGGG, ATCCGGGG and ACACGGGG of *TNF α* -*LTA* increases the risk to the development of precursor lesions to cervical cancer in 8.33, 4.36 and 2.68 times correspondingly. These results suggest that the polymorphism of *MICA* and *TNF α* are involved in the development of cervical cancer precursor lesions in Mexican women.

1. Introducción

1.1 Cáncer Cérvico Uterino (CaCu)

El cáncer en general se define como una enfermedad multifacética que altera el mecanismo de replicación de una célula. Ésta a su vez invade y coloniza territorios que normalmente están reservados para otras células (Lodish *et al.*, 2002). El cáncer se ha clasificado en cuatro grupos. 1) adenocarcinomas, desarrollados en células de tejido glandular, 2) carcinomas, que se originan de células epiteliales, 3) sarcomas, generados en tejido conectivo y 4) leucemias y linfomas que se originan en médula ósea (y/o sangre) y tejido linfoide, respectivamente (Cortinas, 1998).

El cáncer cérvico uterino (CaCu), es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las mujeres. Se reconocen dos tipos histológicos más frecuentes: el epidermoide, también denominado como espinocelular o de células escamosas, y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical. El origen histológico del CaCu es de tipo epidermoide en el 85 a 90 por ciento de los casos y usualmente aparece en la unión del canal cervical y el ectocérvix. En esta área, normalmente ocurre que el epitelio columnar es reemplazado por el epitelio escamoso (Milán, 2006).

El CaCu, es un carcinoma que se desarrolla en forma progresiva (**Figura 1a**). Esta enfermedad comienza con la infección por el virus del papiloma humano (VPH) en la unión del canal cervical y el ectocérvix. Si esta infección es persistente, puede continuar con una lesión precursora del cáncer denominada Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Esta es clasificada en tres grados dependiendo el avance de la infección del VPH y la alteración celular que se vaya generando en esta zona: a) I (displasia leve), b) II (displasia moderada) y c) III (displasia grave), para continuar después con un cáncer *in situ* (Piver, 2000). Una vez establecido el cáncer *in situ*, le toma entre 10 y 20 años para convertirse en un cáncer invasor

(Cortinas, 1998). Es interesante que en la infección por VPH-16 se haya reportado que ocurren cambios en la expresión de las oncoproteínas durante la progresión de las NICs grado I, II y III. Uno de los cambios más notables es la expresión constante y progresiva de la oncoproteína E7 (Doobar, 2005) (**Figura 1b**).

La mayor parte de las neoplasias son diagnosticadas en la mujer después de los 20 años de edad. El cáncer *in situ* se presenta de manera significativa entre los 30 a 39 años de edad y el cáncer invasor se observa en mujeres de 40 años en adelante (Milán 2006).

Debido a las diferentes terminologías que se utilizaban en el diagnóstico del CaCu, se desarrolló la clasificación de Bethesda con la finalidad de unificar los criterios histopatológicos y citopatológicos observados en los diferentes grados de NICs y conocer la participación del VPH en el desarrollo de las lesiones del cáncer cérvico uterino *in situ* (Schiffman y Brinton, 1995, Piver, 2000, Berek, 2003). La clasificación está basada en dos grandes grupos, los cuales son: a) Lesiones Intraepiteliales Escamosas Cervicales (LIECs) de Bajo Grado (LIEC-BG) que comprenden diagnósticos de infección por VPH y NIC I y b) LIECs de Alto Grado (LIEC-AG) que comprenden diagnósticos NIC II y III (Berek, 2003) (**Tabla 1**).

1a)

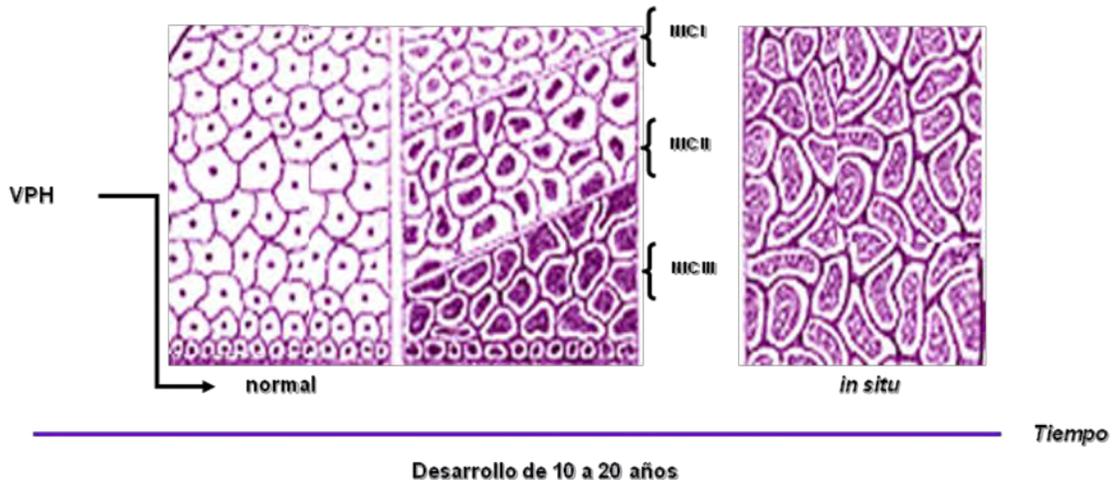


Figura 1a. Representación de los cambios morfológicos que ocurren en el cérvix con una infección persistente por VPH e inicio del desarrollo de lesiones precursoras (NICs) y un cáncer *in situ*.

1b)

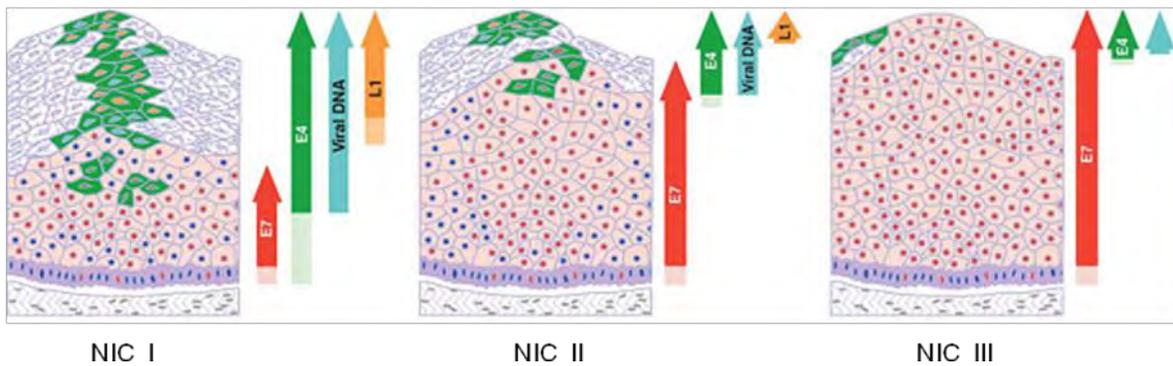


Figura 1b. Esquemización de la expresión de las oncoproteínas del VPH-16 en la progresión de NICs. Tomado de Doobar, 2005

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

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

NIC, Neoplasia Intraepitelial Cervical; VPH, virus del papiloma humano. Fuente: MS Piver, RE Hempling, KA Craig. Neoplasm of the cervix. In JFHolland, E.Frei, RC Blasth et al (eds). Cancer Medicine (3ª ed) Philadelphia: Lea & Febiger. Pp 1631-1646. Tomado de Lesiones preinvasoras del cervix, en Oncología Ginecológica. Ed.Marban. Piver, 2000.

1.2 Epidemiología del CaCu

Los datos registrados por GLOBOCAN en 2008 mostraron que el CaCu es la segunda neoplasia más frecuente a nivel mundial en mujeres, sólo después del cáncer de seno, con una tasa de mortalidad de 7.8 muertes por cada 100,000 personas a nivel mundial. En países desarrollados, la tasa de mortalidad es de 3.1 por cada 100,000 mujeres, mientras que en países en vías de desarrollo, se registra una tasa de mortalidad de 9.8 por 100,000 mujeres. México, registró una tasa de mortalidad de 9.7 por 100,000 mujeres (Ferlay *et al.*, 2010). Actualmente, en nuestro país el CaCu sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública en la población femenina, a pesar de que puede ser prevenido cuando es detectado en sus etapas iniciales, y de que ya se cuenta con esquemas de vacunación para prevenir infecciones con VPH relacionados al desarrollo de CaCu (Faro, 2006).

México, inició con Programas Nacionales de Detección Oportuna de Cáncer desde 1974 (Alonso de Ruíz *et al.*, 2000). El plan de acción para la prevención y control del cáncer cérvico uterino avalado por el programa sectorial de salud que comprende los años 2007-2012, ha contribuido con resultados alentadores al disminuir la incidencia tanto del cáncer de mama como del CaCu que son los dos tipos de cáncer con mayor distribución porcentual en las defunciones por tipo de tumores malignos en mujeres de 25 años y más (SSA, 2008). En el comunicado número 267/11 del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2011), se registró una tasa estandarizada de CaCu que disminuyó de 17.8 a 9.1 fallecimientos por cada 100 mil mujeres de 25 años o más entre 2005 y 2009. Sin embargo, México actualmente sigue teniendo una de las tasas más altas de mortalidad por este padecimiento, pues se registra la muerte de una mujer mexicana cada 40 minutos, lo que ubica a nuestro país como una de las áreas de mayor riesgo ya que la incidencia que se registra para nuestro país es 19.2 por 100,000 mujeres en comparación con la incidencia promedio mundial de 15.3 por

el mismo número de mujeres por año (**Figura 2**) (Sanabria *et al.*, 2005; López y Ancinar, 2006; Ferlay *et al.*, 2010).

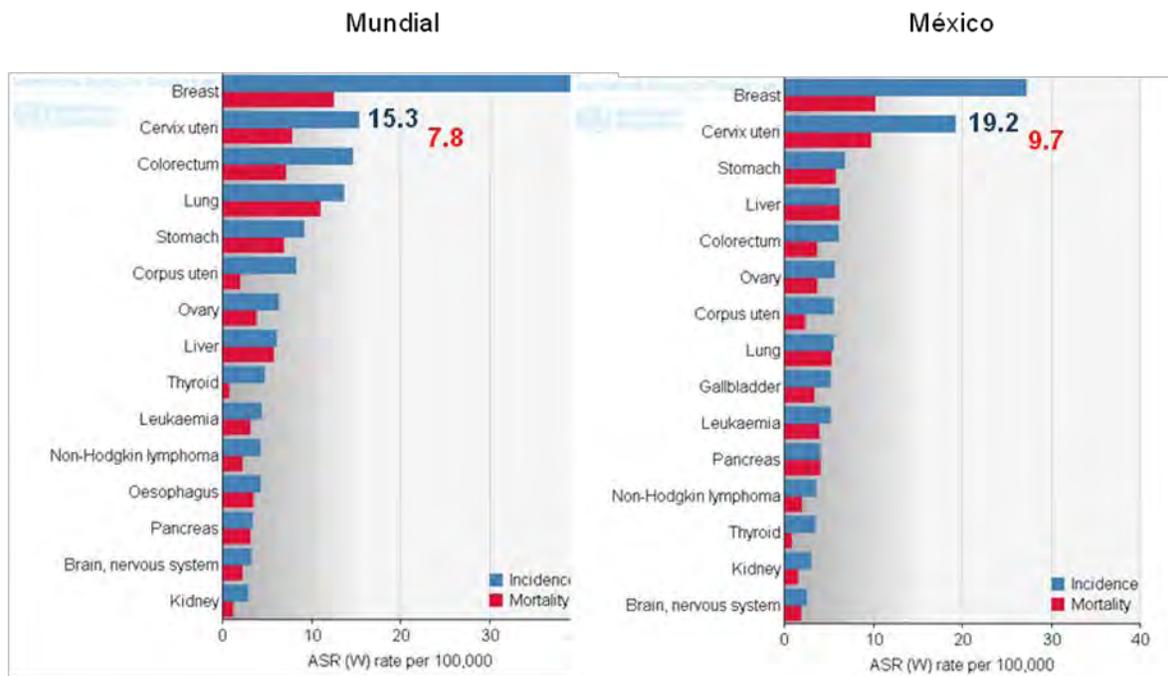


Figura 2. Tasas de Incidencia y Mortalidad del CaCu a nivel mundial y México. La tasa de mortalidad en México es mayor a la tasa de mortalidad mundial por lo que el CaCu es considerado un problema de salud pública.

El INEGI en su reporte “Hombres y Mujeres en México 2009” (INEGI, 2009), anunció que la tasa nacional de mortalidad (dato real de 2007) por CaCu en México y en mujeres con un rango de edad entre 25 años y más, era de 14.3 por cada 100 mil mujeres. Las entidades con las mayores tasas de mortalidad entre los estados de la República Mexicana son: Chiapas (21.8), Oaxaca y Veracruz (21.6) y Campeche (21.2); en tanto que en Zacatecas, Nuevo León e Hidalgo la tasa se reduce a poco más de la mitad de las entidades que muestran los mayores niveles de incidencia con 10.3, 10.6 y 10.8, respectivamente. En el caso del Distrito Federal, el reporte de la INEGI mencionó una tasa de mortalidad de 11.4 por cada 100,000 mujeres.

1.3 Factores de riesgo relacionados con CaCu

Las diferencias encontradas en las tasas de mortalidad e incidencia en diversos tipos de cáncer en el mundo, se deben a las marcadas diferencias geográficas, la exposición a distintos factores ambientales causales y a otros factores propios del hospedero (origen étnico, susceptibilidad genética, cambios inmunológicos y genéticos) (Stewart y Kleihues 2003, Baseman y Koutsky 2005, Passmore *et al.*, 2007).

Algunos factores ampliamente asociados con el desarrollo de esta enfermedad son: **1)** la poca o nula ingesta de vitaminas -A (retinol), -B (ácido fólico y B₆), -C, -E, Folatos y β-carotenos, los cuales contribuyen importantemente en dos mecanismos del metabolismo: a) producción de agentes antioxidantes y b) donación de metilos involucrados en otras vías metabólicas (Stewart y Kleihues 2003, Torres-Labatón *et al.*, 2004); **2)** el nivel bajo de escolaridad y **3)** el nivel socio-económico bajo que hacen que las mujeres tengan un difícil acceso a la información relacionada con la promoción en salud y los métodos de prevención como la prueba de Papanicolaou (Pap) y tratamiento oportuno en etapas tempranas. (Palacio-Mejia *et al.*, 2003); **4)** el inicio precoz de las relaciones sexuales, **5)** la promiscuidad sexual, **6)** la higiene genital deficiente y **7)** la multiparidad, puesto que en la adolescencia, hay una rápida transformación en las células del cuello uterino y esto hace que se incrementen las posibilidades de contraer infecciones principalmente por VPH, que podría generar cambios pre-neoplásicos (De Vita *et al.*, 1993, Ho *et al.*, 1998, Stewart y Kleihues 2003, Hernández-Girón *et al.*, 2005, Faro, 2006); **8)** el consumo de tabaco (cigarrillo o tabaco masticado), debido a que algunos de sus componentes químicos como la nicotina y la cotinina afectan a las células generadoras de moco en el cérvix haciéndolo más propenso a un desarrollo infeccioso y/o neoplásico (Winklestein 1990, McCann *et al.*, 1992, Chan *et al.*, 2002, Giuliano *et al.*, 2002, Fonseca-Moutinho 2011); **9)** la inmunosupresión, que ejerce una vulnerabilidad en el sistema inmune de la mujer que hace se incremente el riesgo a contraer

infecciones (principalmente con VPH) (Santin *et al.*, 1999, Sellors *et al.*, 2002, Jiménez-Flores *et al.*, 2005); **10**) el uso prolongado de anticonceptivos orales, porque incrementa (hasta 4 veces) el riesgo en mujeres que los usaron por más de 5 años, así como, también en mujeres que empezaron a usarlos antes de los 20 años (Giuliano *et al.*, 1999, Moreno *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2003). El instituto nacional de salud de los Estados Unidos de América (1991), sugiere que el mecanismo por el cual los anticonceptivos orales afectan las células cervicales, es debido a una baja concentración de folatos, cuya función es mantener la integridad del epitelio uterino. Y **11**) la presencia de infecciones de transmisión sexual que auxilian con la progresión del desarrollo del CaCu. Algunos reportes indican que las infecciones por *Chlamydia trachomatis* favorecen la inhibición de la apoptosis en células infectadas por VPH (células HeLa) al desestabilizar las vías de señalización de la caspasa 3 y el rompimiento de la polimerasa ADP ribosa así como el secuestro de la molécula BAD (Fan *et al.*, 1998, Giuliano *et al.*, 2001, Verbeke *et al.*, 2006) y otros anuncian que la sola infección con diferentes serotipos (principalmente G, -I y -D) de *C. trachomatis*, incrementa el riesgo de 2 a 6 veces el desarrollo de carcinomas de células escamosas en el cérvix (Koskela *et al.*, 2000, Anttila *et al.*, 2001). Por otro lado, secuencias de DNA del Virus Herpes Simple tipo 2 (HSV-2) junto con secuencias de VPH se han encontrado en aproximadamente 30 por ciento de tumores genitales (Jones 1995). Por otro lado, el Virus Epstein Barr, en biopsias de pacientes con CaCu en Indonesia se registró en un 68.0% de los pacientes (Prayitno 2006). Sin embargo, es la infección de transmisión sexual por VPH, el factor etiológico más asociado con el desarrollo de CaCu, debido a que se encuentra en más del 99% de los casos de cáncer cervical (Bosch *et al.*, 2002) y además es considerado por la IARC como agente causal de esta enfermedad. La integración del VPH en el genoma del huésped ha sido propuesta como potencial marcador de la progresión de neoplasias cervicales. A pesar de lo anterior, la sola infección por VPH es un factor necesario pero no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad.

1.3.1 Virus del papiloma humano (VPH), principal factor etiológico del CaCu

Existen aproximadamente 100 tipos de VPHs, de los cuales, cerca de 35 tipos de VPH se identifican en lesiones benignas y malignas del tracto anogenital tanto en hombres como en mujeres, además, quince de estos tipos virales se han asociado con cáncer de cérvix (Schiffman y Krüger, 2003, Zheng y Baker, 2006, Lizano-Soberón *et al.*, 2009).

Taxonómicamente el VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, compuesta por 16 géneros. Los virus de papiloma humano están agrupados en los géneros – *Alpha papillomavirus* con 15 especies, –*Beta papillomavirus* y –*Gamma papillomavirus* con 5 especies cada uno, –*Mu papillomavirus* con 2 especies y –*Un papillomavirus* con 1 especie (de Villiers *et al.*, 2004) (**Figura 3**).

Los tipos virales del género *Alpha papillomavirus* son los principales causantes de lesiones en mucosas (boca, garganta, tracto respiratorio, epitelio anogenital) y lesiones cutáneas (daños en la piel de manos y pies, principalmente) en humanos y otros primates (Burd 2003, López y Ancinar, 2006).

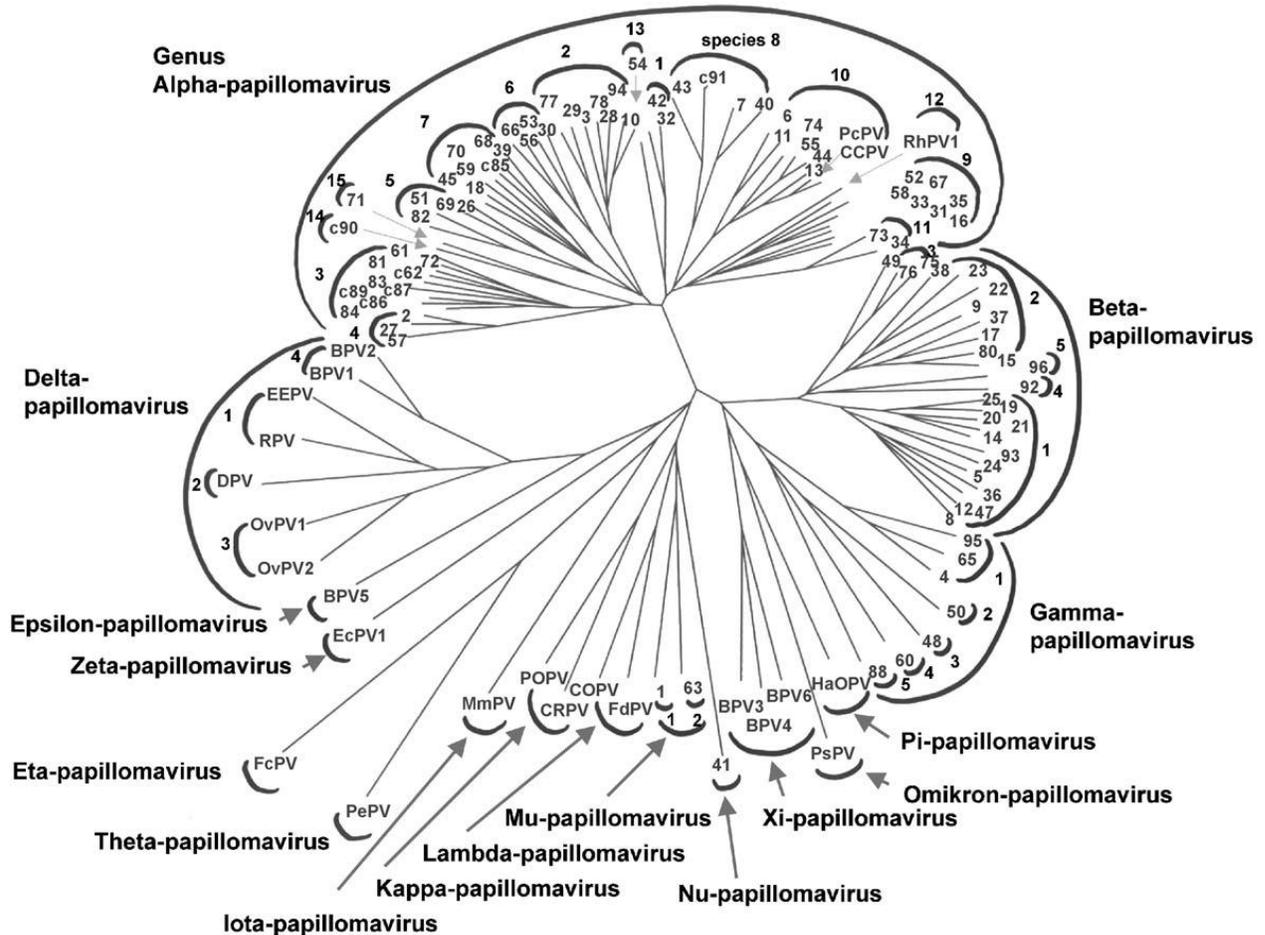


Figura 3. Representación del árbol filogenético de la familia *Papillomaviridae*. Esta conformada por 16 géneros y son los tipos virales del género *Alpha papillomavirus* los principales causantes de lesiones en mucosas y lesiones cutáneas en humanos. Tomado de de Villiers *et al.*, 2004

Son virus de doble cadena de DNA circular y su genoma esta funcionalmente dividido en 3 regiones: La región de control larga (LCR), constituida de 400 a 1000 pb, contiene secuencias promotoras y potenciadoras (*enhancers*) que regulan la replicación del DNA. La región temprana, que codifica 6 proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) involucradas en la replicación viral y la oncogénesis; y la región tardía que codifica 2 proteínas (L1 y L2) que forman la cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, implicada en la introducción del virus a la célula epitelial a través de su interacción con las moléculas de superficie celular (Davidson *et al.*, 2002, Burd, 2003, Tingxi *et al.*, 2005).

Doobar (2005), explica a través de la esquematización de una infección por VPH en una lesión en la piel (**Figura 4**) que el genoma viral está presente con un número bajo de episomas (10 a 200 copias por célula). Durante la diferenciación epitelial, en las capas inferiores (menos diferenciadas), el promotor p97 se activa y dirige la expresión de las proteínas E6 y E7 del VPH, que son necesarias para participar en la fase de síntesis (S) del ciclo celular. Al mismo tiempo el promotor p670 que se encuentra activo en las capas de células epiteliales superiores (más diferenciadas) favorece la expresión y la replicación de las proteínas virales E1, E2, E4 y E5 así como la amplificación del genoma viral. Con la ayuda de los cambios que ocurren en el *splicing* del mRNA de E4, este último, se ve favorecido para continuar con su expresión y facilitar la expresión de los genes de la cápside (L1 y L2), permitiendo así la liberación de nuevas generaciones de VPH en las células que se van descamando de la piel. Este fenómeno se ha reportado para la mayoría de los VPH pertenecientes a la familia *Alpha papillomavirus*.

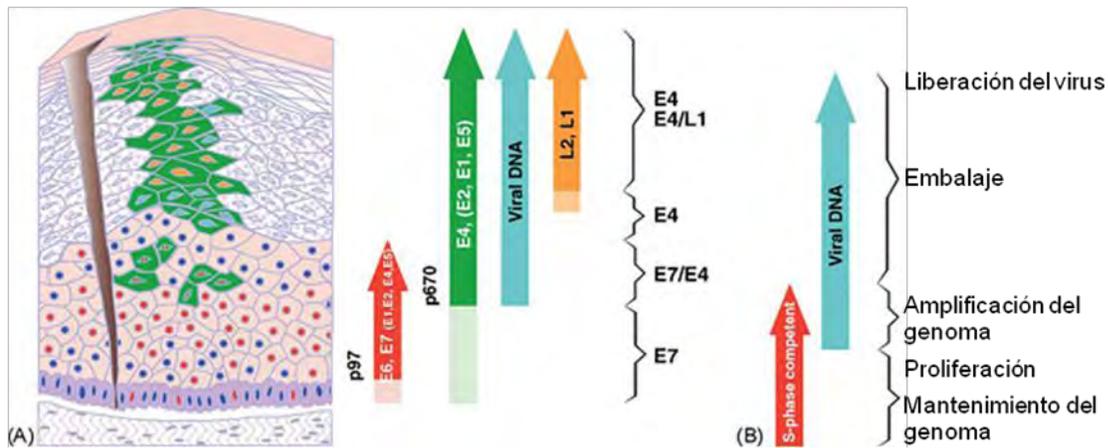


Figura 4. Representación de la progresión de la infección, replicación y liberación de VPH en una lesión epitelial. Los promotores p6 y p670 de la célula epitelial favorecen la expresión y replicación de varias proteínas virales que a su vez amplifican el genoma viral. Tomado de Doobar 2005

Basándose en su asociación con el desarrollo del CaCu y sus lesiones precursoras, son pocos los tipos de VPH que contribuyen a las infecciones en el tracto anogenital y generalmente se encuentran tanto en personas asintomáticos como en pacientes con cáncer (Lizano-Soberón *et al.*, 2009). En once estudios de casos y controles (comprendiendo 9 países) con 1918 mujeres diagnosticadas histológicamente con cáncer escamoso cervical y comparadas con 1928 mujeres control, se reportó que hay quince tipos de VPH que deben ser considerados como alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), doce tipos de VPH considerados como bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) y los tipos 26, 53 y 66 que pueden ser estimados como probables tipos de VPH de alto riesgo (Muñoz *et al.*, 2003).

Cuando las secuencias de nucleótidos entre los VPHs difieren en un 10.0% se consideran diferentes tipos virales; si presentan una diferencia entre 6.0-10.0% se les denominan subtipos virales; y si la secuencia no es la misma entre un 0.1-5.0%, entonces son descritos como variantes virales (Berumen-Campos 2003). La clasificación de los VPHs se realiza por comparación de la secuencia nucleotídica del gene L1, una de las regiones más conservadas dentro del genoma viral.

Aunque también se han encontrado reemplazos de nucleótidos en diferentes regiones del genoma viral, como L2, E6 y LCR que han definido hasta el momento cinco grupos filogenéticos o variantes: Europeo (E), Asiático (A), Asiático-Americano (AA), Africano 1 (Af1) y Africano 2 (Af2) (de Villiers *et al.*, 2004). Actualmente, se sabe que existe recombinación viral entre los VPHs del género *Alpha papillomavirus*, principalmente del gene L2; aunque los genes E6, E7 y L1 también pueden presentar recombinación, tanto en VPH de alto y bajo riesgo. Lo que podría explicar las constantes co-infecciones con más de un tipo de VPH y que permitiría conocer de mejor manera la variación genética del hospedero y por consiguiente generar vacunas con una mejor respuesta inmunológica (Angulo y Carvajal 2007).

En la actualidad, se tienen reportes de los tipos de VPH más frecuentes en diferentes estados de la República Mexicana. A manera de descripción, en el estado de Nayarit, en mujeres diagnosticadas con LIEC-BG y -AG así como con CaCu, se encontró que los VPHs de alto riesgo más frecuentes, en forma decreciente, fueron el **18, 35, 58, 16, 31, 33 y 51** (Aguirre-Hernández *et al.*, 2007). En el estado de Yucatán, González-Losa (2004) reportó que los VPHs más frecuentes en pacientes con LIECs de bajo y alto grado fueron: **VPH-58**, 26.3% y 30.6%, **VPH-16**, 20.0% y 27.4% y **VPH-18**, 13.3% y 11.3%, respectivamente. En 2010, el mismo grupo de trabajo reportó las siguientes frecuencias tomando en cuenta los tipos de VPH y el grado de lesión: **HPV-16**, NIC I: 19.3%, NIC II: 28.5%, NIC III: 18.1% y CaCu: 57.9%; **HPV-58**, NIC I: 29.0%, NIC II: 14.0%, NIC III: 27.2% y CaCu: 21.0% y **VPH-18**, NIC I: 0.0%, NIC II: 21.4%, NIC III: 0.0% y CaCu: 0.0% (Canul-Canche *et al.*, 2010). En el municipio de Frontera Comalapa, en el estado de Chiapas, se estudiaron 225 mujeres con una media de edad de 38.8 (con un intervalo de 21 a 70 años) que acudieron a la realización del estudio de Pap y sólo el 2.22% de las mujeres fueron positivas con iniciadores consenso (MY09/MY11) (Manos *et al.*, 1989), de las cuales sólo en el 1.3% se identificaron el tipo de VPH, reportándose los genotipos **11, 18 y 33** (Domínguez-Arrebillaga *et al.*, 2011). En el estado de Morelos en mujeres con un diagnóstico inicial con neoplasias

intraepiteliales cervicales, se encontró que los tipos de alto riesgo de VPH más frecuentes fueron HPV-**16**, **53**, **31** y **18** con 13.7%, 13.7%, 11.3% y 8.3%, respectivamente (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001).

Recientemente, se hizo un estudio para registrar la prevalencia del VPH en 779 hombres derechohabientes de 27 clínicas públicas de salud en catorce estados de la República Mexicana (Baja California Norte, Chihuahua, Nuevo León, Sonora, Tamaulipas, Ciudad de México, Morelos, Edo. de México, Jalisco, Michoacán, Campeche, Chiapas, Guerrero y Tabasco). Para ello se exhortó a hombres con una media de edad de 34 años que acudieron a practicarse la vasectomía. El estatus social del 75.0% de ellos era “casado”. La prevalencia de cualquier tipo de VPH fue del 8.7%. Los VPH de alto riesgo más frecuentes fueron HPV-**59** (1.5%), -**51** (1.3%), -**16** (0.8%) y -**58** (0.8%). En cuanto a los VPH de bajo riesgo, el VPH-**6** (0.9%) fue el más frecuente (Vaccarella *et al.*, 2006).

1.3.2 Susceptibilidad genética e inmunológica del CaCu

Las infecciones por VPH son muy comunes; sin embargo, son pocas las mujeres que llegan a desarrollar tumores cervicales, sugiriendo que existen co-factores involucrados en la progresión de las infecciones con VPH y el desarrollo de CaCu (Krul *et al.*, 1999, Hidalgo *et al.*, 2003, De la Cruz-Hernández *et al.*, 2005, Dueñas-González *et al.*, 2005, Chong *et al.*, 2006, De la Cruz-Hernández *et al.*, 2007, Prehn 2007).

Entre los factores del hospedero se ha considerado la diversidad genética del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (Svejgaard y Ryder 1994). El MHC está conformado por 3.6 Mb, distribuidas en tres regiones de centrómero a telómero del cromosoma 6 humano: la clase II (1.1 Mb) que resguarda a los genes que transcriben para moléculas HLA clase II (*HLA-DM*, *-DO*, *-DP*, *-DQ* y *-DR*); la clase III (0.7Mb) con genes que codifican para varias moléculas implicadas en la respuesta inmune y transporte de péptidos antigénicos (*C4*, *C2*, *TAP*, *TNF α* , entre

otros); y la clase I (1.8 Mb), que contiene los genes de las moléculas HLA clase I (*HLA-A*, *-B*, *-Cw*, *-D*, *-E* y *-F*). El MHC, es la región del genoma humano con mayor polimorfismo, contiene un total de 239 loci, de entre los cuales 130 son genes expresados, 17 son posibles genes, 4 son genes no codificantes y 88 son pseudogenes (Shiina *et al.*, 2004). En el MHC, la distancia entre genes es muy corta y la recombinación genética muy reducida, estas características, hacen que los genes dentro del complejo se hereden en bloque, definiéndose a este fenómeno como “desequilibrio de enlace genético” (Kwiatkowski 2000, Hajeer y Hutchinson 2000).

Se han registrado varios estudios de los polimorfismos de los genes del MHC, relacionados con el incremento o la disminución del riesgo en el desarrollo del CaCu. Los genes *Transporter Associated with antigen Processing (TAP)*, *-TAP1* y *TAP2*-, presentan un fuerte desequilibrio de enlace con las moléculas MHC clase I, están involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos por moléculas MHC clase I y son genes blanco de algunos virus que provocan su alteración como un mecanismo de escape inmunológico (McCluskey *et al.*, 2004). Gostout y colaboradores (2003), encontraron que en pacientes de Estados Unidos (USA) con carcinomas cervicales, hubo una frecuencia menor del homocigoto *TAP1 C/C*, al compararse con mujeres sanas, mientras que Fowler y Frazer (2004) reportaron que el heterocigoto *TAP2 A/B* era más frecuente en mujeres australianas con cáncer cervical comparadas con mujeres sin ninguna alteración cervical.

Otro estudio reportó que los alelos del grupo I de HLA-Cw (con una asparagina en la posición 80) en mujeres de USA, generaban un riesgo para desarrollar neoplasias cervicales intraepiteliales y cáncer invasor, al modificar la función de estos alelos que funcionan como un ligando activador para los receptores KIR (Martin *et al.*, 2010).

En mujeres suizas se encontró que el locus HLA-DPB1 genera susceptibilidad al desarrollo de cáncer cervical (Ivansson *et al.*, 2011). En tanto, los alelos HLA-DRB1*0401 y *1501, generan un riesgo de 1.23 y 1.29 veces mayor, mientras que los alelos HLA-DRB1*1301 y el SNP de la LTA (rs1041981) generaron un efecto protector con valores de RM= 0.59 y 0.87, respectivamente para el desarrollo del CaCu en mujeres del mismo país (Castro *et al.*, 2009).

Guzalinuer y colaboradores (2010), hallaron en mujeres chinas diagnosticadas con CaCu, que el alelo HLA-DQB1*03 genera un efecto protector (RM=0.683, 95%IC, 0.505-0.923) en la carcinogénesis cervical, en tanto el alelo -DQB1*06 produce un riesgo al desarrollo del CaCu en mujeres con infección específica del VPH-16. Mientras que Hu y colaboradores en el mismo año, reportaron para la misma población pero en mujeres menores a 35 años, que los alelos HLA-DQB1*0301 y *0501 y HLA-DRB1*04, *07 y *09 provocan un riesgo para tener una infección por VPH-16 y desarrollar CaCu. Otro estudio refiriendo la provincia de Guangdong (China), encontró que los alelos HLA-DPB1*1301, *0202; DQB1*030302 y *050301 generaban un riesgo de 2.66, 3.65, 1.85 y 3.94 veces más para desarrollar CaCu y el haplotipo DRB1*13/DQB1*06 generaba un efecto protector (RM=0.17, 95%IC, 0.04-0.08) para no desarrollar la enfermedad (Liang *et al.*, 2008). En otro estudio con mujeres orientales (Japón), diagnosticadas con CaCu, se identificó que los alelos HLA-A*0206 y *2402 generan protección (p=0.002, RM=0.31, 95%IC, 0.15-0.65) y susceptibilidad (p=0.036, RM=1.76, 95%IC, 1.0-3.09), respectivamente (Hosono *et al.*, 2010).

En mujeres con ascendencia franco-canadiense que padecen NICs, se encontró que los alelos HLA-DQB1*03 y *13, no presentaron asociación con las lesiones y que además el haplotipo B7-DRB1*1501-DQB1*0602 generó una disminución en el riesgo a contraer infecciones por VPH-16 y -18 así como la creación de protección al desarrollo de NICs (Ades *et al.*, 2008). En mujeres de la India, diagnosticadas con infección por VPH y cáncer cervical, se ha reportado que el alelo y haplotipo HLA-DRB1*04 y DRB1*04/DQB1*03, provocan susceptibilidad a

desarrollar lesiones precursoras a CaCu. Por otro lado, se reporta que el alelo y haplotipo HLA-DRB1*15 y DRB1*15/DQB1*06, generan también susceptibilidad no sólo a padecer NICs, sino también para adquirir una infección por VPH y desarrollar cáncer cervical y el alelo y haplotipo HLA-DRB1*13 y DRB1*13/DQB1*06 fueron asociados con un efecto protector contra la adquisición de una infección por VPH y desarrollo de CaCu (Kohaar *et al.*, 2009).

En mujeres brasileñas con lesiones precursoras de bajo y alto grado, se encontró que tanto el alelo HLA-G*0103 como el haplotipo G*0101/*0104 generaban una protección para desarrollar lesiones precursoras de alto grado (Simões *et al.*, 2009). Por otro lado, en mujeres argentinas con un diagnóstico de NIC I, III y CaCu, los alelos HLA-DRB1*04 y *0302 produjeron un riesgo, mientras que los alelos HLA-DRB1*13 y -DQB1*02 creaban un papel protector en el desarrollo de NIC III y CaCu (Eiguchi *et al.*, 2008).

En México, se ha reportado que en pacientes con CaCu, los antígenos más frecuentes son HLA-A2, A30, A31 y A32, HLA-B39, B40 y B35 y HLA-DR5 (Silva *et al.*, 1999). En otro estudio más reciente que se efectuó en mujeres diagnosticadas con CaCu e infección por VPH-16, se observó que el alelo HLA-DRB1*15 y el haplotipo DRB1*15/DQB1*0602, generan un riesgo de casi 4 veces más para el CaCu. También se identificó que los haplotipos HLA-A2-B44-DR4-DQ*0302; HLA-A24-B35-DR16-DQ*0301 y HLA-A2-B40-DR4-DQ*0302, están relacionados con un efecto de susceptibilidad para desarrollar la enfermedad ($RM > 1$), mientras que los haplotipos HLA-A2-B39-DR4-DQ*0302; HLA-A24-B35-DR4-DQ*0301 y HLA-A68-B40-DR4-DQ*0302, estaban relacionados con un efecto contrario ($RM < 1$) (Hernández-Hernández *et al.*, 2009).

1.3.2.1 Genes *MHC class I chain-related (MIC)*

Otros grupos de genes ubicados en el MHC y asociados con los genes de *HLA* clase I son los genes *MHC class I chain-related genes (MIC)*, ubicados al final de la región de clase I del MHC (Bahram 2000). Los genes *MIC*, están conformados por siete miembros: *MICA*, *MICB*, *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF* y *MICG*, pero sólo *MICA* y *MICB* codifican para transcritos de mRNA, mientras que los demás son pseudogenes. *MICA* presenta un fuerte desequilibrio de enlace con el gene *HLA-B*, ya que los separa una distancia de 46.5 kb (Bahram 2000).

El gene *MICA* se ha conservado en la mayoría de las especies de mamíferos (humanos, otros primates, perros, gatos, caballos y cerdos) (Stephens *et al.*, 1999). La excepción más ubicua es el ratón en el que no se ha detectado la presencia de esta familia de genes en su genoma (Fodil *et al.*, 1996); sin embargo, presenta otra familia de genes localizados cerca de la vecindad del complejo receptor leucocitario –LCR- (*leukocyte receptor complex*) denominados *MHC class I like located near the LRC (Mill)* con dos miembros *Mill1* y *Mill2*, a los cuales se les atribuye la función de *MICA* y posiblemente *MICB* (Kasahara *et al.*, 2002).

El gene *MICA*, se considera miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y presenta una longitud de 11,722 pb; su primer intrón es muy largo con 6,840 pares de bases (pb) a diferencia del de los genes *HLA* clase I con menos de 200 pb (*HLA-A a –G*) (Shiina *et al.*, 1999); y hasta el momento no existe prueba de algún efecto biológico de esta singularidad. *MICA* genera un transcrito de RNA de 1,382 pb, con una región abierta de lectura de 1149 pb que da origen a un polipéptido de 383 aminoácidos y con un peso molecular de 65-75 kDa (Bahram y Spies 1996, Groh *et al.*, 1998). La proteína *MICA*, contiene tres dominios extracelulares alfa 1 ($\alpha 1$), alfa 2 ($\alpha 2$) y alfa 3 ($\alpha 3$), precedidos de un segmento transmembranal y una cola citoplasmática relativamente corta y sólo comparten una similitud del 19%, 25% y 35% con respecto a los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de las moléculas de *HLA* de clase I (Bahram *et al.*, 1994). *MICA* es una proteína de

membrana que no se asocia con β 2-microglobulina (Li *et al.*, 1999), es independiente de los transportadores TAP y no presenta antígenos. Su expresión ha sido reportada en queratinocitos, células endoteliales y monocitos (Zwirner *et al.*, 1998).

Las proteínas MICA y MICB interactúan con los linfocitos $T\gamma\delta$, $CD8^+$ y células *Natural Killer* (NK) a través de su receptor NKG2D (Strong, 2001) (**Figura 5**). Este receptor, interactúa con la molécula DAP10 y recluta a través de su motivo citoplásmico (YINM) a la subunidad p85 de la cinasa 3 fosfatidilinositol (PIK3) para ser fosforilada e iniciar la movilización de Ca^{2+} , así como, la activación de vías intracelulares de señalización a través de la vía JAK2-STAT5 y las cinasas MAP, ERK y Akt, para activar la respuesta inmunológica (Groh *et al.*, 1998, Bauer *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 1999). Molinero y colaboradores (2006) demostraron que las citocinas IL-2, IL-4 e IL-15, inducen la expresión de mRNA de MICA en los linfocitos T de sangre periférica y es el estímulo en particular de IL-2, el que involucra una señalización vía JAK3-STAT5, p38 MAPK, la cinasa p70₅₆, las cinasas Lck/fyn y NF κ B. Por otro lado, se ha observado que la expresión de MICA también está presente en linfocitos Th1 y Th2 y es regulada por las proteínas de choque térmico que conduce a su sobreexpresión bajo condiciones de estrés (Groh *et al.*, 1998, Li *et al.*, 1999, Bahram 2000).

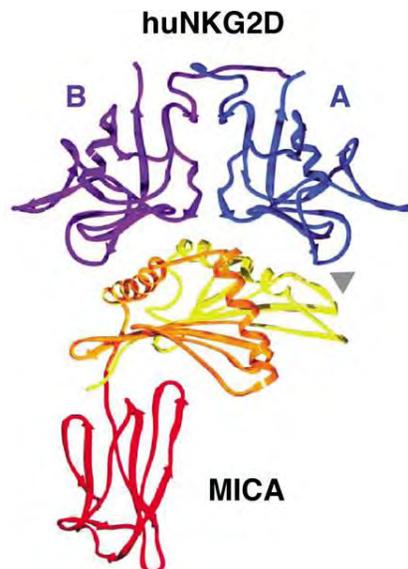


Figura 5. Esquema de la interacción ligando-receptor de MICA y NKG2D. Se cree que la interacción MICA-NKG2D puede participar en el proceso de eliminación de células dañadas o infectadas por virus al sobreexpresarse MICA por estrés. Tomado de Strong 2001

Se ha incrementado el interés en estudiar las funciones biológicas que pueda tener MICA. Por mencionar algunos ejemplos, se ha identificado que en condiciones basales, la frecuencia de linfocitos $T\gamma\delta$ es baja en los órganos linfoides y sangre periférica, sin embargo, aumenta cuando las moléculas de MICA y MICB se unen al receptor NKG2D (Groh *et al.*, 1998, Bahram 2000). Se ha considerado que las células $T\gamma\delta$, intervienen en el enlace entre la inmunidad natural y la inmunidad adquirida (Mak y Ferrick 1998), y se cree que los linfocitos $T\gamma\delta$ y las moléculas MICA y MICB podrían participar en el proceso de eliminación de células dañadas o infectadas por virus, al sobreexpresarse la molécula bajo condiciones de estrés (Cosman *et al.*, 2001). Kato y colaboradores (2007) reportaron, que al estimular líneas celulares leucémicas con tricostatina A, pueden incrementar la acetilación de la histona H3 y modificar los niveles de expresión de las proteínas MICA y MICB. El mismo efecto se presentó cuando Yamanegi y colaboradores (2010), estimularon células de osteosarcoma humano con valproato de sodio, concluyendo ambos que este fenómeno puede ser una posible inmunoterapia al aumentar la susceptibilidad de las células leucémicas y cancerosas a través de la citotoxicidad de las células que expresan el receptor

NKG2D y se cree que los linfocitos $T\gamma\delta$ y las moléculas MICA y MICB podrían participar en el proceso de eliminación de células dañadas o infectadas por virus, al sobreexpresarse la molécula bajo condiciones de estrés.

Se ha reportado también que los linfocitos T $CD8^+$ en células infectadas con Citomegalovirus Humano (CMVH) son activadas de la misma manera (Groh *et al.*, 2001); pero, esta función es inhibida por la unión de la glucoproteína UL16 (*unique long*) del CMVH, con la molécula de MICB, generando así un escape inmunológico (Cosman *et al.*, 2001).

En líneas celulares tumorales de cáncer cervical (InBI y CaLo), se encontró que expresan las moléculas MICA y MICB, que a su vez, sirven como un factor inductor para su propia proliferación y además inducen la expresión de su receptor NKG2D. Los autores concluyen que las células tumorales pueden simultáneamente secretar las moléculas MIC y expresar su receptor, facilitando la proliferación celular y sirviendo como un posible escape inmunológico (Weiss-Steider *et al.*, 2011).

Los genes *MICA* y *MICB* presentan un amplio polimorfismo. Hasta octubre de 2011, se tienen reportados 80 alelos, 63 proteínas y 2 alelos nulos para *MICA* y 33 alelos, 22 proteínas y 2 alelos nulos para *MICB* (<http://www.anthonynolan.org.uk>). Los polimorfismos genéticos de *MICA* (generados por sustituciones nucleotídicas no sinónimas y sinónimas) se encuentran dentro de los exones 2-5, que codifican los dominios extracelulares $\alpha 1$ (exón 2), $\alpha 2$ (exón 3) y $\alpha 3$ (exón 4) y la región transmembranal (exón 5) (Stephens *et al.*, 1999). El exón 5, tiene una región microsatelital que codifica polialaninas (A) y dependiendo el número de repeticiones del triplete GCT, se le asigna un número arábigo. Actualmente, hay ocho tipos de microsatélites reportados los cuales son: A4, A5, A6, A7, A8, A9 y A10 (Rueda *et al.*, 2002). Se ha definido otra variedad del microsatélite A5, el A5.1, que contiene cinco repeticiones del triplete y una inserción de un nucleótido (GGCT), esto mueve el marco de lectura y origina un codón de término (TAA)

premature, provocando la pérdida de la región transmembranal de la molécula de MICA, generando así una molécula soluble (Mizuki *et al.*, 1997; Groh *et al.*, 2002; Rueda *et al.*, 2002). A partir del descubrimiento del gene *MICA*, sus polimorfismos (principalmente la región microsatelital), se han relacionado con la susceptibilidad o protección de enfermedades en distintas poblaciones (**Tabla 2**).

Tabla 2. Polimorfismos del gene *MICA* y su asociación con enfermedades humanas.

Microsátelite	Enfermedad	Población	Referencia
A4	Artritis Psoriática	Croata	Grubic <i>et al.</i> , 2004
A9		Española	González <i>et al.</i> , 2002
A4	Enfermedad de Kawasaki	Tailandesa	Huang <i>et al.</i> , 2000
A5	Enfermedad de Grave's		Lo <i>et al.</i> , 2003
A5	Diabetes Mellitus tipo I	Suiza	Gupta <i>et al.</i> , 2003
A5.1	Psoriasis vulgaris	Coreana	Cheng <i>et al.</i> , 2000
		China	Choi <i>et al.</i> , 2000
A5.1	Enfermedad de Addison	Italiana	Gambelunghe <i>et al.</i> , 1999
A6	Artritis Reumatoide	Caucásica	Singal <i>et al.</i> , 2001
A6	Colitis ulcerativa		Sugimura <i>et al.</i> , 2001
A6 y A9	Enfermedad de Behçet		Wallace <i>et al.</i> , 1999
A9		Japonesa	Mizuki <i>et al.</i> , 1997
A9	Fiebre Mediterranea Familiar	Francesa	Touitou <i>et al.</i> , 2001

1.3.2.2 Genes *Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF α)* y *Linfotoxina alpha (LTA)*

La familia de los genes *TNF*, se encuentra localizada en la región III del MHC, en la posición 6p21.3 del brazo corto del cromosoma 6 humano, con una longitud aproximada de 7.0 kilobases (kb) (Hajeer y Hutchinson 2000). Además del gene *Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF α)*, se encuentran los genes del *Factor de Necrosis Tumoral beta* conocido también como *Linfotoxina alpha (TNF β , LTA o LTA)* y *Linfotoxina Beta (LT β)*, implicados en estimular la neogénesis linfoide y la formación de centros germinales secundarios (Rennert *et al.*, 1999).

A lo largo de las 7.0 kb que comprende la familia de los genes *TNF*, se encuentran cinco microsátélites (*TNF* α , -b, -c, -d y -e) con repeticiones dinucleótidas. Cada microsátélite tiene diferente número de alelos dependiendo del número de repeticiones dinucleotídicas: 14-*TNF* α , 7-*TNF* β , 2-*TNF* γ , 7-*TNF* δ y 3-*TNF* ϵ . Los microsátélites *TNF* α y *TNF* β , presentan repeticiones GT (99pb-125pb) y GA (125pb-131pb), respectivamente y se localizan a 3.5 kb corriente arriba del gene *LTA*. El microsátélite *TNF* γ , tiene repetidos GA de 159 pb y 161 pb ubicados en el primer intrón del gene *LTA* (Udalova *et al.*, 1993; Khoo *et al.*, 1997, Albuquerque *et al.*, 1998). Los microsátélites *TNF* δ y *TNF* ϵ contienen los dinucleótidos GA con repeticiones de 124 pb - 136 pb y 98 pb – 102 pb, respectivamente, y se localizan a 8-10 kb corriente abajo del gene *TNF* α (Udalova *et al.*, 1993) (**Figura 6**).

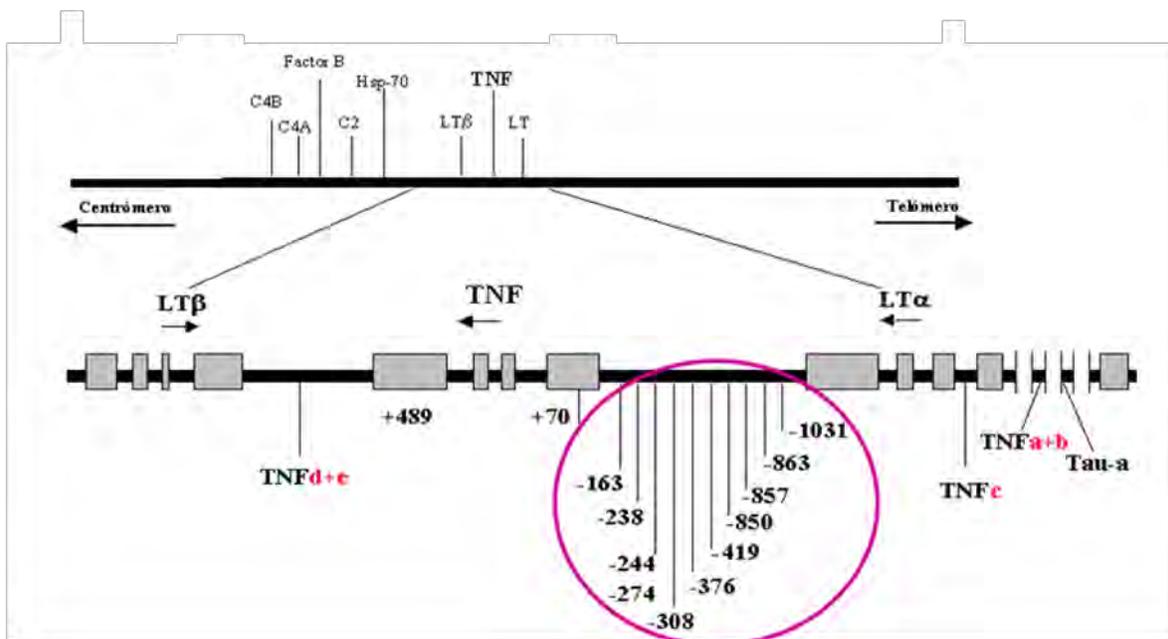


Figura 6. Organización de los genes de la familia *TNF*. Son tres genes *TNF* α , *LT* α y *LT* β , tiene además 5 regiones microsatelitales (a-d). La región promotora de *TNF* α tiene varios SNPs y los más estudiados son *TNF* α -238 y -308. Modificado de Udalova *et al.*, 1993

En esta misma región se han descrito 13 SNPs, de los cuales 11 se encuentran en la región promotora y 2 inserciones en los exones 1 y 4 del gene *TNF α* . Los SNPs en las posiciones *TNF α* -238 y -308 presentan un cambio de G→A y son las más estudiadas debido a cambios en la actividad transcripcional del gene que predisponen al desarrollo de diferentes enfermedades (Parra-Rojas *et al.*, 2006). El haplotipo *TNF α* -238*G-308*A-376*G se asocia con una mayor producción de *TNF α* , en cambio el haplotipo *TNF α* -238*A-308*G-376*A se asocia con la disminución de *TNF α* (Hajeer y Hutchinson, 2000, Lio *et al.*, 2003, Bednarczuk *et al.*, 2004, Grubic *et al.*, 2004).

La citocina *TNF α* , en forma conjunta con IL-1 e IL-6, participan en la primera fase de la respuesta inmune innata. Se ha encontrado que en neutrófilos, macrófagos y células del endotelio vascular, incrementa la expresión de moléculas de adhesión para iniciar una respuesta inflamatoria dirigida a los tejidos con daño e infección. Además, incrementa la temperatura, produce somnolencia, permite la liberación de glucocorticoides (Hermann *et al.*, 1998) y regula la apoptosis mediante la función citotóxica a través de la vía del receptor TNFR-1 (Idriss y Naismith 2000). La purificación de la proteína *TNF α* , a partir de macrófagos activados y células T, reveló que posee el 30.0% de homología con la proteína LTA y presenta una estructura trimérica en forma de pera-cónica (**Figuras 7a y 7b**). Dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición, *TNF α* activa proteínas G, factores de transcripción (NF- κ B, AP-1), proteínas cinasas (CKII, Erk-1, Erk-2 y MAP2), fosfolipasas (PLA₂, PLC, PLD y esfingomielinasa), proteínas mitocondriales (manganeso-superóxido dismutasa) y serina/cisteina proteasas conocidas como caspasas. La citotoxicidad de *TNF α* , logra que en células tumorales se alteren la función de los microtúbulos mediante la tubulina-nitrotirosinilada (Idriss y Naismith, 2000).

Al igual que con el gene *MICA*, el estudio de los polimorfismos de los genes *TNF* se ha comenzado a realizar en varias poblaciones, con la finalidad de determinar marcadores genéticos de susceptibilidad o protección en varias enfermedades

humanas, para generar bases científicas que puedan ayudar a desarrollar tratamientos terapéuticos adecuados a las necesidades y condiciones de cada población dependiendo su información genética (**Tabla 3**).

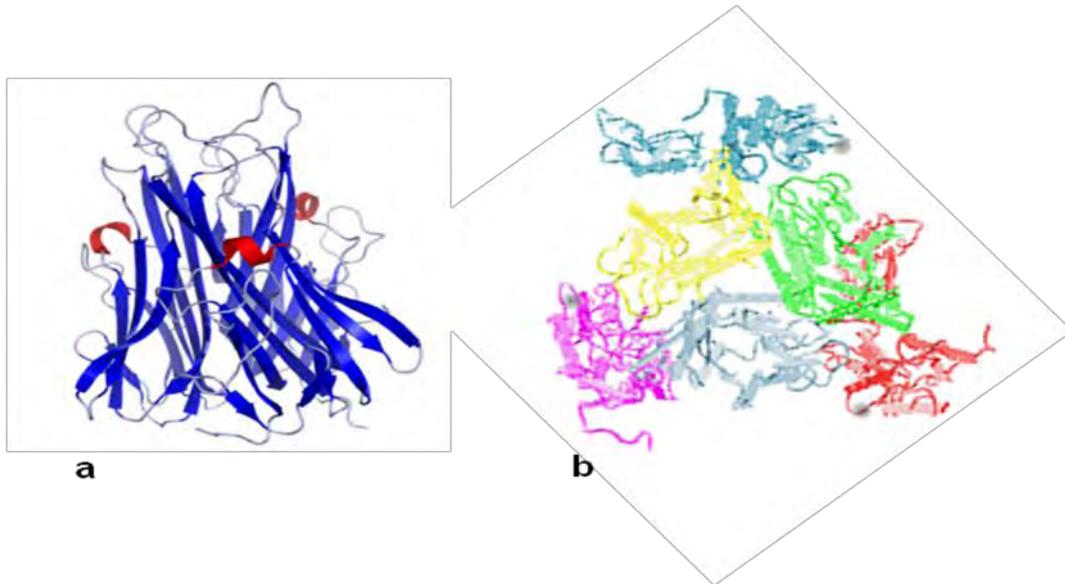


Figura 7a. Representación de la proteína TNF α y **7b.** Estructura cristalográfica del complejo TNF α -TNFR2. Tomado de Mukai et al., 2010

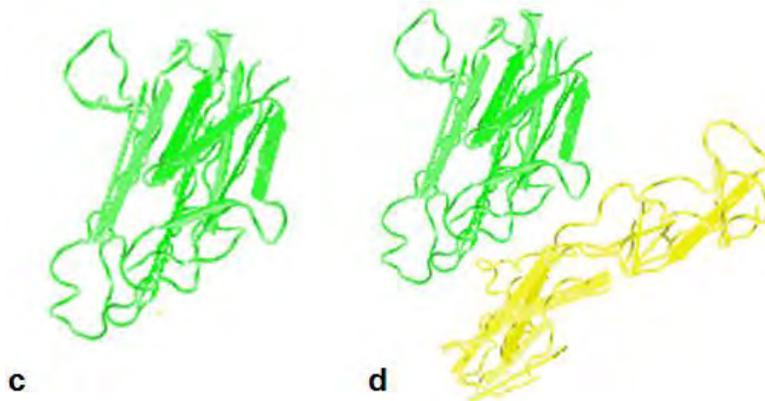


Figura 7c. Representación de la proteína LTA y **7d.** Estructura cristalográfica del complejo LTA-TNFR 55 kD. Tomado de Banner et al., 1993

Tabla 3. Polimorfismos de los SNPs de *TNF α* , *LTA* y microsatélites (*TNF α -e*) de la familia de *TNF* y su asociación con enfermedades humanas.

SNP/Microsatélite	Enfermedad	Población	Referencia
TNF-308*A	Asma o malaria cerebral	Australiana	Albuquerque <i>et al.</i> , 1998
	Lepromatosis y lepra tuberculosa	Africana	Hajeer y Hutchinson, 2000
	Dengue	Vietnamitas	Loke <i>et al.</i> , 1996
	Enfermedad de Bowel	Caucásica	Hirv <i>et al.</i> , 1999
	Sarcoidosis		Somoskövi <i>et al.</i> , 1999
TNF-863*C, TNF-1082*G	Hepatitis C	Italiana	Lio <i>et al.</i> , 2003
TNFc2	SIDA	USA	Brinkman <i>et al.</i> , 1997 Khoo <i>et al.</i> , 1997
TNF-857*T	Uveitis anterior aguda	Reino Unido	Kuo <i>et al.</i> , 2005
LTA+252	Oftalmia simpatética		Atan <i>et al.</i> , 2005
LTA+804, LTA+495	Diferentes tipos de cáncer	Japonesa	Takei <i>et al.</i> , 2008
TNF-1031*C	Endometriosis		Asghar <i>et al.</i> , 2004
	Enfermedad de Behçet	Turca	Akman <i>et al.</i> , 2006

2. Planteamiento del Problema

En México, el CaCu representa un problema de salud que afecta a mujeres en edad productiva. Este cáncer está estrechamente asociado con la infección por VPH; sin embargo, tiene una etiología multifactorial, en la que existen factores genéticos involucrados en la respuesta inmune del hospedero. Los genes *MICA*, *TNF α* y *LTA*, ubicados en el MHC, participan en la respuesta inmune y por las actividades inmunológicas que poseen en epitelios hacia virus y células tumorales, podrían ser factores involucrados con el desarrollo y progresión de CaCu. Los polimorfismos de estos genes se han asociado con susceptibilidad en una variedad de enfermedades autoinmunes, infecciosas e inflamatorias, así como en diferentes tipos de cáncer. Por lo anterior, existe la posibilidad de que los polimorfismos del gene *MICA*, los SNPs de la región promotora del gene *TNF α* y la *LTA*, se encuentren asociados con susceptibilidad en el desarrollo de las lesiones precursoras al cáncer cérvico uterino.

3. Hipótesis

Si los polimorfismos del gene *MICA*, los SNPs de la región promotora de *TNF α* y la *LTA* están involucrados con la susceptibilidad al desarrollo de lesiones precursoras a cáncer cérvico uterino, entonces presentarán diferentes frecuencias génicas, genotípicas y haplotípicas entre mujeres mexicanas con infección por VPH y con algún grado de lesión cervical, y mujeres sin infección por VPH y ninguna lesión cervical.

4. Objetivo

4.1 Objetivo General

Investigar si existe asociación de los polimorfismos de los genes *MICA*, los SNPs de la región promotora de *TNF α* y la posición+252 de la *LTA* con el desarrollo de las lesiones precursoras al cáncer cérvico uterino.

4.1 Objetivos Particulares

- * Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos de *MICA*, los SNPs -163, -238, -244, -308, -376, -857, -863 y -1031 de la región promotora de *TNF α* y la posición intrónica +252 de la *LTA* en mujeres mexicanas con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado.
- * Identificar la infección y el tipo de VPH y buscar si existe una correlación con los polimorfismos genéticos, en las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado.

5. Material y Métodos

5.1 Grupos de mujeres, control y pacientes con LIEC-BG y LIEC-AG

Se estudiaron mujeres adultas, con al menos dos generaciones anteriores nacidas en México. El grupo control consistió de 210 mujeres con antecedentes de estudios citológicos (Pap) anuales con resultado normal por cuatro años consecutivos, provenientes del departamento de Medicina Preventiva del Hospital General de Zona No. 32, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). El grupo de pacientes estuvo constituido por 196 mujeres con citología y colposcopia positivas a la infección por VPH, seleccionadas de la Clínica de Displasias del Hospital General de Zona 1A "Venados", del IMSS.

En las pacientes, se incluyeron mujeres sin ningún tipo de tratamiento previo y fueron distribuidas de acuerdo a la clasificación Bethesda (Berek 2003) de la siguiente manera: 134 con LIEC-BG y 62 con LIEC-AG. Tanto las pacientes como los controles, participaron previo consentimiento informado y se les aplicó un cuestionario relacionado con factores de riesgo para el CaCu los cuales incluían: escolaridad, alimentación, edad de inicio de actividad sexual, número de parejas sexuales, número de gestas, partos y abortos, tiempo de uso y tipo de método anticonceptivo, higiene genital adicional.

El número de muestras se estimó mediante un análisis estadístico, basado en la frecuencia de los polimorfismos de los genes estudiados, usando el programa EPIINFO 6.04D 2001, USA.

5.2 Material Biológico

Se tomaron 5 mL de sangre periférica tanto a pacientes y controles para extraer el DNA a través de la técnica de *salting out* (Miller *et al.*, 1998), y un cepillado cervical para obtener el DNA mediante la digestión de la muestra con proteinasa k

(Sepp *et al.*, 1994). El DNA de sangre periférica y el DNA cervical, se cuantificaron por espectrofotometría y se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Shelton Amershand, USA).

5.3 Detección de Infección por VPH

La detección de VPH se realizó en ambos grupos de trabajo (control y pacientes) mediante PCR a partir del DNA cervical, utilizando iniciadores consenso MY09-MY11 y GP5+-GP6+ que amplifican 450 pb y 150 pb del gene L1 del virus, respectivamente (Manos *et al.*, 1989, de Roda *et al.*, 1995, Qu *et al.*, 1997, Carrillo *et al.*, 2004). En este estudio no se incluyeron aquellas muestras del grupo control que resultaron ser positivas a VPH.

5.4 Tipificación del VPH

La tipificación del VPH se realizó con el kit comercial *PVHfast 2.0* (Pharma Gen, Madrid, España) el cual identifica 52 tipos de VPH, todos ellos reportados en infecciones en mucosas, que amplifica una región del gene L1 de la cápside del virus a partir de DNA de células epiteliales provenientes de la zona del cuello uterino. La reacción de PCR tiene un control interno (1,202 pb) que consiste de un plásmido que tiene insertado el gene constitutivo CFTR (892 pb). Después de realizar la reacción de PCR a partir de las condiciones de amplificación dadas por el proveedor, se obtuvieron los productos de PCR. Una muestra se consideró positiva a VPH cuando se obtenían productos de 1202 pb (control interno) y 450 pb (región del gene L1) y negativa cuando los productos que se obtenían eran 1,202 pb (control interno) y 892 pb (gene CRTR). Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1.0% (Shelton Amershand, USA) utilizando como marcador de peso molecular el DNA Molecular Weight Marker VIII (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

Mediante la técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) las muestras positivas se digirieron con las dos enzimas [enzima 1 (RsaI) y enzima 2 (desconocida)], de restricción contenidas en el kit. Los productos digeridos fueron observados en geles de agarosa al 3.0% (Shelton amershand, USA) utilizando el mismo marcador de peso molecular mencionado anteriormente. El tipo de VPH se identificó al comparar los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis de las dos digestiones (E1 y E1+E2 para cada muestra) con la hoja de resultados adjunta en el kit (Díaz-Flores, *et al.*, 2000) **Figura 8**.

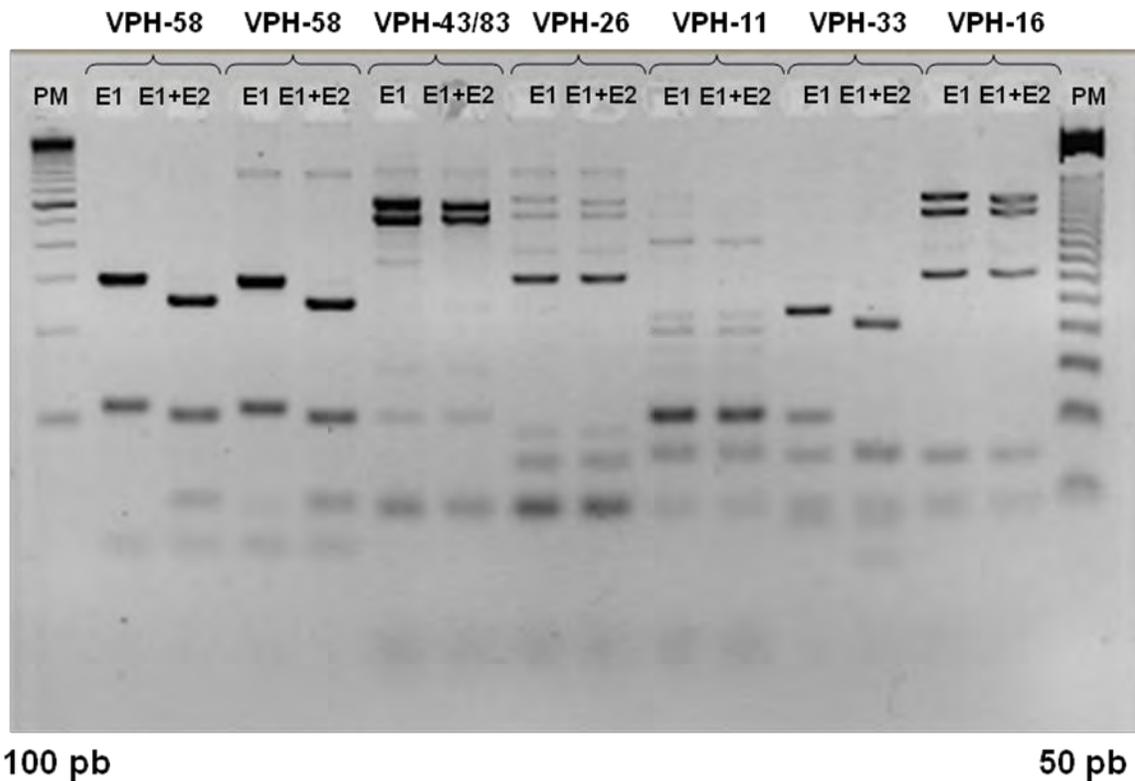


Figura 8. Tipificación de VPH. Se observa una electroforesis con productos de PCR digeridos y organizados en E1 y E1+E2 de diferentes muestras del grupo de pacientes identificados con la hoja de referencia del kit comercial *PVHfast 2.0*.

5.5 Tipificación de los polimorfismos del gene *MICA*

La tipificación de los polimorfismos para el gene *MICA* se realizó con una técnica conformacional de DNA llamada *Reference Strand Conformational Analysis* (RSCA) (**Figura 9**) (Argüello *et al.*, 1998).

El primer paso de RSCA inicia con la creación de las FLR (*Fluorescence Labelled Reference*) (**Figura 9a**) mediante amplificación por PCR, con un iniciador (sentido o antisentido) marcado con el fluorocromo carbocianina 5 (Cy5), del locus específico a estudiar (*i.e.* exones 2-5 del gene *MICA*), a partir de DNA de líneas celulares linfoblastoides homocigotas con alelos del gene *MICA* conocidos (Marsh *et al.*, 2010). En forma independiente, se realiza una amplificación del mismo locus en cada una de las muestras a estudiar, usando los mismos iniciadores pero sin marcar (**Figura 9b**). Posteriormente, los productos de PCR de ambas muestras se mezclan en relación 1:3 (FLR y producto PCR de la muestra) y se lleva a cabo su desnaturalización e hibridación (**Figura 9c**), formándose combinaciones de homodúplex y heterodúplex (**Figura 9d**). La conformación molecular de cada dúplex resultante es única, y está basada en el nivel de complementariedad. Debido a que la movilidad del DNA de doble cadena en un gel de acrilamida no desnaturalizante en condiciones electroforéticas constantes depende únicamente del peso y de la conformación molecular; al presentar todos los dúplex el mismo peso molecular, su migración dependerá exclusivamente de las diferencias en la conformación molecular, lo que se reflejará en la movilidad electroforética (**Figura 9e**). Para tipificar cada muestra, las diferentes movilidades se comparan con las de controles internos que son productos de PCR a partir de muestras con secuencia y su patrón de migración electroforética conocidos; a estos controles se les denomina "*ladders*".

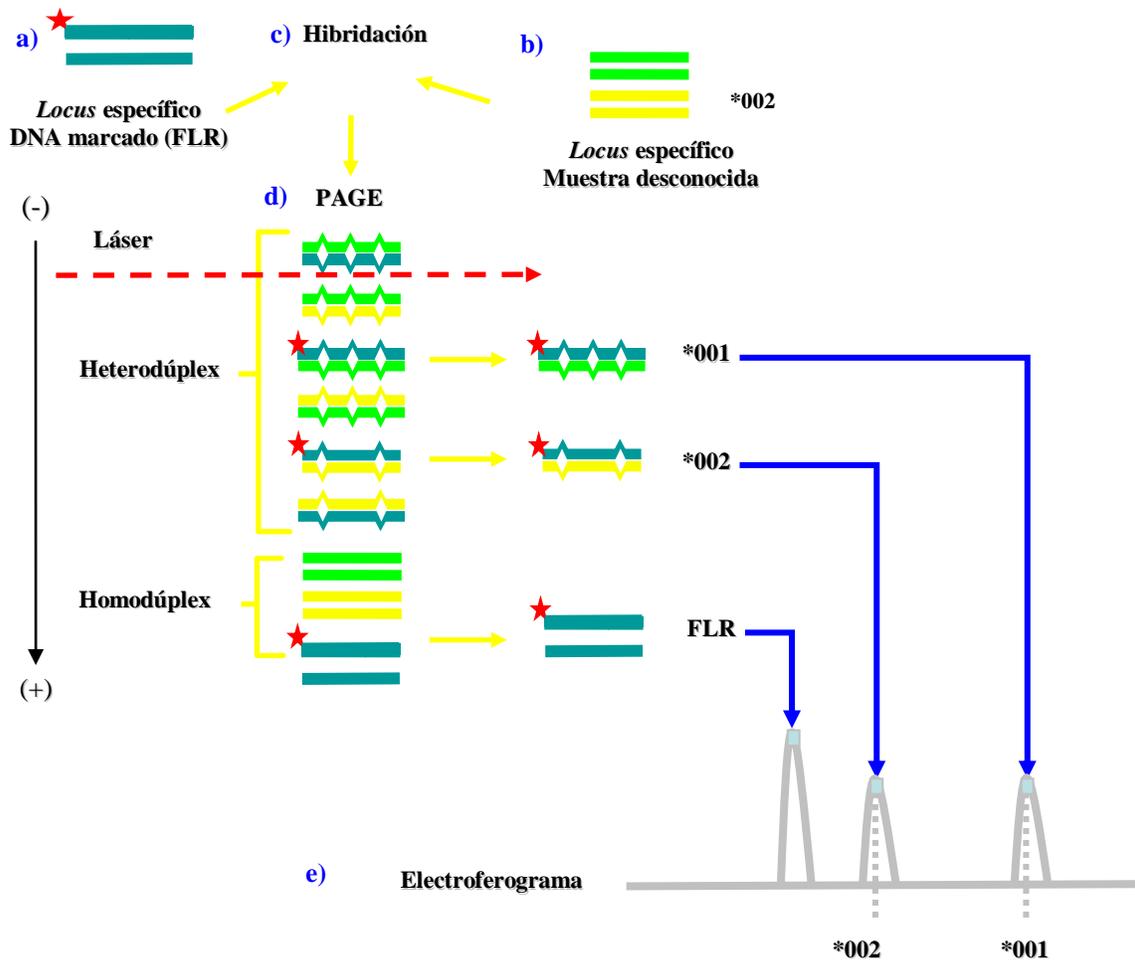


Figura 9. Técnica de Análisis Conformacional mediante una Cadena de Referencia (RSCA) para la tipificación del polimorfismo del gene *MICA*. **9a)** Amplificación de FLRs, **9b)** amplificación de muestras, **9c)** hibridación de FLR y producto de PCR de muestra (1:3), **9d)** formación de homodúplex y heterodúplex y **9e)** electroferograma.

Para la tipificación del gene *MICA*, las muestras (controles y pacientes) se amplificaron por separado los exones 2-3 y los exones 4-5.

Un fragmento de 949 pb correspondiente a la amplificación del exón 2 al 3 fue obtenido con iniciadores específicos (sentido 5'-TCCTGCCCCAGGAAGGTTGGG-3' y antisentido 5'-AGGGAGAGGAGAGCCCTTGGC-3') (Aquino-Galvez *et al.*, 2009). La reacción de PCR se llevó a cabo con una mezcla de 500 ng de DNA, 0.5

pmol de cada iniciador, 0.03 UI de Taq Polimerasa (Invitrogene, California, USA), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 16 mM de Tris-HCl (pH 8.4) y 50 mM de KCl en un volumen final de 25 ul. Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de 95°C por 5 min, seguida de 33 ciclos a 95°C por 30 seg, 65°C por 50 seg y 72°C por 30 seg, y un paso final de 72°C por 8 min.

Por otra parte, un fragmento de 678 pb correspondiente a la secuencia del exón 4 al 5 fue amplificado con iniciadores específicos (sentido 5'-CAGACTTGCAGGTCAGGGGTCCCG-3' y antisentido 5'-CCTTACCATCTCCAGAACTGC-3') (Aquino-Galvez *et al.*, 2009). La reacción de PCR se realizó con una mezcla de 500 ng de DNA, 0.5 pmol de cada iniciador, 0.03 UI de Taq Polimerasa (Invitrogene, California, USA), 2.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 16 mM de Tris-HCl (pH 8.4) y 50 mM de KCl en un volumen final de 25 ul. Las condiciones de reacción fueron: un paso inicial de 94°C por 4 min seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 63°C por 1.30 min y 72°C por 2 min y un paso final de 72°C por 10 min.

Debido a que, la tipificación de alelos usando la técnica de RSCA, exclusivamente está dada por la diferencias en la conformación molecular, en algunas muestras (controles y pacientes) el amplificado de los exones 2-3 y 4-5 presentaron la misma movilidad electroforética de los dúplex, situación que hizo difícil su interpretación para la tipificación de alelos. Para evitar errores en la selección alelica de *MICA*, se usó el criterio de amplificar sólo la región microsatelital (exón 5) que consistió en obtener un fragmento de 185 pb amplificado con la ayuda del iniciador sentido 5'-CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC-3' y el iniciador antisentido 5'-CCTTACCATCTCCAGAACTGC-3' (Mizuki *et al.*, 1997). La reacción de PCR consistió de una mezcla con 250 ng de DNA, 0.5 pmol de cada iniciador, 0.03 UI de Taq Polimerasa (Invitrogene, California, USA), 1.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 16 mM de Tris-HCl (pH 8.4) y 50 mM de KCl en un volumen de 25 ul. Las condiciones de PCR fueron: un paso inicial de 95°C por 5 min, seguida de 33

ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1 min, y un paso final de 72°C por 8 min.

Se usaron de dos a tres FLRs para cada locus. Las líneas celulares que se emplearon como FLRs para *MICA* exones 2-3 fueron EJ32B (*001), PITOUT (*004) y WT47 (*008:01), para *MICA* exones 4-5 las FLRs fueron DUCAF (*001) y MOU (*004) y para el exón 5 las FLRs fueron EJ32B (A4) y MOU (A6).

Todos los geles utilizados fueron no desnaturalizantes al 6.0% de acrilamida (30.0%) (Sigma, USA), con un tamaño de 21 cm de largo y 0.5 mm de espesor. La electroforesis se llevó a cabo en TBE (1X) a 40°C, 647 V, 46 mA, y 30 W por 480 minutos.

Las movilidades de los diferentes dúplex fueron analizadas con el software Allelocator 1.03 (*Amersham Pharmacia Biotech*). La corrección del gel y el análisis de los datos se realizaron asignando al pico del iniciador fluorescente el valor de 1 y al homodúplex el valor de 1,000, para alinear de esta forma todos los homodúplex. Finalmente, las movilidades de las muestras fueron comparadas con las *ladders* de cada FLR para determinar los alelos (**Figura 10 a y b**).

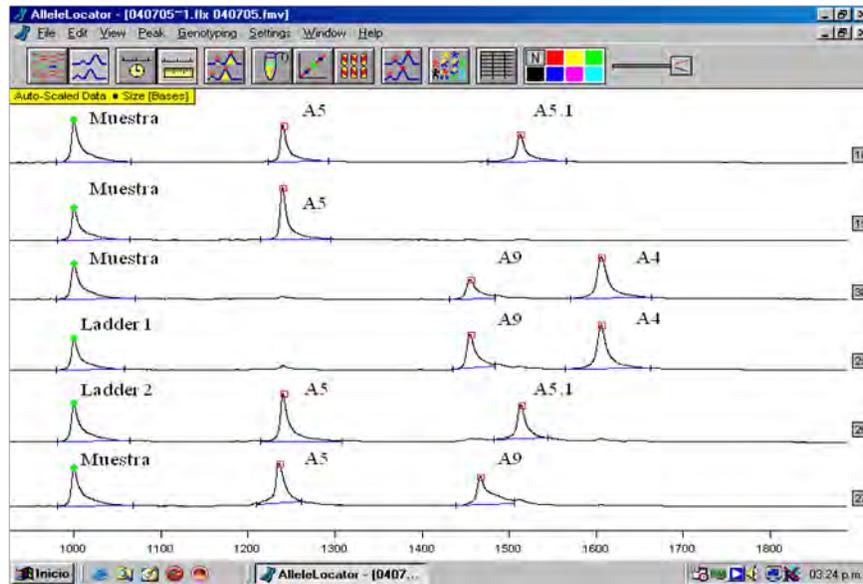


Figura 10a. Electroferograma de *MICA* exón 5 con las FLRs A4 y A6.

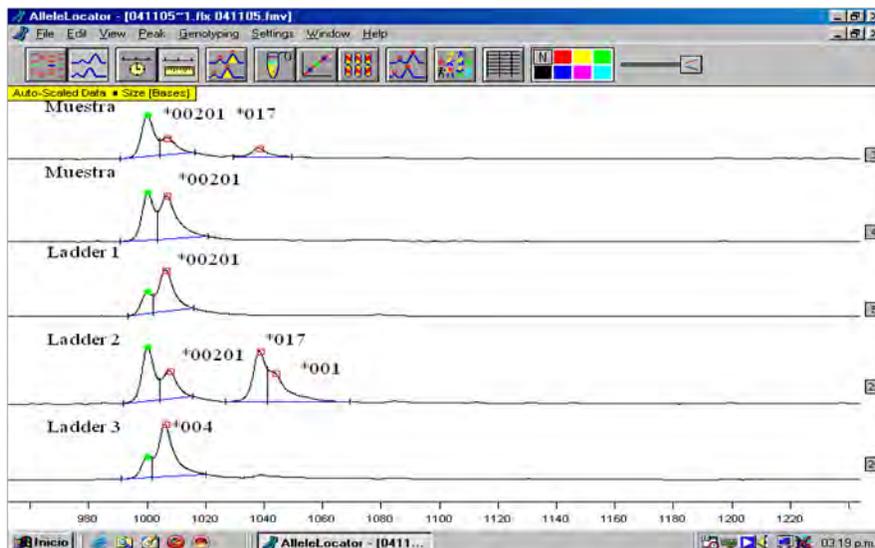


Figura 10b. Electroferograma de *MICA* exones 2-3 con las FLRs *MICA* *001, *004 y *008:01 en la figura se observan muestras homocigotas, heterocigotas y las *ladders* respectivas.

5.6 Tipificación de los SNPs de la región promotora de *TNF α*

Los SNPs de la región promotora de *TNF α* fueron estudiados empleando la secuencia del GenBank con número de acceso Z15026: -163 (G→A) (sin números), -238 (G→A) (rs361525), -244 (G→A) (rs673), -308 (G→A) (rs1800629), -376 (G→A) (rs1800750), -857 (C→T) (rs1799724), -863 (C→A) (rs1800630) y -1301 (T→C) (rs1799964). Estos SNPs fueron tipificados en las muestras de DNA mediante el uso de sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP). Se diseñaron las sondas para los SNPs -163 (CTTCTCCATCGCGGGGGC), -244 (GATTCCGAGGGGGGTCTT), -308 AACCCCGTCCCCATGCCC y -376 (CCTTCTAACTTCGAGACA) con sus respectivas contrapartes. El resto de las sondas para las demás SNPs de la región promotora de *TNF α* (-238, -857, -863, and -1031) fueron empleadas como previamente se publicaron (Higuchi *et al.*, 1998).

Un fragmento de 1,355 pb fue amplificado con el iniciador sentido 5'-GTCAGGGGATGTGGCGTCT-3' (Wilson *et al.*, 1997) y el antisentido 5'-GCTTGTGTGTGTGTGTCTGG-3' (Niizeki *et al.*, 2000). La reacción de PCR se realizó con 0.16 ng de DNA, 0.25 pmol de cada iniciador, 0.03 UI de Taq Polimerasa (Invitrogene, California, USA), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 16 mM de Tris-HCl (pH 8.4) y 50 mM de KCl. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 3 min, 64°C por 1 min, 72°C por 1 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 64°C por 1 min and 72°C por 1 min, y un ciclo final de 94°C por 1 min, 64°C por 1 min and 72°C por 5 min.

Después de comprobar la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% (Shelton Amershand, USA) por 35 minutos y a 75 volts, el producto de PCR se llevó a 95°C por 4 min; enseguida los productos de PCR se colocaron en hielo para asegurar la desnaturalización. Se tomaron 4 μ l de cada producto desnaturalizado y se depositó en una membrana de nylon Hybond-N+ (GE Healthcare Life Sciences). Posteriormente, se fijaron los productos de PCR

desnaturalizados a través de la exposición por 15 seg con luz UV (UV Stratalinker 2400, Stratagene) y se guardaron a 4°C hasta su utilización. Se empleo como control positivo el producto de PCR de DNA genómico de la línea celular B- linfoblastoide homocigota “Boleth” con los alelos siguientes: TNF α -163G, -238G, -244G, -376G, -857C, -863A y -1031C (Udalova *et al.*, 1993), perteneciente a las líneas celulares del *International Histocompatibility Workshop* (Marsh *et al.*, 1997).

Un total de 16 sondas fueron empleadas para identificar 8 SNPs de la región promotora de *TNF α* . Las sondas fueron marcadas con digoxigenina de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, USA). Cada membrana de nylon con los productos de PCR desnaturalizados y fijados fueron hibridados con una dilución de 10 ul de sonda en 10 ml de buffer de hibridación (TMAC [50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 3 mol/L de cloruro de tetrametilamonio, EDTA 2 mmol/L y SDS al 0.1%] + sonda) por 1.30 min, transcurrido este tiempo el volumen se rescató y se reutilizó poniendo 1 ul de sonda al volumen rescatado cada vez que se fuera a reutilizar; posteriormente se hicieron tres lavados con 10 ml buffer de lavado (TMAC) por 10 min cada uno. Las temperaturas de hibridación y lavado fueron ajustadas particularmente dependendiendo la temperatura media de cada sonda (**Tabla 4**). Las membranas se revelaron con PCDB (Roche Applied Science, USA) y la imagen se conservó en una película radiográfica (Kodak film 20.3 X 25.4 cm T-MAT G/RA) (Endo *et al.*, 2001) **Figura 11**.

Tabla 4. Sondas de oligonucleótidos de secuencia específica para la tipificación de los SNPs de la región promotora de *TNF α* . La temperatura de hibridación y lavado se calcularon para cada sonda tomando en cuenta la temperatura media.

Sonda	SNP	Secuencia	TH(°C)	TL (°C)	Núm. rs
1	-163 G	CTTCTCCATCG C GGGGGC	55.0	62.0	sin número
2	-163 A	CTTCTCCATCG T GGGGGC	53.0	62.0	
3	-238 G	CTCCCTGCTC C GATTCCG	53.0	62.0	rs361525
4	-238 A	CTCCCTGCTC T GATTCCG	50.0	66.0	
5	-244 G	GATTC C GAGGGGGGTCTT	50.0	62.0	rs673
6	-244 A	GATTC T GAGGGGGGTCTT	47.0	58.0	
7	-308 G	AACCCCGTCC C CATGCCC	56.0	62.0	rs1800629
8	-308 A	AACCCCGTCC T CATGCCC	53.0	62.0	
9	-376 G	CCTTCTAA C TTCCAGACA	40.0	50.0	rs1800750
10	-376 A	CCTTCTAA T TTCCAGACA	38.0	50.0	
11	-857 C	GGCCCTGTCTTC G TTAAG	47.0	58.0	rs1799724
12	-857 T	TGGCCCTGTCTTC A TTAA	43.0	58.0	
13	-863 C	ATGGGGACCCCC C CTTAA	43.0	50.0	rs1800630
14	-863 A	ATGGGGACCCCC A CTTAA	47.0	58.0	
15	-1031 T	TTTTCTTC A TCTTCTCA	38.0	55.0	rs1799964
16	-1031 C	TTTTCTTC G TCTTCTCAG	43.0	57.0	

TH, Temperatura de hibridación; TL, Temperatura de lavado. Se marca en negritas y cursivas la posición del SNP.

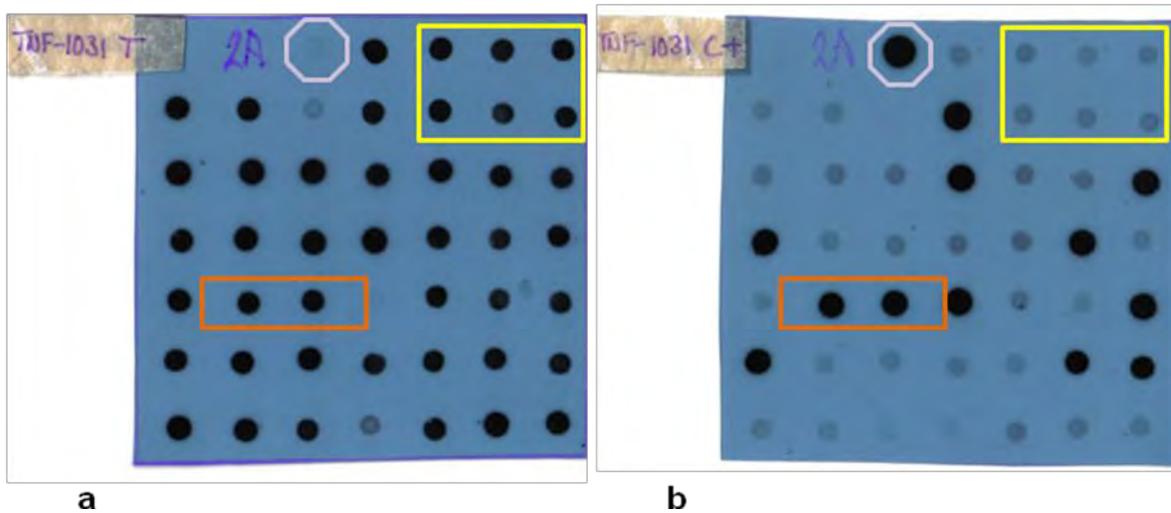


Figura 11. Membranas pertenecientes a la tipificación del SNP $TNF\alpha$ -1031. En el octógono se observa el control positivo para $TNF\alpha$ -1031C (Boleth). Para la tipificación se observaron al mismo tiempo las membranas pertenecientes al mismo SNP y así se comprobó si la muestra era homocigota a alguno de los alelos (cuadro amarillo) o si era heterocigota para ambos alelos (cuadro naranja).

5.7 Tipificación del SNP +252 de *LTA*

Las muestras de DNA genómico de mujeres control y pacientes fueron tipificadas para el polimorfismo dentro de la región intrónica del gene *LTA*, utilizando la secuencia GenBank número de acceso Z15026: +252 (A→G) (rs909253). El producto obtenido fue de 289 pb, el cual se amplificó con el iniciador sentido 5'-AGACGTTTCAGGTGGTGTCAT-3' y el antisentido 5'-TCTGACTCTCCATCTGTCAG-3' (Yamaguchi *et al.*, 2001). La reacción de PCR se llevó a cabo con una mezcla de 500 ng de DNA, 1.0 pmol de cada iniciador, 0.04 UI de Taq polimerasa (Invitrogene, California, USA), 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 16mM de Tris-HCL (pH 8.4) y 50 mM de KCl. Las condiciones de PCR empleadas comenzaron con un paso de desnaturalización a 95°C por 10 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 64°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min.

Debido a que el SNP +252 de la *LTA* crea un sitio de restricción, el polimorfismo bialélico de esta posición se tipificó mediante la técnica PCR-RFLP con la enzima *Nco*I (Yamaguchi *et al.*, 2001). Se utilizó 0.5 UI de enzima de restricción y 1.0 ul de Buffer 10X por cada 0.01 ml de producto de PCR de cada muestra a tipificar. Se digirió a 37°C por seis horas y finalmente los productos digeridos fueron corridos electroforéticamente en geles de agarosa al 2.0% (Shelton Amershand, USA) y los polimorfismos se interpretaron de la siguiente manera: alelo A=289 pb y alelo G=228 pb + 61 pb. **Figura 12.**

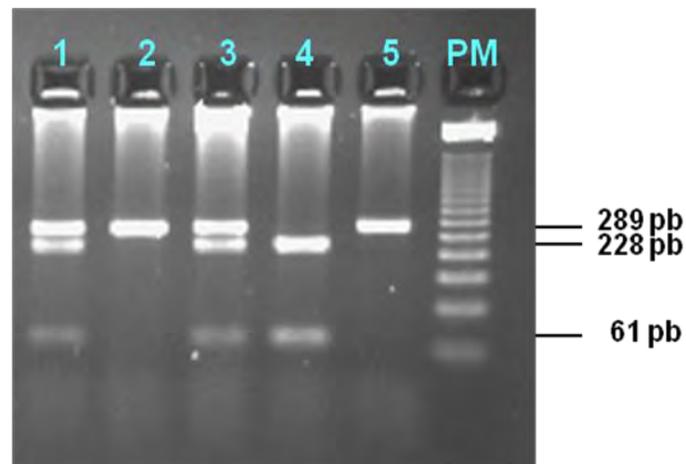


Figura 12. Electroforesis de los polimorfismos del SNP +252 de *LTA*. Los carriles 1 y 3 son muestras heterocitotas G/A (289 pb, 228 pb y 61 pb), los carriles 2 y 5 son muestras homocitotas al alelo A (289 pb) y la muestra 4 es una muestra homocitota al alelo G (228 pb y 61 pb).

5.8 Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los grupos de mujeres con LIECs de bajo y alto grado se compararon con el grupo de mujeres control. También se analizaron las combinaciones de genotipos de *MICA*, los SNPs de la región promotora de *TNF α* y la posición +252 de la *LTA*. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente mediante la prueba de X^2 y la prueba exacta de

Fisher (Matthews y Farewell 1985) con tablas de contingencia de 2x2 usando el programa estadístico EPIINFO 6.04D 2001 USA. Para determinar el valor de la (p), se consideró en los estudios estadísticos un valor significativo de $p < 0.05$. Se obtuvo la razón de momios (RM) de cada evento con un índice de confianza (IC) del 95% para estimar la asociación (Matthews y Farewell 1985). El efecto genodosis de cada SNP estudiado fue determinado con un análisis de tendencia lineal usando el genotipo homocigoto dominante de cada SNP mediante una prueba de χ^2 usando el programa estadístico Epidat 3.1 (Hervada *et al.*, 2004) con un nivel de significancia de $p < 0.05$. La proporción atribuible (PA) fue obtenida usando la siguiente fórmula: $PA = PFR \times (1 - 1/RM)$, donde PFR representa el porcentaje o factor de riesgo y RM es la razón de momios (Duarte *et al.*, 2005). La inferencia y el análisis de haplotipos se realizó con el programa HaploView 4.1 (Barrett *et al.*, 2005).

6. Resultados

Un total de 406 mujeres fueron tipificadas. En el caso del gene *MICA* se tipificaron todas las mujeres de las cuales 210 mujeres no tuvieron infección a VPH ni presentaron LIECs (grupo control), 196 pacientes fueron subdivididas en 134 con LIEC-BG y 62 con LIEC-AG. En tanto que para los SNPs de la región promotora de *TNF α* y *LTA* se lograron tipificar 396 mujeres divididas en 205 correspondientes al grupo control, 132 con LIEC-BG y 59 LIEC-AG.

Factores de riesgo relacionados con CaCu

Se aplicó un cuestionario a cada participante (control o paciente) para recabar la información correspondiente a otros factores de riesgo asociados al CaCu.

Cuando se comparó el nivel de estudios entre los grupos, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$, RM= 4.09, IC95% 2.37-7.08) en el nivel educativo, siendo más frecuente el nivel técnico en el grupo control (52.36%) en comparación con el nivel secundaria en el grupo de pacientes (37.45%). En cuanto a los métodos anticonceptivos, la Obstrucción Tubárica Bilateral (OTB) fue más usada en el grupo control que en el grupo de pacientes (12.73% vs 5.94%, respectivamente), a la vez que el Dispositivo Intrauterino (DIU) fue el método más utilizado por el grupo de pacientes a diferencia del grupo control (11.32% vs 25.95%, respectivamente ($p < 0.05$, RM=2.76, IC95% 1.57-4.90)). El resto de los factores contemplados en el cuestionario no tuvieron diferencias cuando se compararon entre el grupo control y el grupo de pacientes.

Tipificación de VPH

Se detectaron 13 tipos de VPH (6, 11, 16, 18, 31, 43, 53, 55, 56, 58, 82, 83 y 90) y 18 muestras fueron negativas a infección por VPH en el grupo de pacientes (15 en LIEC-BG y 3 en LIEC-AG) (**Tabla 5**). La infección con el tipo VPH-16 fue la más

frecuente, con 50.74% y 48.38%, seguida por VPH-58 con 12.68% y 17.74% y por el VPH-18 con 8.95% y 14.52%, en LIEC-BG y LIEC-AG respectivamente. En una sola muestra, se encontró una co-infección con dos tipos de VPH (43 y 83).

Se encontró en 18 muestras de pacientes (15 con LIEC-BG y 3 con LIEC-AG), que la amplificación del gene L1 del VPH resultó ser negativa. Estas muestras no se excluyeron del estudio y se clasificaron como muestras de pacientes con algún grado de lesión y sin infección por VPH (**VPH -**).

Tabla 5. Identificación y frecuencias de los tipos de VPH.

Tipo VPH	LIEC-BG n=134	(%)	LIEC-AG n=62	(%)
(neg)	15	11.19	3	4.84
6	3	2.23	0	0.0
11	4	2.98	0	0.0
16	68	50.74	30	48.38
18	12	8.95	9	14.52
31	4	2.98	3	4.84
43	3	2.23	1	1.61
53	0	0.0	3	4.84
55	1	0.74	0	0.0
56	1	0.74	0	0.0
58	17	12.68	11	17.74
82	1	0.74	0	0.0
83	1	0.74	0	0.0
90	1	0.74	0	0.0
Co-infección*	1	0.74	0	0.0
ND	2	1.49	2	3.22

* Se encontró una co-infección de los tipos VPH-43 y -83, ND muestra biológica no determinada para la tipificación de VPH.

Frecuencias de alelo y genotipo del gene *MICA*

Todas las muestras estudiadas se encontraron en equilibrio Hardy-Weimberg para todos los polimorfismos analizados, no hubo diferencias estadísticamente significativas, cuando las frecuencias de genotipo esperadas y observadas fueron comparadas.

Con respecto a la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del gene *MICA* en controles y pacientes se hicieron dos análisis, esto es porque además del polimorfismo en la región microsatelital (exón 5), para conocer el alelo se requiere estudiar también los exones 2, 3 y 4 del gene (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2002). El primero de los análisis fue tomando en cuenta la región microsatélital (exón 5) (**Tablas 6a y 6b**) y el segundo análisis fue elaborado con los exones juntos (exones 2-3 y 4-5) (**Tablas 6c y 6d**).

En el primer análisis, al comparar las frecuencias de la región microsatelital entre el grupo control y los subgrupos de pacientes con LIEC-BG y LIEC-AG, se observó que el microsatélite A9 fue el más frecuente en todos los grupos (36.43% en el grupo control, 46.64% en mujeres con LIEC-BG y 41.93% con LIEC-AG), mientras que el microsatélite A4 fue el menos frecuente (3.33 en controles, 2.98% en LIEC-BG y 4.83% LIEC-AG). Se encontró que el microsatélite A9 produce una asociación de susceptibilidad al desarrollo de LIEC-BG ($p < 0.05$, RM= 1.53, IC95% 1.10-2.11), cuando se calculó la PA, se encontró que un 16.15% de las pacientes con LIEC-BG, pueden estar predispuestas al desarrollo de lesiones cervicales por este microsatélite (**Tabla 6a**).

Tabla 6a. Frecuencias de los microsatélites del gene *MICA* (exón 5) en el grupo control y el grupo de pacientes con LIEC-BG y -AG.

Microsatélite	Control	LIEC-BG	RM ¹ (95%IC)	LIEC-AG	RM ² (95%IC)
	n=420(%)	n=268(%)		n=124(%)	
A4	14 (3.33)	8 (2.98)	NS	6 (4.83)	NS
A5	118 (28.09)	59 (22.01)	NS	42 (33.87)	NS
A5.1	53 (12.62)	25 (9.32)	NS	8 (6.45)	NS
A6	82 (19.52)	51 (19.02)	NS	16 (12.90)	NS
A9	153 (36.43)	125 (46.64)	1.53 (1.10-2.11)	52 (41.93)	NS

LIEC-BG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado; LIEC-AG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado; RM¹, Razón de momios calculada al comparar LIEC-BG vs Control; RM², Razón de momios calculada al comparar LIEC-AG vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p fue mayor a 0.05; todos los datos estadísticamente significativos están mostrados (p<0.05).

Al comparar las frecuencias genotípicas de la región microsatélital de los grupos, se observó que el genotipo A9/A9 es el más frecuente en todos los grupos (control 20.95%, LIEC-BG 26.86% y LIEC-AG 20.96%). Interesantemente, el genotipo A4/A5 no estuvo presente en el grupo control; así mismo, el genotipo A4/A4 no se encontró en ningún tipo de LIECs y los genotipos A4/A5.1 y A5/A5.1 se encontraron sólo en el grupo de mujeres con LIEC-BG. Al hacer los análisis estadísticos de los microsatélites, encontramos que no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa (**Tabla 6b**).

Tabla 6b. Frecuencias de los genotipos de los microsatélites del gene *MICA* (exón 5) en el grupo de pacientes con LIEC-BG y –AG y el grupo control.

Genotipos	Control	LIEC-BG		LIEC-AG	
Microsatélite	n=210 (%)	n=134 (%)	RM¹ (95%IC)	n=62 (%)	RM² (95%IC)
A4/A4	1 (0.48)	0 (0.0)	NS	0 (0.0)	NS
A4/A5	0 (0.0)	2 (1.49)	NS	2 (3.22)	NS
A4/A5.1	1 (0.48)	1 (0.74)	NS	0 (0.0)	NS
A4/A6	3 (1.43)	1 (0.74)	NS	2 (3.22)	NS
A4/A9	8 (3.81)	4 (2.98)	NS	2 (3.22)	NS
A5/A5	30 (14.28)	10 (7.46)	NS	12 (19.35)	NS
A5/A5.1	12 (5.71)	6 (4.47)	NS	0 (0.0)	NS
A5/A6	17 (8.09)	7 (5.22)	NS	2 (3.22)	NS
A5/A9	29 (13.80)	24 (17.91)	NS	14 (22.58)	NS
A5.1/A5.1	11 (5.24)	4 (2.98)	NS	1 (1.61)	NS
A5.1/A6	7 (3.33)	3 (2.24)	NS	1 (1.61)	NS
A5.1/A9	11 (5.24)	7 (5.22)	NS	5 (8.06)	NS
A6/A6	19 (9.05)	11 (8.20)	NS	3 (4.83)	NS
A6/A9	17 (8.09)	18 (13.43)	NS	5 (8.06)	NS
A9/A9	44 (20.95)	36 (26.86)	NS	13 (20.96)	NS

LIEC-BG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado; LIEC-AG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado; RM¹, Razón de momios calculada al comparar LIEC-BG vs Control; RM², Razón de momios calculada al comparar LIEC-AG vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p no fue significativo.

En el segundo análisis se observaron ocho alelos en todos los grupos estudiados, de los cuales el alelo MICA*002:01 fue el más frecuente (28.57% para el grupo

control, 35.45% para pacientes con LIEC-BG y 34.67% para pacientes con LIEC-AG). Por otra parte, el alelo MICA*018 sólo se observó en el grupo control con 1.19%, mientras que el alelo MICA*007:01 sólo se encontró en el grupo de pacientes con LIEC-AG, con una frecuencia del 0.80%. No se encontró asociación estadísticamente significativa con ningún alelo y el desarrollo de LIECs (**Tabla 6c**).

Tabla 6c. Frecuencias alelicas del gene *MICA* (exones 2-3 y 4-5) en el grupo control y el grupo de pacientes con LIEC-BG y -AG.

Alelos	Controles	LIEC-BG	RM ¹ (95% IC)	LIEC-AG	RM ² (95% IC)
MICA	n=420 (%)	n=268 (%)		n=124 (%)	
*001	9 (2.14)	8 (2.98)	NS	5 (4.03)	NS
*002:01	120 (28.57)	95 (35.45)	NS	43 (34.67)	NS
*004	82 (19.52)	51 (19.03)	NS	16 (12.90)	NS
*007:01	0 (0.0)	0 (0.0)	---	1 (0.80)	---
*008:01	53 (12.61)	26 (9.70)	NS	8 (6.45)	NS
*010	118 (28.09)	59 (22.01)	NS	42 (33.87)	NS
*017	33 (7.85)	29 (10.82)	NS	9 (7.25)	NS
*018	5 (1.19)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---

LIEC-BG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado; LIEC-AG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado; RM¹, Razón de momios calculada al comparar LIEC-BG vs Control; RM², Razón de momios calculada al comparar LIEC-AG vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p no fue significativo.

En cuanto a las frecuencias genotípicas de *MICA* analizando todos los exones, se observaron 19 genotipos en el grupo control y 17 genotipos en ambos subgrupos de pacientes (LIEC-BG y LIEC-AG) (**Tabla 6d**). Los genotipos *004/*007:01 y *017/*017 no se encontraron en el grupo control. En el grupo de pacientes con

LIEC-BG no se hallaron los genotipos *004/*007:01 *001/*018, *002:01/*018, *004/*017 y *008:01/*017, mientras que en el grupo de pacientes con LIEC-AG no se observaron los genotipos *017/*017, *001/*008:01, *001/*018, *002:01/*018 y *008:01/*010. El genotipo más frecuente en todos los grupos fue *002:01/*002:01 con 18.09% en grupo control y 20.89% en mujeres con LIEC-BG. Mientras que para el grupo de pacientes con LIEC-AG, los genotipos *002:01/*002:01 y *010/*010 presentaron la misma frecuencia (19.35%). Por otro lado, los genotipos con frecuencia menor a 1.0% en el grupo control fueron; *001/*008:01, *001/*018 y *008:01/*017, en tanto para el grupo de mujeres con LIEC-BG, fueron los genotipos *001/*004 y *001/*008:01.

Al hacer las comparaciones entre las frecuencias de los genotipos de *MICA* con el grupo control y los grupos de pacientes con LIECs de bajo y alto grado, se observó que el genotipo *002:01/*010, produce un riesgo significativo en el desarrollo de lesiones de alto grado ($p < 0.05$, $RM = 4.30$, $1.34-13.90$, $IC95\%$). Cuando calculamos el valor de PA, encontramos un 9.80%, lo que indica que más del 9.0% de las pacientes con LIEC-AG, pueden estar predispuestas al desarrollo de lesiones cervicales por la influencia de este genotipo (**Tabla 6d**).

Tabla 6d. Frecuencias de genotipo del gene *MICA* (exones 2-3 y 4-5) en el grupo de pacientes con LIEC-BG y –AG y el grupo control.

Genotipos MICA	Control n=210 (%)	LIEC-BG n=134 (%)	RM ¹ (95%IC)	LIEC-AG n= 62(%)	RM ² (95%IC)
*001/*002:01	4 (1.90)	4 (2.98)	NS	2 (3.22)	NS
*001/*004	3 (1.42)	1 (0.74)	NS	1 (1.61)	NS
*001/*008:01	1 (0.47)	1 (0.74)	NS	0 (0.0)	---
*001/*010	0 (0.0)	2 (1.49)	---	2 (3.22)	---
*001/*018	1 (0.47)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
*002:01/*002:01	38 (18.09)	28 (20.89)	NS	12 (19.35)	NS
*002:01/*004	14 (6.66)	17 (12.68)	NS	4 (6.45)	NS
*002:01/*008:01	9 (4.28)	7 (5.22)	NS	4 (6.45)	NS
*002:01/*010	7 (3.33)	5 (3.73)	NS	8 (12.90)	4.30 (1.34-13.90)
*002:01/*017	6 (2.86)	6 (4.47)	NS	1 (1.61)	NS
*002:01/*018	4 (1.90)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
*004/*004	19 (9.05)	11 (8.20)	NS	3 (4.83)	NS
*004/*007:01	0 (0.0)	0 (0.0)	---	1 (1.61)	---
*004/*008:01	7 (3.33)	4 (2.98)	NS	1 (1.61)	NS
*004/*010	17 (8.09)	7 (5.22)	NS	2 (3.22)	NS
*004/*017	3 (1.42)	0 (0.0)	---	1 (1.61)	NS
*008:01/*008:01	11 (5.24)	4 (2.98)	NS	1 (1.61)	NS
*008:01/*010	12 (5.71)	6 (4.47)	NS	0 (0.0)	---
*008:01/*017	2 (0.95)	0 (0.0)	---	1 (1.61)	NS
*010/*010	30 (14.28)	10 (7.46)	NS	12 (19.35)	NS
*010/*017	22 (10.48)	19 (14.17)	NS	6 (9.67)	NS
*017/*017	0 (0.0)	2 (1.49)	---	0 (0.0)	---

LIEC-BG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado; LIEC-AG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado; RM¹, Razón de momios calculada al comparar LIEC-BG vs Control; RM², Razón de momios calculada al comparar LIEC-AG vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p no fue significativo; + p<0.05. Se muestran sólo los datos estadísticamente significativos (p<0.05).

Relación entre los polimorfismos de *MICA* y VPH

Para analizar las frecuencias de la región microsatelital y los alelos del gene *MICA* en relación a la infección por VPH, se compararon pacientes VPH positivas contra

controles o pacientes VPH negativas. Se observó que existe una mayor frecuencia de la infección en mujeres con el microsatélite A9 ($p < 0.05$, $RM = 1.43$, $IC_{95\%}$ 1.06-1.94) (**Tabla 7a**) y el alelo MICA*002:01 ($p < 0.05$, $RM = 1.37$, $IC_{95\%}$ 1.0-1.88) (**Tabla 7b**). Al calcular el valor de PA, se obtuvieron 13.56% y 9.54%, respectivamente. Esto indica que las mujeres que portan el microsatélite A9 y el alelo MICA*002:01, pueden ser mayormente vulnerables a adquirir una infección por VPH y desarrollar una lesión intraepitelial escamosa cervical de casi 13.0% y 9.0%, correspondientemente. El resto de los polimorfismos no revelaron ninguna asociación, incluso al comparar entre pacientes VPH positivas con diferente grado de lesión (LIEC-BG y -AG).

Tabla 7a. Distribución de los microsatélites del gene *MICA* (exón 5) y VPH. Se hizo una comparación entre pacientes (LIEC-BG y -AG) positivas y negativas a VPH y mujeres sin infección por VPH (grupo control).

Microsatélite	Control	VPH (-)	OR ¹ (95% IC)	VPH (+)	OR ² (95% IC)
	n=420(%)	n=36(%)		n=348(%)	
A4	14 (3.33)	0 (0.0)	---	14 (4.02)	NS
A5	118 (28.09)	6 (16.66)	NS	90 (25.86)	NS
A5.1	53 (12.62)	4 (11.11)	NS	29 (8.33)	NS
A6	82 (19.52)	7 (19.44)	NS	58 (16.66)	NS
A9	153 (36.43)	19 (52.77)	NS	157 (45.11)	1.43 (1.06-1.94)

VPH (-) pacientes negativas a infección con VPH pero diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; VPH (+) pacientes positivas a infección con VPH y diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; RM^1 , Razón de momios calculada al comparar LIEC-BG vs Control; RM^2 , Razón de momios calculada al comparar LIEC-AG vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p no fue significativo; todos los datos mostrados son estadísticamente significativos $p < 0.05$.

Tabla 7b. Distribución de los alelos del gene *MICA* (exones 2-3 y 4-5) y VPH. Se hizo una comparación entre pacientes (LIEC-BG y –AG) positivas y negativas a VPH y mujeres sin infección por VPH (grupo control).

MICA	Control n=420 (%)	VPH (-) n=36 (%)	RM¹ (95% IC)	VPH (+) n=348 (%)	RM² (95% IC)
*001	9 (2.14)	0 (0.0)	---	13 (3.73)	NS
*002:01	120 (20.57)	14 (38.88)	NS	123 (35.34)	1.37 (1.0-1.88)
*004	82 (19.52)	7 (19.44)	NS	58 (16.66)	NS
*007:01	0 (0.0)	0 (0.0)	---	1 (0.28)	---
*008:01	53 (12.61)	4 (11.11)	NS	30 (8.62)	NS
*010	118 (28.09)	6 (16.66)	NS	90 (25.86)	NS
*017	33 (7.85)	5 (13.88)	NS	33 (9.48)	NS
*018	5 (1.19)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---

VPH (-) pacientes negativas a infección con VPH pero diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; VPH (+) pacientes positivas a infección con VPH y diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; RM¹, Razón de momios calculada al comparar LIEC-BG vs Control; RM², Razón de momios calculada al comparar LIEC-AG vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p no fue significativo; todos los datos mostrados son estadísticamente significativos p<0.05.

De igual forma se hizo el análisis de las frecuencias genotípicas de la región microsatelital y los alelos y la infección por VPH. Al comparar los valores del grupo control y el grupo de pacientes con LIEC-BG y –AG, los datos indicaron que no hubo ninguna asociación estadísticamente significativa (**Tabla 7c y 7d**).

Tabla 7c. Distribución de genotipos de los microsatélites del gene *MICA* (exón 5) y VPH. Se hizo una comparación entre pacientes (LIEC-BG y –AG) positivas y negativas a VPH y mujeres sin infección por VPH (grupo control).

Genotipo	Control	VPH (-)	OR ¹	VPH (+)	OR ²
	n=210(%)	n=18(%)	(95%IC)	n=174(%)	(95%IC)
A4/A4	1 (0.48)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
A4/A5	0 (0.0)	0 (0.0)	---	4 (2.29)	---
A4/A5.1	1 (0.48)	0 (0.0)	---	1 (0.57)	NS
A4/A6	3 (1.43)	0 (0.0)	---	3 (1.72)	NS
A4/A9	8 (3.81)	0 (0.0)	---	6 (3.44)	NS
A5/A5	30 (14.28)	0 (0.0)	---	20 (11.49)	NS
A5/A5.1	12 (5.71)	2 (11.11)	NS	4 (2.29)	NS
A5/A6	17 (8.09)	1 (5.55)	NS	7 (4.02)	NS
A5/A9	29 (13.80)	3 (16.66)	NS	35 (20.11)	NS
A5.1/A5.1	11 (5.24)	0 (0.0)	---	5 (2.87)	NS
A5.1/A6	7 (3.33)	1 (5.55)	NS	3 (1.72)	NS
A5.1/A9	11 (5.24)	1 (5.55)	NS	11 (6.32)	NS
A6/A6	19 (9.05)	1 (5.55)	NS	13 (7.47)	NS
A6/A9	17 (8.09)	3 (16.66)	NS	19 (10.91)	NS
A9/A9	44 (20.95)	6 (33.33)	NS	43 (24.71)	NS

VPH (-) pacientes negativas a infección con VPH pero diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; VPH (+) pacientes positivas a infección con VPH y diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; RM¹, Razón de momios calculada al comparar VPH (+) vs Control; RM², Razón de momios calculada al comparar VPH (-) vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p no fue significativo.

Tabla 7d. Distribución de genotipos del gene *MICA* (exones 2-3 y 4-5) y VPH. Se hizo una comparación entre pacientes (LIEC-BG y –AG) positivas y negativas a VPH y mujeres sin infección por VPH (grupo control).

Genotipo	Control n=210(%)	VPH (+) n=174 (%)	RM¹ (95%IC)	VPH (-) n=18 (%)	RM² (95%IC)
*001/*002:01	4 (1.90)	6 (3.44)	NS	0 (0.0)	---
*001/*004	3 (1.42)	2 (1.14)	NS	0 (0.0)	---
*001/*008:01	1 (0.47)	1 (0.57)	NS	0 (0.0)	---
*001/*010	0 (0.0)	4 (2.29)	---	0 (0.0)	---
*001/*018	1 (0.47)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
*002:01/*002:01	38 (18.09)	36 (20.68)	NS	4 (22.22)	NS
*002:01/*004	14 (6.66)	17 (9.77)	NS	3 (16.66)	NS
*002:01/*008:01	9 (4.28)	11 (6.32)	NS	0 (0.0)	---
*002:01/*010	7 (3.33)	12 (6.89)	NS	1 (5.55)	NS
*002:01/*017	6 (2.86)	5 (2.87)	NS	2 (11.11)	NS
*002:01/*018	4 (1.90)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
*004/*004	19 (9.05)	13 (7.47)	NS	1 (5.55)	NS
*004/*007:01	0 (0.0)	1 (0.57)	---	0 (0.0)	---
*004/*008:01	7 (3.33)	4 (2.29)	NS	1 (5.55)	NS
*004/*010	17 (8.09)	7 (4.02)	NS	1 (5.55)	NS
*004/*017	3 (1.42)	1 (0.57)	NS	0 (0.0)	---
*008:01/*008:01	11 (5.24)	5 (2.87)	NS	0 (0.0)	---
*008:01/*010	12 (5.71)	4 (2.29)	NS	2 (11.11)	NS
*008:01/*017	2 (0.95)	0 (0.0)	---	1 (5.55)	NS
*010/*010	30 (14.28)	20 (11.49)	NS	0 (0.0)	---
*010/*017	22 (10.48)	23 (13.21)	NS	2 (11.11)	NS
*017/*017	0 (0.0)	2 (1.14)	---	0 (0.0)	---

VPH (-) pacientes negativas a infección con VPH pero diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; VPH (+) pacientes positivas a infección con VPH y diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; RM¹, Razón de momios calculada al comparar VPH (+) vs Control; RM², Razón de momios calculada al comparar VPH (-) vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p no fue significativo.

Frecuencias de alelo y genotipo de los SNPs de *TNF α* y *LTA*

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de la región promotora de *TNF α* y +252 de la *LTA* en controles y pacientes están mostrados en la **Tabla 8**. Al comparar entre las frecuencias alélicas de los grupos de control y pacientes (LIEC-BG y LIEC-AG), se encontró que el SNP *TNF α* -376 presentó una asociación de susceptibilidad con el alelo A y una asociación de protección con el alelo G en las LIECs de bajo grado ($p < 0.05$, $RM = 2.81$, $IC95\% 1.09-7.44$; y $p < 0.05$, $RM = 0.36$, $IC95\% 0.13-0.92$, respectivamente).

En la comparación de las frecuencias de los genotipos de los SNPs de la región promotora de *TNF α* y la *LTA* se observó tanto en pacientes como en controles que el genotipo G/G fue el más frecuente en los SNPs -163, -238, -244, -308 y -376; el genotipo C/C lo fue en -857 y -863; mientras que el genotipo T/T y A/A fue en las posiciones -1031 y +252, respectivamente (**Tabla 8**).

Se observó un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia del genotipo G/A de *TNF α* -376 ($p < 0.05$, $RM = 2.48$, $IC95\% 0.98-6.25$) al comparar el grupo de LIEC-BG con el grupo control. El valor de PA fue de 5.45%, lo que indica que más del 5% de las pacientes con LIEC-BG pueden estar predispuestas al desarrollo de lesiones cervicales por la influencia del alelo A. No hubo diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de genotipos en las posiciones -163, -238, -244, -308, -857, -863 y -1,031 de la región promotora de *TNF α* .

Para observar la influencia de los alelos de susceptibilidad de cada SNPs en sus genotipos heterocigotos y homocigotos, se agruparon sus frecuencias y se compararon contra el otro genotipo homocigoto (**Tabla 8**). El genotipo G/G de la posición *TNF α* -376 mostró una asociación significativa de protección en las pacientes con LIEC-BG ($p < 0.05$, $RM = 0.37$, $IC95\% 0.14-0.99$).

La distribución de frecuencias de alelos y genotipos en la posición +252 de la *LTA* (**Tabla 8**) en el grupo control y las pacientes con LIEC-BG, el genotipo más común fue A/A con 44.87% y 45.45%, respectivamente, mientras que al hacer la comparación entre el grupo control y las pacientes con LIEC-AG, la frecuencia del genotipo A/G fue más frecuente con 54.23%. No hubo asociación estadísticamente significativa entre cualquiera de los alelos y genotipos de la posición +252 de la *LTA* y el riesgo de desarrollar LIECs.

Cuando se hizo la agrupación de las frecuencias del genotipo homocigoto (G/G) y heterocigoto (A/G) en la posición LTA +252, nuevamente no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las pacientes con LIEC-BG, -AG y el grupo control (**Tabla 8**).

Tabla 8. Frecuencias de alelo y genotipo de los polimorfismos de *TNF α* y *LTA*.

SNP	Control n(%)	LIEC-BG n(%)	RM ¹ (95%IC)	LIEC-AG n(%)	RM ² (95%IC)
Alelo					
Genotipo					
TNFα					
<u>-163</u>					
G	403 (98.59)	264 (100.0)	---	118 (100.0)	---
A	7 (1.70)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
GG	198 (96.58)	132 (100.0)	Referencia	59 (100.0)	Referencia
GA	7 (3.14)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
GA/AA	7 (3.14)	0(0.0)	---	0 (0.0)	---
<u>-238</u>					
G	403 (98.30)	264 (100.0)	---	118 (100.0)	---
A	7 (1.70)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
GG	199 (97.07)	132 (100.0)	Referencia	59 (100.0)	Referencia
GA	5 (2.93)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
AA	1 (0.48)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
GA/AA	6 (2.92)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
<u>-244</u>					
G	404 (98.53)	261 (98.86)	NS	118 (100.0)	---
A	6 (1.46)	3 (1.13)	NS	0 (0.0)	---
GG	199 (97.07)	129 (97.72)	Referencia	59 (100.0)	Referencia
GA	6 (2.93)	3 (2.27)	---	0 (0.0)	---
GA/AA	6 (2.92)	3 (2.27)	NS	0 (0.0)	---
<u>-308</u>					
G	387 (94.40)	250 (94.69)	NS	115 (97.45)	NS
A	23 (5.60)	14 (5.30)	NS	3 (2.54)	NS
GG	183 (89.26)	122 (92.42)	Referencia	56 (94.91)	Referencia
GA	21 (10.24)	10 (7.57)	NS	3 (5.08)	NS
AA	1 (0.48)	0 (0.0)	---	0 (0.0)	---
GA/AA	22 (10.73)	10 (7.57)	NS	3 (5.08)	NS
<u>-376</u>					
G	402 (98.04)	250 (94.69)	0.36 (0.13-0.92) ⁺	117 (99.15)	
A	8 (1.95)	14 (5.30)	2.81 (1.09-7.44)⁺	1 (0.84)	
GG	197 (96.09)	119 (90.15)	Referencia	58 (98.30)	Referencia
GA	8 (3.90)	12 (9.09)	2.48 (0.98-6.25)⁺	1 (1.69)	---
AA	0 (0.0)	1 (0.75)	---	0 (0.0)	---
GA/AA	8 (3.90)	13 (9.85)	NS	1 (1.69)	NS

Tabla 8. Continuación. Frecuencias de alelo y genotipo de los polimorfismos de *TNFA* y *LTA*.

SNP					
Alelo	Control n(%)	LIEC-BG n(%)	RM¹ (95%IC)	LIEC-AG n(%)	RM² (95%IC)
Genotipo					
<u>-857</u>					
C	304 (74.14)	186 (70.45)		83 (70.33)	
T	106 (25.85)	78 (29.54)		35 (29.66)	
CC	114 (55.60)	63 (47.72)	Referencia	30 (50.84)	Referencia
CT	76 (37.07)	59 (44.69)	NS	23 (38.98)	NS
TT	15 (7.31)	10 (7.57)	NS	6 (10.16)	NS
CT/TT	91 (44.40)	69 (52.28)	NS	29 (49.15)	NS
<u>-863</u>					
C	360 (87.80)	237 (89.77)		110 (93.22)	
A	50 (12.19)	27 (10.22)		8 (6.77)	
CC	160 (78.04)	106 (80.30)	Referencia	52 (88.13)	Referencia
AC	40 (19.51)	25 (18.93)	NS	6 (10.16)	NS
AA	5 (2.43)	1 (0.75)	NS	1 (1.69)	NS
AC/AA	45 (21.95)	26 (19.70)	NS	7 (11.87)	NS
<u>-1031</u>					
T	345 (84.14)	223 (84.46)		102 (86.44)	
C	65 (15.85)	41 (15.53)		16 (13.55)	
TT	147 (71.70)	93 (70.45)	Referencia	45 (76.27)	Referencia
CT	51 (24.87)	37 (28.03)	NS	12 (20.33)	NS
CC	7 (3.41)	2 (1.51)	NS	2 (3.38)	NS
CT/CC	58 (28.30)	29 (29.55)	NS	14 (23.73)	NS
<i>LTA</i>					
<u>+252</u>					
A	273 (66.58)	176 (66.66)		74 (62.71)	
G	137 (33.41)	88 (33.33)		44 (37.28)	
AA	92 (44.87)	60 (45.45)	Referencia	21 (35.59)	Referencia
AG	89 (43.41)	56 (42.42)	NS	32 (54.23)	NS
GG	24 (11.70)	16 (12.12)	NS	6 (10.16)	NS
AG/GG	113 (55.13)	72 (54.55)	NS	38 (64.40)	NS

LIEC-BG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado; LIEC-AG, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado; RM¹, Razón de momios calculada al comparar LIEC-BG vs Control; RM², Razón de momios calculada al comparar LIEC-AG vs Control; IC, intervalo de confianza; NS, el valor de p no fue significativo; + p<0.05.

Relación entre SNPs de *TNF α* y *LTA* y VPH

Se evaluó la asociación entre las frecuencias genotípicas de los SNPs de la región promotora de *TNF α* y la posición +252 de *LTA* con la infección por VPH. Los resultados indicaron que no hay diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 9**).

Tabla 9. Distribución de genotipos de *TNF α* y LTA y VPH. Se hizo una comparación entre pacientes (LIEC-BG y –AG) positivas y negativas a VPH y mujeres sin infección por VPH (grupo control).

Genotipos	Control	HPV (+)	HPV (-)	Valor de p	RM (95%IC)
TNFα/ LTA	n=205 (%)	n=172 (%)	n=16 (%)		
TNFα-163					
GG	198 (96.58)	172 (100.0)	16 (100.0)	0.017 ^{a*} , 1.0 ^{b*}	---
GA/AA	7 (3.14)	0 (0.0)	0 (0.0)		
TNFα-238					
GG	199 (97.07)	172 (100.0)	16 (100.0)	0.033 ^{a*} , 1.0 ^{b*}	---
GA/AA	6 (2.92)	0 (0.0)	0 (0.0)		
TNFα-244					
GG	199 (97.07)	169 (98.25)	16 (100.0)	0.51 ^{a*} , 1.0 ^{b*}	1.70 (0.37-8.71) ^{a*}
GA/AA	6 (2.92)	3 (1.74)	0 (0.0)		---
TNFα-308					
GG	183 (89.27)	161 (93.60)	14 (87.50)	0.13 ^a , 0.68 ^{b*}	1.76 (0.79-4.0) ^a
GA/AA	22 (10.73)	11 (6.40)	2 (12.50)		0.84 (0.16-5.75) ^{b*}
TNFα-376					
GG	197 (96.09)	160 (93.02)	15 (93.75)	0.18 ^a , 0.49 ^{b*}	0.54 (0.20-1.46) ^a
GA/AA	8 (3.90)	12 (6.98)	1 (6.25)		0.61 (0.07-13.83) ^{b*}
TNFα-857					
CC	114 (55.60)	82 (47.67)	11 (68.75)	0.12 ^a , 0.30 ^b	0.73 (0.47-1.12) ^a
CT/TT	91 (44.40)	90 (52.32)	5 (31.25)		1.76 (0.54-6.04) ^b
TNFα-863					
CC	160 (78.05)	142 (82.56)	13 (81.25)	0.27 ^a , 1.0 ^{b*}	1.33 (0.77-2.30) ^a
CA/AA	45 (21.95)	30 (17.44)	3 (18.75)		1.22 (0.31-5.65) ^{b*}
TNFα-1031					
TT	147 (71.70)	125 (72.67)	10 (62.50)	0.83 ^a , 0.40 ^{b*}	1.05 (0.65-1.69) ^a
TC/CC	58 (28.30)	47 (27.32)	6 (37.50)		0.66 (0.21-2.15) ^{b*}
LTA+252					
AA	92 (44.87)	73 (42.44)	6 (37.50)	0.63 ^a , 0.56 ^b	0.91 (0.59-1.39) ^a
GA/AA	113 (55.13)	99 (57.56)	10 (62.50)		0.74 (0.23-2.31) ^b

VPH (-) pacientes negativas a infección con VPH y diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; VPH (+) pacientes positivas a infección con VPH y diagnosticadas con una LIEC por citología e histología; RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza; a, valor de p para la distribución de genotipos homocigotos y heterocigotos recesivos entre pacientes con VPH (+); b, valor de p para la distribución de genotipos homocigotos y heterocigotos recesivos entre pacientes con VPH (-); *, El análisis estadístico fue a través de una prueba de Fisher; NS, el valor de p no fue significativo.

Combinación de genotipos de los SNPs de *TNF α* y *LTA*

Se analizaron las frecuencias de las combinaciones de los genotipos de los SNPs estudiados de la región promotora de *TNF α* y la posición +252 de *LTA* (α -163, α -238, α -244, α -308, α -376, α -857, α -863, α -1031, β +252). Se encontraron 56 combinaciones diferentes de genotipos. De las cuales, la combinación del genotipo G/G-G/G-G/G-G/G-G-G-C/T-C/C-T/T-G/A mostró una tendencia de riesgo para desarrollar LIEC-AG, aunque el resultado no fue estadísticamente significativo ($p=0.052$) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Frecuencias de genotipos más relevantes entre los SNPs de *TNF α* /*LTA* entre el grupo control y los subgrupos de pacientes (LIEC-BG y –AG).

Genotipos de <i>TNFα</i> y <i>LTA</i> (-163, -238, -244, -308, -376, -857, -863, -1031, +252)	Control n=205 (%)	LIEC-BG n=132 (%)	RM (95%IC) ^a	LIEC-AG n=59 (%)	RM (95%IC) ^b
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-C/C-T-T/G-A	22 (10.73)	13 (9.84)	---	9 (15.25)	1.50 (0.60-3.69)
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-T/C-C/T-T/A-A	22 (10.73)	21 (15.9)	1.57 (0.79-3.14)	7 (11.86)	1.12 (0.41-2.96)
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-T/C-C/T-T/G-A	22 (10.73)	18 (13.63)	1.31 (0.64-2.68)	12 (20.33)	2.12 (0.91-4.89) $p=0.052$
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-C/C-C/T-T/G-G	17 (8.29)	11 (8.33)	1.01 (0.42-2.36)	6 (10.16)	1.25 (0.42-3.60)
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/T-T/C-C/T-T/A-A	15 (7.31)	8 (6.06)	---	5 (8.47)	1.17 (0.35-3.66)
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-C/A-C/T-C/A-A	7 (3.41)	6 (4.54)	1.35 (0.39-4.58)	2 (3.38)	---
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-T/A-C/T-C/A-A	7 (3.41)	9 (6.81)	2.07 (0.68-6.35)	1 (1.69)	---
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-C/A-C/T-C/G-A	6 (2.92)	8 (6.06)	2.14 (0.66-7.14)	3 (5.08)	1.78 (0.34-8.34)
G-G/G-G/G-G/G-G/A/G-G/C-C/C-C/T-T/G-A	5 (2.43)	3 (2.27)	---	3 (5.08)	2.14 (0.39-10.71)
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-C/C-C/T-C/G-A	4 (1.95)	1 (0.75)	---	3 (5.08)	2.69 (0.46-14.78)
G-G/G-G/G-G/G-G/G-G/C-T/C-C/T-C/A-A	2 (0.97)	2 (1.51)	1.56 (0.16-15.70)	2 (3.38)	3.63 (0.36-36.98)
G-G/G-G/G-G/G-G/A/C-C/C-C/T-T/G-A	1 (0.48)	1 (0.75)	1.56 (0.0-57.45)	1 (1.69)	3.52 (0.0-130.89)

^a Comparación entre pacientes con LIEC-BG y controles; ^b Comparación entre pacientes con LIEC-AG y controles; RM^a, Razón de momios calculada al comparar LIEC-BG vs Control; RM^b, Razón de momios calculada al comparar LIEC-AG vs Control; IC, intervalo de confianza; ningún valor mostrado fue estadísticamente significativo.

Haplotipos de los SNPs de *TNFα/LTA*

Se analizaron ocho SNPs a través de los loci *TNFα-LTA* (-238, -244, -308, -376, -857, -863, -1031 y +252). En la **Figura 13 A** y **13 B** se muestra el desequilibrio de enlace (LD Plot) de los SNPs en los genes de *TNFα-LTA* de pacientes con LIEC-BG y LIEC-AG, respectivamente.

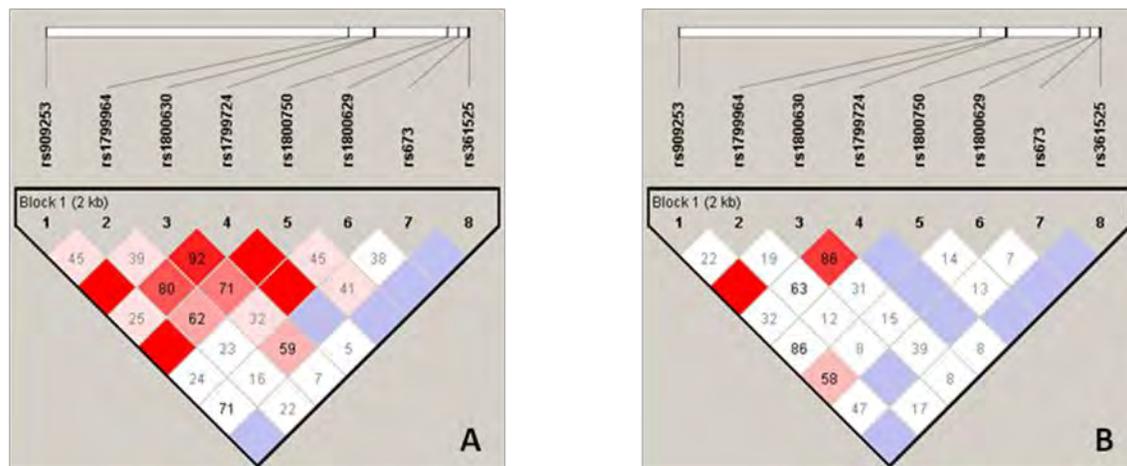


Figura 13. Esquemas (*LD Plot*) del desequilibrio de ligamiento del programa Haploview 4.1 entre los SNPs de la región promotora de *TNFα* y la posición +252 de la *LTA* y las pacientes con LIEC-BG (**13A**) y LIEC-AG (**13B**).

La **Tabla 11**, muestra los análisis de asociación de los ocho SNPs a través de los loci *TNFα-LTA* tipificados en mujeres sanas (controles) y pacientes con LIEC-BG y -AG. Se identificaron 10 haplotipos para el grupo control, 8 haplotipos para pacientes con LIEC-BG y 7 haplotipos para pacientes con LIEC-AG y fue el haplotipo ATCCGGGG el más frecuente en todos los grupos: control (30.8%), pacientes con LIEC-BG (45.6%), y pacientes con LIEC-AG (34.0%).

Cuando se compararon las frecuencias del genotipo GTCTGGGG entre los subgrupos de pacientes y el grupo control, en LIEC-BG se observó un aumento significativo del riesgo en más de 8 veces ($p < 0.05$, RM=8.33, IC95% 5.12-13.61), en tanto que para pacientes con LIEC-AG el aumento fué de más de 3 veces ($p < 0.05$, RM=3.85, IC95% 2.05-7.23).

Por otro lado, los haplotipos ATCCGGGG y ACACGGGG confirieron un riesgo para el desarrollo de LIEC-BG 4 veces mayor ($p < 0.05$, RM=4.36, IC95% 3.09-6.15) y casi 3 veces ($p < 0.05$, RM=2.68, IC95% 1.09-6.75), respectivamente. Mientras que el haplotipo ATCTGGGG presentó un efecto protector significativo al comparar las frecuencias del grupo de LIEC-BG con el grupo control ($p < 0.05$, RM=0.39, IC95% 0.21-0.70). Así mismo, el haplotipo ATACGGGG mostró un efecto de protección en pacientes con LIEC-BG ($p < 0.05$, RM=0.19, IC95% 0.06-0.59) y de riesgo en el grupo de pacientes con LIEC-AG de más de 2 veces ($p < 0.05$, RM=2.43, IC95% 1.26-4.69).

Tabla 11. Haplotipos comunes de los loci *TNF α /LTA* y análisis de asociación entre los grupos de pacientes con LIEC-BG y LIEC-AG y el grupo control.

Haplotipos	Control (%)	LIEC-BG (%)	X ²	p	RM (95% CI) ^a	LIEC-AG (%)	X ²	p	RM (95% CI) ^b
ATCCGGGG	30.8	45.6	15.97	6.43E-05	4.36 (3.09-6.15)	34.0	2.93	0.0867	---
GTCCGGGG	15.3	7.9	8.74	0.0031	---	13.5	2.33	0.1263	---
ATCTGGGG	15.1	4.5	20.27	6.70E-06	0.39 (0.21-0.70)	8.5	1.02	0.3122	---
ATACGGGG	7.3	1.0	13.50	2.00E-04	0.19 (0.06-0.59)	16.2	30.10	4.09E-08	2.43 (1.26-4.69)
GTCTGGGG	6.7	25.4	50.99	9.26E-13	8.33 (5.12-13.61)	21.1	0.19	0.6626	3.85 (2.05-7.23)
ACCCGGGG	5.6	6.4	0.22	0.6363	---	1.7	5.37	0.0204	---
GCCCGGGG	4.4	0.0	12.55	4.00E-04	---	0.0	4.77	0.0289	---
GTCCGAGG	3.9	0.0	10.83	0.001	---	1.7	0.05	0.8133	---
ACACGGGG	2.2	3.9	1.61	0.2041	2.68 (1.09-6.75)	0.0	5.80	0.016	---
ACCTGGGG	2.0	0.0	5.34	0.0208	---	0.0	2.16	0.1415	---
ACACAAGG [†]	0.0	2.7	10.98	9.00E-04	---	0.0	---	---	---

^a Frecuencia de haplotipos; [†] Haplotipo sóamente encontrado en pacientes con LIEC-BG; ^a Comparaciones entre pacientes con LIEC-BG y controles; ^b Comparaciones entre pacientes con LIEC-AG y controles; RM Razón de Momios; todos los datos estadísticamente significativos están mostrados ($p < 0.05$).

7. Discusión de Resultados

Factores de riesgo relacionados con CaCu

Existe una diversidad de estudios epidemiológicos reportados en CaCu en el mundo, donde ha quedado demostrado que además de la infección por VPH, la multiparidad, el número de parejas sexuales, la edad de inicio de relaciones sexuales, la edad de la menarca, el uso de anticonceptivos, la deficiencia en la alimentación, el nivel de escolaridad, otras enfermedades de transmisión sexual y el consumo de tabaco, entre otros, son factores de riesgo en el desarrollo de lesiones neoplásicas cervicales o cáncer *in situ* (Rohan y Shah 2004).

En este estudio, al estudiar los factores epidemiológicos de riesgo para el desarrollo del CaCu; el tener un bajo nivel de estudios concuerda con los valores reportados en el trabajo de la Dra. Palacio-Mejía y colaboradores (2003), quienes encontraron un riesgo 10.9 veces mayor desarrollar CaCu cuando las mujeres tienen escasos estudios. Por otro lado, se observó que el DIU fue el método anticonceptivo usado en mayor porcentaje entre las pacientes. De acuerdo a un reporte elaborado por la Organización Mundial de la Salud, se comprobó que el DIU además de generar un riesgo para desarrollar la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), y complicaciones en la infecundidad y el embarazo ectópico; también incrementa el riesgo de contraer infecciones de transmisión sexual como la infección por VPH (Steen y Shapiro 2004).

Todas las muestras cervicales de las pacientes que se recolectaron fueron reportadas con una posible infección por VPH en su prueba citológica (Pap) y en el estudio colposcópico (Lanham *et al.*, 2001). A pesar de este antecedente, se encontraron 18 muestras (9.52%) negativas a la infección por VPH (**VPH -**), la mayoría de éstas correspondieron al grupo de pacientes con LIEC-BG (que comprenden mujeres sólo con infección por VPH y pacientes con NIC I). Es muy probable que el primer diagnóstico haya sido erróneo y que no tuvieran la

infección por VPH, debido a que tanto el estudio de Pap, así como, la colposcopia son técnicas subjetivas y presentan cierto porcentaje de error (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001, García *et al.*, 2003).

La frecuencia del VPH-16 en nuestro estudio fué similar a la frecuencia que encontró Kay y colaboradores (2003) en mujeres con LIEC-AG (reportadas como NIC grado 2 y 3) en Sudáfrica (50.0% y 56.6% respectivamente), lo que confirma que la infección por VPH-16, sigue siendo uno de los principales factores para desarrollar lesiones intraepiteliales escamosas y cáncer cervical. Interesantemente el VPH-58, fue el segundo tipo más frecuente en las muestras estudiadas (14.28%); esto mismo fue observado en otras poblaciones como África (12.8%) (Xi *et al.*, 2003), Colombia (11.2%) (Muñoz *et al.*, 2004), y Jamaica (18.8%) (Watt *et al.*, 2009). González-Losa y colaboradores (2004) encontraron que entre mujeres diagnosticadas con LIEC-BG y -AG del estado de Yucatán (sureste de México), el VPH-58 fue el más frecuente (23.3% y 30.6% respectivamente), mientras que en mujeres que fueron tratadas en las clínicas de displasias del IMSS en el estado de Nayarit (oeste de México) su frecuencia fue del 12.12% (Aguirre-Hernández *et al.*, 2007), lo que muestra que aún cuando se tiene una distribución diferente de los tipos de VPH en diferentes países e incluso en el mismo país, el VPH-58 es uno de los tipos más frecuentes en provocar infecciones cérvico-vaginales, lesiones precursoras a cáncer cervical y cáncer cervical. Por otro lado, los resultados del presente trabajo dan evidencia adicional de la distribución de los tipos de VPH más frecuentes en una zona de la Ciudad de México y esta información podría utilizarse para la formulación de vacunas apropiadas para combatir la infección por VPH específicos encontrados en mujeres mexicanas.

Polimorfismos del gene *MICA*

No hubo ninguna asociación estadísticamente significativa cuando se compararon las frecuencias alélicas de *MICA* (tomando en conjunto los exones 2-5), entre los grupos de pacientes con LIEC-BG, -AG y el grupo control. Sin embargo, se

observó que el alelo *MICA**002:01 presentó una tendencia de riesgo con el desarrollo de LIECs de bajo grado ($p=0.057$, $RM=1.37$, $IC95\%$ 0.93-1.93), mientras que el alelo *MICA**008:01 mostró una tendencia de protección contra el desarrollo de LIECs de alto grado cuando se comparó con el grupo control ($p=0.055$, $RM=0.48$, $IC95\%$ 0.20-1.08). Esto puede ser un indicio de que probablemente el número de muestras que se tipificaron fue insuficiente. Seguramente, si se incrementan el número de muestras, se aumentaría el poder estadístico y las tendencias pueden volverse estadísticamente significativas.

Al comparar los resultados obtenidos de los exones 2-5, con los reportados por Jumnainsong y colaboradores (2007) en mujeres con LIECs y CaCu en población Thai, observamos similitudes al no encontrar ninguna asociación estadísticamente significativa de los alelos del gene *MICA* y la susceptibilidad al desarrollo de lesiones precursoras y cáncer cervical. Por otro lado, en mujeres de los Países Bajos con carcinoma escamoso celular se encontró que el SNP 184 de *MICA* y el genotipo homocigoto 184/184, tuvieron un riesgo de $p<0.05$, $RM=1.31$, $IC95\%$ 1.03-1.67, y $p<0.05$, $RM=1.51$, $IC 95\%$ 1.02-2.24, respectivamente (Zoodsma *et al.*, 2005).

La mayoría de los reportes que han estudiado la asociación del polimorfismo del gene *MICA* con el desarrollo de las lesiones precursoras al CaCu y los diferentes tipos histológicos del cáncer cervical (escamoso, adenocarcinoma y adenoescamoso) sólo relacionan la región microsatelital. Chen y colaboradores (2005), reportan que no hay asociación de los microsatélites de *MICA* con los diferentes tipos histológicos del CaCu. Ghaderi y colaboradores (1999 y 2001) estudiaron la asociación de la región microsatelital del gene *MICA* en mujeres suizas con diagnóstico de neoplasias intraepiteliales cervicales y cáncer cervical invasor; sus resultados no mostraron ninguna asociación. Sin embargo, observaron que en las pacientes con una infección por VPH-18 la frecuencia del microsatélite A5 es mayor, pero la significancia estadística se perdió al hacer la corrección del valor de p .

A diferencia de lo reportado por Ghaderi en población suiza, en el presente trabajo se encontró una asociación del microsatélite A9 con el incremento del riesgo a desarrollar una LIEC-BG (RM=1.53). Cuando evaluamos la PA, encontramos que este riesgo se incrementó en un 16.0%. Por otro lado, los datos tuvieron una mayor fuerza de asociación, pues se encontró un riesgo de 1.37 veces mayor para favorecer una infección por VPH en aquellas mujeres que portan el alelo MICA*002:01, el cual tiene en su región microsatelital nueve repeticiones GCT (Marsh *et al.*, 2010). Nuevamente el valor de PA, indicó que el riesgo se incrementa hasta casi un 9.0% cuando las mujeres portan el alelo MICA*002:01. Los resultados hacen suponer que el alelo MICA*002:01 y su microsatélite A9, pueden ser un marcador genético de susceptibilidad para las infecciones por VPH y el desarrollo de lesiones precursoras de bajo grado en mujeres mexicanas. Hasta lo reportado actualmente, este es el primer estudio en el mundo en el que se encuentra esta asociación de susceptibilidad.

Al analizar las frecuencias genotípicas, encontramos que el genotipo de MICA 002:01/010 aumenta el riesgo del desarrollo de LIECs de alto grado. Las mujeres que portan el alelo MICA*002:01 o el microsatélite A9 presentan una RM de 1.37 y 1.53, respectivamente, en el desarrollo de LIECs de bajo grado. Pero este riesgo se incrementa hasta cuatro veces para desarrollar una lesión de alto grado cuando las mujeres mexicanas portan también el alelo MICA*010. La frecuencia del alelo MICA*010 fue mayor en pacientes con LIEC-AG (33.87%), dato muy similar a la frecuencia encontrada en población Thai en mujeres con lesiones precursoras a CaCu (Jumnainsong *et al.*, 2007).

Mediante estudios filogenéticos de los alelos del gene *MICA* se han reportado dos linajes principales, el linaje I (LI) y II (LII), que agrupan 36 y 29 alelos, correspondientemente. Las posiciones 684, 685, 697 y 713 del exón 4, que codifica el dominio $\alpha 3$, han servido para distinguir estos linajes. Los alelos de *MICA* pertenecientes al linaje LI presentan el nucleótido T, G, T y G, mientras que los alelos de *MICA* del linaje LII portan C, A, C y C en cada una de dichas

posiciones. Estos cambios de nucleótidos están implicadas en la sustitución de aminoácidos (una sinónima y tres no sinónimas) en el exón 4. Las sustituciones no sinónimas, generan proteínas con sustituciones de aminoácidos no conservadas (principalmente en las posiciones 206, 210, 213, y 251) y las cuales tienen diferencias en función y estructura en el dominio $\alpha 3$ (codificado por el exón 4). Se ha observado que todos los alelos de *MICA* pertenecientes al linaje LI tienen en la posición 213 Treonina (*Thr*) y solamente el 66.0% de los alelos de linaje LII tienen Isoleucina (*Ile*). De la misma forma, 94.0% de los alelos de linaje LI tienen Glutamina (*Gln*) en la posición 251 y 66.0% de los alelos de linaje LII tienen Arginina (*Arg*). Y se ha sugerido que las proteínas de *MICA* generadas por los alelos de linaje LI son menos susceptibles a ser cortadas por su conformación estructural que impide la afinidad de las proteasas (Choy y Phipps *et al.*, 2003).

En el presente estudio, se encontró que el alelo *MICA**002:01, el microsatélite A9 y el genotipo 002:01/010, favorecen la infección por VPH e incrementan el riesgo del desarrollo de lesiones precursoras de bajo y alto grado. Se cree que la conformación de la proteína *MICA* generada en las pacientes mexicanas que portan los polimorfismos 002:01/(A9) pueden tener afinidad con las proteasas para favorecer el corte de esta proteína de la membrana de la célula cervical infectada por VPH, porque de acuerdo al árbol filogenético que proponen Choy y Phipps (2010), existe una cercanía del alelo *MICA**002:01 y su microsatélite (A9) a los alelos que conforman el linaje LII, los cuales presentan una susceptibilidad a la acción de las proteasas dependientes de su afinidad por el cambio estructural de las sustituciones no conservadas en el dominio $\alpha 3$. Se ha reportado que en la superficie de células tumorales, este dominio forma un complejo con la proteína 5 del retículo endoplásmico (ERp5) para inducir un cambio conformacional que permite el corte proteolítico de *MICA* por las proteasas ADAM (Kaiser *et al.*, 2007). Lo anterior debe ser confirmado mediante estudios que busquen la molécula de *MICA* soluble en estas pacientes.

Por otro lado, hay un estudio con pacientes mexicanas diagnosticadas con lesiones precursoras a CaCu y cáncer cervical, donde reportaron un incremento en el suero de MICA soluble y la baja expresión del receptor NKG2D en linfocitos T (Arreygue-García *et al.*, 2008), favoreciendo la interacción entre MICA soluble y NKG2D que a su vez induce la internalización y degradación del receptor y estimula la expansión de células T CD4⁺NKG2D⁺ inmunosupresoras permitiendo la evasión de la respuesta inmune por parte de las células tumorales (Groh *et al.*, 2002). En abril de este año se confirmó que las líneas celulares de cáncer cervical CaLo e InBl, pueden secretar las proteínas de MICA y MICB y además también expresan el receptor NKG2D que anterior a este trabajo, se consideraba exclusivo de células leucocitarias. Los autores sugieren que las células tumorales utilizan los mecanismos de estrés como posibles factores de crecimiento endógenos que además de ayudarlas a proliferar sirven como un mecanismo de evasión inmune (Weiss-Steider *et al.*, 2011).

Polimorfismos de los SNPs de *TNF α* y *LTA*

La mayoría de los estudios de asociación genética de *TNF* con enfermedades en diferentes poblaciones han sido realizados con dos SNPs de la región promotora de *TNF α* y *LTA* (Genç *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2010, Partida-Rodriguez *et al.*, 2010). Sin embargo, en el presente trabajo se pretendió analizar la mayoría de los SNPs localizados en la región promotora de *TNF α* (-163, -238, -244, -308, -376, -857, -863 y -1031) y la posición +252 del primer intron de *LTA* con la finalidad de adquirir una perspectiva más completa de las asociaciones de los SNPs de *TNF α* y *LTA* con el desarrollo de lesiones precursoras a cáncer cervical en mujeres mexicanas.

Algunos estudios han indicado que los polimorfismos de los SNPs de la región promotora de *TNF α* pueden ser un factor de contribución para el desarrollo del cáncer cervical (Calhoun *et al.*, 2002, Desphande *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2009).

Sin embargo, los SNPs de TNF α -163, -238, -244, -308, -857, -863 y -1031 en el presente estudio no tuvieron asociación con las LIECs.

Cuando comparamos la distribución de las frecuencias de genotipos de los SNPs TNF α -163 y -244 contra dos estudios diferentes, uno de ellos con mujeres hispanas con cáncer invasor cervical y VPH-16 positivas de los Registros de Tumores en Nuevo México (Desphande *et al.*, 2005) y el otro con pacientes con cáncer cervical tratadas en la Clínica Mayo (población USA) (Calhoun *et al.*, 2002), se observó que hubo diferencias mínimas (TNF α -163, 99.1%-G/G, 0.9%-G/A y 0.0%-A/A y TNF α -244, 97.3% y 99.1%-G/G, 1.8% y 0.9%-G/A y 0.9% y 0.0%-A/A, respectivamente). Se puede deducir que por la proximidad geográfica entre Nuevo México y México las frecuencias observadas en las tres poblaciones comparadas son muy semejantes. Por otro lado, en este estudio se encontró una frecuencia del 2.93% del genotipo G/A en TNF α -244, a diferencia de otros estudios como en pacientes con sarcoidosis de Hokaido, Japón (Yamaguchi *et al.*, 2001) y en pacientes Iranies con tuberculosis (Merza *et al.*, 2009), donde encuentran sólo el genotipo G/G. Una posible explicación puede ser el hecho de que el SNP TNF α -244, ha sido reportado como el primer SNP de TNF α ligado a un haplotipo extendido de HLA de origen Africano, lo cual puede indicar que esta altamente conservado aún después de la serie de migraciones humanas que han ocurrido (Baena *et al.*, 2002).

Los SNPs TNF α -238 y -308 han sido unos de los más estudiados en pacientes que tienen lesiones precursoras a cáncer cervical y cáncer cervical invasivo. El genotipo G/G de ambos SNPs es el más frecuente en diferentes poblaciones, tales como Reino Unido (89.0% y 52.0%) (Kirkpatrick *et al.*, 2004), Nueva Dehli (96.0% y 91.0%) (Kohaar *et al.*, 2007) y Suiza (95.3% y 83.3%) (Ivansson *et al.*, 2008). Con otras enfermedades, las frecuencias del genotipo G/G en estos SNPs también son las más frecuentes como lo demuestra un reporte en población mexicana con pacientes con lupus eritomatoso sistémico (92.7% y 94.5%) (Zuñiga *et al.*, 2001), y en mujeres del Reino Unido con cáncer de mama (87.7% y 62.9%) (Azmy *et al.*,

2004). Por último, un estudio con pacientes con absorción espontánea recurrente en población China (88.8% y 90.8%) (Liu *et al.*, 2010). En el presente estudio, las frecuencias del genotipo G/G en ambos SNPs fueron los más frecuentes y no se encontró una asociación estadística significativa de ninguno de los dos, con el desarrollo de lesiones precursoras al cáncer cervical. De hecho, en todas las pacientes (LIEC-BG y LIEC-AG) se presentó el genotipo homocigoto G/G (genotipo dominante) del SNP TNF α -238. En otras poblaciones se ha observado que el genotipo G/G es más frecuente, mientras que los genotipos que acarrean el alelo recesivo (G/A y A/A) presentan frecuencias bajas de 1.0% a 14.0%, dependiendo la población de estudio (Calhoun *et al.*, 2002, Kirkpatrick *et al.*, 2004, Desphande *et al.*, 2005, Kohaar *et al.*, 2007, Ivansson *et al.*, 2008). El genotipo G/A del SNP TNF α -238 ha sido asociado con un efecto protector contra el desarrollo de cáncer cervical en pacientes de USA (RM=0.33, IC95% 0.11-0.96) (Calhoun *et al.*, 2002), mientras que para pacientes de Corea del Norte, el alelo TNF α -238 A está asociado con una disminución en el riesgo a desarrollar diferentes tipos de cáncer (cervical, gástrico y carcinoma renal) (RM=0.25, IC95% 0.10-0.64) (Jang *et al.*, 2001). Al considerar los genotipos que acarrean el alelo A recesivo de la posición TNF α -308 (G/A y A/A), se encontró que las frecuencias de los genotipos fueron menores entre los pacientes con LIEC-BG y LIEC-AG en comparación con las frecuencias del grupo control; esta misma disminución en las frecuencias de estos genotipos en TNF α -308, fue observado en pacientes del Reino Unido con lesiones precursoras cervicales, donde este SNP, genera una susceptibilidad para desarrollar displasias de bajo y alto grado ($p < 0.05$) (Kirkpatrick *et al.*, 2004). Otros estudios demuestran que existe un riesgo de hasta 2 a 3 veces para desarrollar cáncer cervical cuando las pacientes tienen el alelo A y presentan los genotipos G/A o A/A (Duarte *et al.*, 2005, Kohaar *et al.*, 2007, Singh *et al.*, 2009). Las diferencias encontradas en las frecuencias de alelo y genotipo en estos SNPs en los resultados del presente trabajo y lo publicado anteriormente probablemente se expliquen por el poder estadístico del número de muestras estudiadas o por las diferencias que hay étnicamente entre las poblaciones.

Con respecto a la posición TNF α -376, se observó que 9.09% de las pacientes con LIEC-BG tenían un genotipo G/A, en comparación con un 3.90% en el grupo control. Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa (**Tabla 8**). Este SNP no ha sido muy estudiado en otros padecimientos. Calhoun y colaboradores (2002) estudiaron cuatro SNPs de TNF α en pacientes con cáncer cervical; uno de ellos fue el SNP TNF α -376, el cual resultó ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical. En dos poblaciones genéticamente distintas de África (Gambia y Kenia) se reportó una asociación de susceptibilidad con TNF α -376 que incrementa 4 veces el riesgo a malaria cerebral (Kaushansky *et al.*, 1994).

Hasta el momento, no se conoce con certeza el efecto biológico del SNP TNF α -376, sin embargo, este SNP está localizado en la región promotora del gene TNF α (Zhao *et al.*, 2007). Knight y colaboradores (1999) sugirieron que en este SNP ocurren múltiples interacciones de DNA-proteínas, y que el alelo menos común (TNF α -376 A) actúa para reclutar el factor de transcripción Oct-1 en esta área. Oct-1, es un factor de transcripción cuyas interacciones con otras proteínas controlan diversos efectos en la regulación de genes, en la mayoría de los casos actuando como un potenciador, pero en algunos otros contextos actuando como un represor en la transcripción (Kaushansky *et al.*, 1994, Wu *et al.*, 1997, Holmes *et al.*, 2003). Probablemente, el genotipo G/A de la posición TNF α -376 este confiriendo una susceptibilidad a desarrollar lesiones precursoras de bajo grado por una modificación de la transcripción producida por el alelo A. Esta idea es apoyada también por el valor obtenido de PA, el cual indica que cerca de 6.0% de las pacientes con LIEC-BG pueden estar desarrollando esta lesión por la influencia del alelo A. Más aún, cuando se agruparon los genotipos del alelo A (G/A y A/A), los resultados muestran que el genotipo G/G, confiere una protección para el desarrollo de LIEC-BG (**Tabla 8**).

En la posición TNF α -857 se observó una tendencia de protección con los genotipos que acarrean el alelo T (C/T y T/T). En ambas posiciones no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, posiblemente por el número

de muestras analizadas en el grupo de pacientes. Deshpande y colaboradores (2004) lo describieron en mujeres hispanas con cáncer cervical invasor y encontraron un efecto protector. Mientras que Ivansson y colaboradores (2008) reportaron que la posición -857 de *TNF α* y otros SNPs no tenía asociación con el cáncer cervical, a pesar de que fue un estudio con suficiente poder estadístico para detectar estas asociaciones.

Diferentes estudios han reportado la relación entre la expresión de la citocina *TNF α* y los SNPs -857 (C/T) y -863 (C/A) de la región promotora del gene *TNF α* , sugiriendo que los alelos -857 C y -863 A pueden producir los mayores niveles de *TNF α* , mientras que los otros alelos -857 T y -863 C producen menores niveles de esta citocina (Hohaus *et al.*, 2007, Yamashina *et al.*, 2007). El alelo T de *TNF α* -857, contiene un sitio de anclaje para el factor de transcripción Oct-1 (ATGAAGAC) desde la posición -858 hasta la posición -851. El factor de transcripción Oct-1, ancla la secuencia sólo cuando está presente el alelo T no así cuando está el alelo C, alterando así la actividad transcripcional del gene *TNF α* (Hohjoh y Tokunaga 2001, Kuo *et al.*, 2005). En el presente estudio se observó que las frecuencias del genotipo C/T y T/T en la posición *TNF α* -857 en pacientes con LIEC-BG y LIEC-AG, estuvieron incrementadas y hacen suponer que las células transformadas por la influencia de la infección con VPH están escapando del control del sistema inmune del hospedero en etapas tempranas de la carcinogénesis, debido a la disminución en la citotoxicidad por la citocina *TNF α* . Por otro lado, algunos reportes sugieren que el cambio que ocurre de una C por una A en la posición -863 de la región promotora de *TNF α* resulta en un incremento en la producción de *TNF α* , debido a la mayor afinidad del factor de transcripción NF- κ B por el alelo A. El factor de transcripción NF- κ B es producido en dos formas, una es un heterodímero p65-p50 y la otra forma es un homodímero p50-p50. Este último ejerce una competencia de inhibición cuando se ancla al alelo C de la posición *TNF α* -863 (Udalova *et al.*, 2000). El factor de transcripción NF- κ B con su sitio de anclaje a DNA, participa como un represor transcripcional en la región promotora del gene *TNF α* (Kang *et al.*, 2005, Kuo *et al.*, 2005). En el

presente trabajo se observó que las frecuencias de los genotipos C/A y A/A de la posición TNF α -863 en pacientes con LIEC-BG y LIEC-AG fueron bajas, siendo predominante el genotipo C/C. Esto sugiere que TNF α está siendo reprimido y es incapaz de producir suficiente TNF α para destruir células infectadas por VPH, lo que concuerda con la observación de que las mujeres con el genotipo C/C fueron más propensas a la infección por VPH, aunque no de forma estadísticamente significativa **Tabla 9**.

El polimorfismo en la posición TNF α -1031 ha sido asociado con un incremento en la actividad transcripcional y producción de la citocina TNF α en diversos estudios (Niizeki *et al.*, 2000, Asghar *et al.*, 2004). En nuestros resultados, no observamos diferencias significativas en las frecuencias de alelo y genotipo en este SNP entre controles y pacientes con LIEC-BG y -AG, a pesar de ello, es el primer reporte que da a conocer las frecuencias de alelo y genotipo de la posición TNF α -1031 para esta población. Los datos son similares a los resultados de Negoro y colaboradores (1999), quienes estudiaron este SNP en una población japonesa con enfermedad de Chron. El SNP TNF α -1031, ha sido asociado con otras enfermedades como endometriosis en estado avanzado (Lee *et al.*, 2008) y hemorragia intracerebral espontánea profunda (Chen *et al.*, 2010). Sin embargo, se puede sugerir que esta posición no está asociada con el desarrollo de lesiones precursoras a cáncer cervical. Más investigaciones son necesarias para determinar la significancia funcional de este polimorfismo con otras enfermedades y diferentes poblaciones (grupos étnicos) de estudio.

Cuando el polimorfismo de LTA+252 fue estudiado, no se encontró asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de las lesiones precursoras a cáncer cervical. Este SNP, ha sido estudiado también en pacientes con sarcoidosis, cáncer de mama, tumores de células germinales testiculares, enfermedad crónica obstructiva pulmonar, cirugía cardíaca con circulación extracorporeal y tuberculosis, en diferentes poblaciones tales como Japón, Irán, USA, España y Nueva Delhi (Yamaguchi *et al.*, 2001, Kamali-Sarvestani *et al.*,

2005, Purdue *et al.*, 2007, Tanaka *et al.*, 2007, Iribarren *et al.*, 2008, Sharma *et al.*, 2010). Recientemente, se reportó que el alelo A predispone al desarrollo de cáncer gástrico (Partida-Rodriguez *et al.*, 2010) en población mexicana, sin embargo las frecuencias reportadas son diferentes, posiblemente porque el grupo control que se analizó fueron seleccionados con el criterio de ausencia de síntomas gastroduodenales y también porque en este estudio se seleccionaron sólo mujeres, observándose un sesgo en las frecuencias.

No obstante, al comparar nuestras frecuencias de los genotipos G/G, G/A y A/A (44.87%, 43.41% y 11.70%) de la posición LTA+252 con población de USA encontramos valores muy similares (46.0%, 44.0% y 11.0%) (Purdue *et al.*, 2007) y (43.1%, 44.4% y 12.5%) (Tanaka *et al.*, 2007); lo que nos indica que la distribución de los polimorfismos en esta posición de *LTA* es muy parecida en poblaciones geográficamente cercanas. Por otro lado, en un estudio en pacientes con cáncer cervical, se estudió la posición +252(G→A) y +804(C→A) de la *LTA*. Niwa y colaboradores (2005), encontraron que existe un desequilibrio de enlace entre estas dos posiciones y fue el SNP LTA+804 el asociado principalmente con la disminución del riesgo para desarrollar cáncer cervical, especialmente con el cáncer escamoso cervical; otro estudio realizado con un mayor número de muestras en mujeres suizas y cáncer cervical, no encontró asociación con el SNP+252 de *LTA* (Ivansson *et al.*, 2007). Estos reportes hacen suponer que probablemente no sea la posición +252 la que esté asociada con el desarrollo de lesiones precursoras a cáncer cervical; y que deben considerarse otros SNPs para encontrar posibles asociaciones con el desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas, considerando además un mayor número de muestras.

Genotipos de los SNPs de *TNFA* y *LTA*

Los resultados que obtuvimos con las frecuencias de genotipos no mostraron ningún valor estadísticamente significativo que se relacionara con el desarrollo de las lesiones precursoras a cáncer cervical. Sin embargo, se observó que el

genotipo G/G-G/G-G/G-G/G-G-G-C/T-C/C-T/T-G/A presentó una frecuencia en aumento conforme avanzaba el grado de lesión. Esto sugiere que esta combinación de genotipo podría usarse como un factor de pronosis para el desarrollo de lesiones precursoras a cáncer cérvico uterino.

Haplotipos de los SNPs de *TNF α /LTA*

Se estudió la asociación de haplotipos de *TNF α /LTA* con la susceptibilidad para desarrollar lesiones precursoras al cáncer cervical. Los resultados señalan que en el desarrollo de lesiones precursoras de bajo y alto grado, el haplotipo GTCTGGGG puede servir como un marcador genético de mal pronóstico y los haplotipos ATCTGGGG y ATACGGGG como marcadores genéticos de protección. Mientras que los haplotipos ATCCGGGG y ACACGGGG pueden representar marcadores de riesgo en pacientes con LIEC-BG y el haplotipo ATACGGGG un marcador genético de riesgo en pacientes LIEC-AG. Las diferencias encontradas de susceptibilidad o protección en los haplotipos pueden ser debido a la composición de alelos de cada haplotipo, ya que hay alelos que producen menor transcripción de las citocinas TNF α y LTA, lo que posiblemente esté mermando la respuesta inmunológica de la mujer para combatir células cervicales transformadas e infectadas por VPH.

8. Conclusiones

En este trabajo se estudiaron polimorfismos en los genes *MICA*, los SNPs de la región promotora de *TNF α* y la posición +252 de la *LTA* en mujeres mexicanas infectadas con VPH y diagnosticadas con lesiones precursoras de bajo y alto grado (LIEC-BG y LIEC-AG) a CaCu. Los datos obtenidos proveen evidencia de que los polimorfismos de *MICA* y *TNF α* están implicados en el favorecimiento de la infección por VPH, y en la susceptibilidad y protección al desarrollo de lesiones precursoras del CaCu en mujeres mexicanas. Mientras que la posición +252 de *LTA* no se encontró asociación con las LIECs de bajo y alto grado. Lo anterior sugiere que *MICA* y *TNF α* podrían ser útiles biomarcadores de factores de riesgo para lesiones precursoras a CaCu. Estudios futuros enfocados en los efectos de expresión o regulación de los genes *MICA* y *TNF α* ayudarían a comprender mejor el papel que juegan en la respuesta inmunológica y en la patogénesis del CaCu.

9. Referencias

- 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. *Int J Cancer*. 122(12):2820-2826.
- Aguirre-Hernández R, Medina-Carrillo L, Montoya-Fuentes H, Sandoval-López JG, Padilla-Rosas M, García-Silva V, y Jáuregui-Martínez A (2007). Factores relacionados con el cáncer cérvicouterino en el estado de Nayarit, México. *Ginecol Obstet Mex*. 75(6):311-316.
- Akman A, Sallakci N, Coskun M, Bacanli A, Yavuzer U, Alpsoy E, y Yegin O (2006). TNF-alpha gene 1031 T/C polymorphism in turkis patients with Behçet disease. *Br J Dermatol*. 155(2):350-356.
- Albuquerque VR, Hayden MC, Palmer JL, Laing AI, Rye JP, Gibson AN, Burton RP, Goldblatt J, y Lesouëf NP (1998). Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy*. 28(5):578-584.
- Alonso-de Ruíz P, Lazcano-Ponce E, Hernández-Avila M. Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. México, D.F., Editorial Médica Panamericana, 2000, 187-201 pp.
- Angulo M y Carvajal-Rodríguez (2007). Evidence of recombination within human alpha-papillomavirus. *Virology*. 28(4):33.
- Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner O, Hakulinen T, Narvanen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, y Paavonen J (2001). Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk of development of cervical squamous carcinoma. *JAMA*. 285(1):47-51.
- Aquino-Galvez A, Pérez-Rodríguez M, Camarena A, Falfan-Valencia R, Ruiz V, Montaña M, Barrera L, Sada-Ovalle I, Ramírez R, Granados J, Pardo A y Selman M (2009). MICA polymorphisms and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility. *Human Genet*. 125(5-6):639-648.
- Argüello JR, Little AM, Pay AL, Gallardo D, Rojas I, Marsh SG, Goldman JM, y Madrigal JA (1998). Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet*. 18(2):192-194.
- Arreygue-García NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarroy A, Troyo-Sanroman R, Bravo-Cuellar A, Delgado-Rizo V, Garcia-Iglesias T, Hernandez-Flores G, y del Toro-Arreola S (2008). Aumented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 21(8):16.

- Asghar T, Yoshida S, Kennedy S, Negoro K, Zhuo W, Hamana S, Motoyama S, Nakafo S, Barlow D, y Maruo T (2004). The tumor necrosis factor- α promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population. *Hum Reprod.* 19(11):2509-2514.
- Atan D, Turner JS, Kilmartin JD, Forrester VJ, Bidwell J, Dick DA, y Churchill JA (2005). Citokine Gene Polymorphism in Sympathetic Ophthalmia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(11):4245-4250.
- Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson GA, Stephenson JT, Cox A, Brown JN y Reed WM (2004). Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res.* 6(4):R395-R400.
- Baena A, Leung JY, Sullivan AD, Landires I, Vasquez-Luna N, Quiñones-Berrocal J, Fraser PA, Uko GP, Delgado JC, Clavijo OP, Thim S, Meshnick SR, Nyirenda T, Yunis EJ y Goldfeld AE (2002). TNF α promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. *Genes Immun.* 3(8):482-487.
- Bahram S (2000). MIC Genes: From Genetics to Biology. *Adv Immunol.* 76:1-60.
- Bahram S y Spies T (1996). Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. *Inmunogenetics* 43(4):230-233.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, y Spies T (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(14):6259-63.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Letscher H, y Lesslauer W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd tnf receptor-human tnf beta complex: implications for tnf receptor activation. *Cell* 73(3):431-445.
- Barrett JC, Fry B, Maller J y Daly MJ (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2):263-265.
- Baseman GJ y Koutsky AL (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 32 (Suppl 1):S16-S24.
- Bauer S, Groh V, Wu J, Stinle A, Phillips JH, Lanier LL, y Spies T (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285(5428):727-729.
- Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Seki N, Ploski R, Fukitani T, Kurytowicz A, Jazdzewski K, Chojnowski K, Itoh K, y Nauman J (2004). Association of Tumor Necrosis Factor and Human Leukocyte Antigen DRB1 Alleles with Grave's ophthalmopathy. *Hum Immunol.* 65(6):632-639.
- Berek SJ (2003). Simplification of the New Bethesda 2001. Clasification System. *Am J Obstet Gynecol.* 188(Suppl 3):S3-S5.

- Berumen-Campos J (2003). Nuevos Virus del Papiloma Humano descubiertos en México; su asociación a la alta incidencia del cáncer del cérvix. *Gac Méd Mex.* 139 (s4): S2-S10.
- Bosch FX, Lorinez A, Muñoz N, Meijer CJ, y Shah KV (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 55(4):244-265.
- Brinkman BM, Keet IP, Miedema F, Verweij CI, y Klein MR (1997). Polymorphism within the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human immunodeficiency virus type-1 seropositive persons. *J Infect Dis.* 175(1):188-190.
- Burd ME (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev.* 16(1):1-17.
- Calhoun ES, McGovern RM, Janney CA, Cerhan JR, Iturria SJ, Smith DI, Gostout BS y Persing DH (2002). Host Genetic Polymorphism Analysis in Cervical Cancer. *Clin Chem.* 48(8):1218-1224.
- Canul-Canche J, Rosado-Lopez I, Suarez GN, Colli-Acosta G, Conde-Ferráes L, Canto de Cetina T, y González-Losa MR (2010). High prevalence and low E6 genetic variability of human papillomavirus 58 in women with cervical cancer and precursor lesions in Southeast Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105(2):144-148.
- Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías-Mendivil M, Solorza G y Lizano M (2004). Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pública Mex.* 46(1):7-15.
- Castro FA, Haimila K, Sareneval I, Schmitt M, Lorenzo J, Kunkel N, Kumar R, Försti A, Kjellberg L, Hallmans G, Lehtinen M, Hemminki K y Pawlita M (2009). Association of HLA-DRB1, interleukin-6 and cyclin D1 polymorphisms with cervical cancer in the Swedish population – a candidate gene approach. *Int J Cancer.* 125(8):1851-1858.
- Chan SKP, Chang RA, Cheung KLJ, Chan CPD, Xu XYL, Tang SLN y Cheng FA (2002). Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high and Low oncogenic risk types. *J Infect Dis.* 185(1):28-35.
- Chen JR, Lee YJ, Chen T, Wang KL, Dang CW, Chang SC, Liu HF, y Yang YC (2005). MHC class I chain-related gene A (MICA) polymorphism and the different histological types of cervical cancer. *Neoplasma* 52(5):369-373.
- Chen YC, Hu FJ, Chen P, Wu YR, Wu HC, Chen ST, Lee-Chen GJ y Chen CM (2010). Association of TNF α gene with spontaneous deep intracerebral hemorrhage in th Taiwan population: a case control study. *BMC Neurol.* 10:41.
- Cheng L, Zhang SZ, Xiao CY, Hou YP, Li LL, Jiang HC, y Zuo WQ (2000). The A5.1 allele of the major histocompatibility complex class I chain-related gene A is associated with psoriasis vulgaris in Chinese. *Br J Dermatol.* 143(2):324-329.

- Choi HB, Han H, Youn JI, y Kim TG (2000). MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. *Tissue Antigens* 56(6):548-550.
- Chong TK, Xiang L, Wang X, Jun EL, Xi Lf, y Schweinfurth MJ (2006). High level expression of human epithelial β -defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. *Virology* 343(3):75.
- Choy KM y Phipps EM (2003). Possible Polyphyletic Origin of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A (MICA) Alleles. *J Mol Evol.* 57(1):38-43.
- Choy KM y Phipps EM (2010). MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med.* 16(3):97-106.
- Comunicado Núm. 267/11, del 13 de julio de 2011. Geografía del cáncer femenino, como causa de muerte. Aguascalientes, Ags. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 1-8 pp
- Cortinas C. Cáncer: Herencia y Ambiente. México: Editorial Fondo de Cultura Económica, 1998, 1-24 pp.
- Cosman, D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin R, Armitage W, Fanslow M, Kubin N, y Chalupny J (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14(2):123-133.
- Davidson EJ, Kitchener HC, y Stern PL (2002). The Use of Vaccines in the Prevention and Treatment of Cervical Cancer. *Clinical oncology Royal College of Radiologists Great Britain* 14(3):193-200.
- De la Cruz-Hernández E, García-Carrancá A, Mohar-Betancourt A, Dueñas-González A, Contreras-Paredes A, Pérez-Cardenas E, Herrera-Goepfert R, y Lizano-Soberón M (2005). Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol.* 86(Pt 9):2459-2468.
- De la Cruz-Hernández E, Pérez-Cárdenas E, Contreras-Paredes A, Cantú D, Mohar A, Lizano M y Dueñas-González A (2007). The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors an in vitro and clinical study. *Virology* 364(4):18.
- de Roda AM, Walboomers JMM, Van Den Brule AJC, Meijer CJ, y Snijders PJ (1995). The use of the general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 76(Pt 4):1057-1062.
- de Villiers ME, Fauquet C, Broker RT, Bernard UH, y zur Hausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1):17-27.
- De Vita TV, Hellman S. Rosenberg AS. *Cancer: Principles & Practice of Oncology.* Philadelphia: 4th edition JB Lippincott Company, 1993, 1168-1181 pp.

- Desphande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL y Wheeler CM (2005). TNF α Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus 16-Associated Cervical Cancer. *J Infect Dis.* 191(6):969-976.
- Díaz-Flores EF, Martínez-Barona SJA, Pérez CA, y Hernández CC (2000). Estudio de la prevalencia de los subtipos del virus del papiloma humano mediante el análisis de fragmentos de restricción por la reacción en cadena de la polimerasa. *Química Clínica* 19(3):195-198.
- Domínguez-Arrebillaga S, Sánchez-González R, Becerra-Victorio G, Flores-Alfaro L, Lugo-Trampe, A, Canseco-Avila LM, Trujillo-Murillo K, Serrano-Guzmán E, y Espinoza-Ruiz M (2011). Frecuencia genotípica del virus del papiloma humano en población general de la frontera sur de México. *Enf Inf Microbiol.* 31(1):6-10.
- Doobar J (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 32(Suppl 1):S7-S15.
- Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, Pereira D, Moutinho J, Canedo P, Machado JC y Medeiros R (2005). G-308A TNF α polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(2):588-592.
- Dueñas-González A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer.* 4:38.
- Eiguchi K, Tatti S, Alonio LV, González JV, Leirós GJ, Fleider L, Vighi S, Padros K, Raimondi E, Teyssié A y 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):262-268.
- Endo M, Tai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K y Yoshie H (2001). Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 72(11):1554-1559.
- Fan T, Lu H, He H, Shi L, McClarty AG, Nance MD, Greenberg HA y Zhong G. (1998). Inhibition of apoptosis in Chlamydia infected Cells: Blockade of Mitochondrial Cytochrome c Release and Caspase Activation. *J Exp Med.* 187(4):487-496.
- Faro S (2006). Proceedings From the First Asia-Oceania Research Organisation on Genital Infections and Neoplasia (AOGIN) Meeting. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006:1-38.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, and Parkin DM (2010). GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: international Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, y Bahram S (1996). Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44(5):351-357.

- Fonseca-Moutinho JA (2011). Smoking and Cervical Cancer. ISRN Obstet Gynecol. 2011:847684.
- Fowler NL y Frazer IH (2004) .Mutations in TAP genes are common in cervical carcinomas. Gynecol Oncol. 92(3):914-921.
- Gambelunghe G, Falomi A, Ghaderi ML, Tortoioli CS, Brunetti FP, y Sanjeevi BC (1999). Microsatellite polymorphism of the MHC Class I chain-Related (MICA and MICB) Genes Marks the Risk for Autoimmune Addison's Disease. J Clin Endocrinol Metab. 84(10):3701-3707.
- García F, Mendez de Galaz E, Baldwin S, Papenfuss M, Giuliano AR, Hatch K, y Davis J (2003). Factors that affect the quality of cytologic cervical cancer screening along the Mexico-United States border. Am J Obstet Gynecol. 189(2):467-472.
- Genç MR, Vardhana S, Delaney ML, Witkin SS, Onderdonk AB, y MAP Study Group (2007). TNFA-308G>A polymorphism influences the TNF-alpha response to altered vaginal flora. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 134(2):188-191.
- Ghaderi M, Hjelmström P, Hallmans G, Wiklund F, Lenner P, Dillner J, y Sanjeevi BC. (1999). MICA Gene Polymorphism and the Risk to Develop Cervical Intraepithelial Neoplasia. Hum Immunol. 60(10):970-973.
- Ghaderi M, Nikitina ZL, Wallin K, Wiklund F, Hallmans G, Lenner P, Dillner J, y 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):1153-1158.
- Giuliano AR, Denman C, Guernsey de Zapien J, Navarro Henze JL, Ortega L, Djambazov B, Mendez Brown de Galaz E, y Hatch K (2001). Design and results of the USA-Mexico border human papillomavirus (HPV), cervical displasia, and *Chlamydia trachomatis* study. Rev Panam Salud Publica. 9(3):172-181.
- Giuliano AR, Papenfuss M, Schneider A, Nour M, y Hatch K (1999). Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among Mexican-American women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 8(7):615-620.
- Giuliano RA, Sedjo LR, Roel JD, Harris R, Baldwin S, Papenfuss RM, Abrahamsen M y Inserral P (2002). Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). Cancer Causes Control 13(9):839-846.
- González S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, García-Fernández S, Torre-Alonso JC, y López-Larrea C (2002). MICA rather than MICB, TNFA, or HLA-DRB1 is associated with susceptibility to psoriatic arthritis. J Rheumatol. 29(5):973-978.
- González-Losa M, Rosado-López I, Valdez-González N, and Puerto-Solis M (2004). High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. J Clin Virol. 29(3):202-205.

- Gostout BS, Poland GA, Calhoun ES, Sohni YR, Giuntoli RL 2nd, McGovern RM, Sloan JA, Cha SS, y Persing DH (2003). TAP1, TAP2, and HLA-DR2 alleles are predictors of cervical cancer risk. *Gynecol Oncol.* 88(3):326-332.
- Groh V, Steinte A, Bauer S, y Spies T (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 279(5357):1737-1740.
- Groh V, Wu J, Yee C, y Spies T (2002). Tumour derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T cell activation. *Nature* 419(6908):734-738.
- Groh VR, Rhinehart J, Randolph-Habecker MS, Topp SRR, y Spies T (2001). Coestimulation of CD8 alpha-beta T cells by NKG2d via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol.* 2(3):255-260.
- Grubic Z, Eewl-Jelicic E, Zunnec R, Stingl K, Crukovic B, y Kerhin-Brkjacic V (2004). The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic arthritis in the Croatian population. *Eur J Immunogenet.* 31(2):93-98.
- Gupta M, Nikitina-Zake L, Zarghami M, Landin-Olsson M, Kockum I, Lernmark A y Sanjeev BC (2003). Association between the transmembrane region polymorphism of MHC class I chain related Gene-A and type 1 diabetes mellitus in Sweden. *Hum Immunol.* 64(5):553-561.
- Guzaliner A, Mhirinsa A, Zhang SQ, Li-H, Guilishare N, y Zhang GQ (2010). Association between HPV infection and HLA-DQB1 alleles polymorphism in the cervical carcinogenesis in Uyghur women in southern Xinjiang. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 32(7):492-496.
- Hajeer AH y Hutchinson IV (2000). TNF- α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications. *Micros Res Tech.* 50(3):216-228.
- Hermann DM, Murlington J, Hinze-Selch D, Schreiber W, Galanos C, y Pollmacher T (1998). Endotoxin-induced changes in sleep and sleepiness during the day. *Psychoneuroendocrinology* 23(5):427-437.
- Hernández-Girón C, Smith JS, Lorincz A, Arreola-Cháidez E, Lazcano E, Hernández-Avila M, y Salmerón J (2005). The prevalence of high-risk HPV infection in pregnant women from Morelos, Mexico. *Salud Publica Mex.* 47(6):423-429.
- Hernández-Hernández DM, Cerda-Flores RM, Juárez-Cedillo T, Granados-Arriola J, Vargas-Alarcón G, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, García-Carrancá A, Salcedo-Vargas M, y Mohar-Betancourt A (2009). Human leukocyte antigens I and II haplotypes associated with human papillomavirus 16-positive invasive cervical cancer in Mexican women. *Int J Gynecol Cancer.* 19(6):1099-1106.

- Hervada VX, Santiago PM, Vazquez FE, Castillo SC, Loyola E y Silva ALC (2004). Epidat 3.0 Programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. Rev. Esp Salud Pública. 78(002):277-280.
- Hidalgo A, Monroy A, Arana RM, Taja L, Vázquez G, y Salcedo M. (2003). Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma derived cell lines. BMC Cancer 20(3):8.
- Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, y Itoh K (1998). Polymorphism of the 5'flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. Tissue Antigens 51(6):605-612.
- Hirv K, Seyfarth M, Uibo R, Kull K, salupere R, Latza U, y Rink I (1999). Polymorphisms in tumour necrosis Factor and Adhesion Molecule Genes in Patients with Inflammatory bowel Disease: Associations with HLA-DR and -DQ alleles and Subclinical Markers. Scand J Gastroenterol. 34(10):1025-1032.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, and Burk RD (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 338(7):423-428.
- Hohaus S, Giachelia M, Di Febo A, Martini M, Massini G, Vannata B, D'Alo F, Guidi F, Greco M, Pierconti F, Larocca LM, Voso MT y Leone G (2007). Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol 18(8):1376-1381.
- Hohjoh H y Tokunaga K (2001). Allele-specific binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor-alpha gene (TNFA) promoter. Genes Immun. 2(2):105-109.
- Holmes CL, Russell JA y Walley KR (2003). Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic Shock. Chest 124(3):1103-1115.
- Hosono S, Kawase T, Matsuo K, Watanabe M, Kajiyama H, Hirose K, Suzuki T, Kidokoro K, Ito H, Nakanishi T, Yatabe Y, Hamajima N, Kikkawa F, Tajima K, y Tanaka H (2010). HLA-A alleles and the risk of cervical squamous cell carcinoma in Japanese women. J Epidemiol. 20(4):295-301.
- Hu Y, Zhang SH, Huang YG, Zhu H, y Shuai CX (2010). Polymorphism of HLA-DRB1 and -DQB1 alleles among young women with cervical squamous cell carcinoma and its relation with human papillomavirus type 16 infection. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 90(31):2193-2197.
- Huang YL, Chen MR, Hsu CH, Lin SP, Sung TC, Chang SC, y Chang JG (2000). Polymorphism of transmembrane region of MICA gene and Kawasaki disease. Exp Clin Immunogenet. 17(3):130-137.
- Idriss HT y Naismith JH (2000). TNF α and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). Microsc Res Tech. 50(3):184-195.

- Iribarren JL, Martinez SF, Jimenez JJ, Brouard M, Salido E, Martinez R, y Mora ML (2008). TNF β +250 polymorphism and hyperdynamic state in cardiac surgery with extracorporeal circulation. *Interac Cardiovasc Thorac Surg.* 7(6):1071-1074.
- Ivansson EL, Juko-Pecirep I, Erlich HA, y Gyllensten UB (2011) Pathway-based analysis of genetic susceptibility to cervical cancer in situ: HLA-DPB1 affects risk in Swedish women. *Genes Immun.* 12(8):605-614.
- Ivansson EL, Magnusson JJ, Magnusson PKE, Erlich HA y 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):613-623.
- Jang WH, Yang YI, Yea SS, Lee YJ, Chun JH, Kim HI, Kim MS y Paik KH (2001). The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Lett.* 166(1):41-46.
- Jiménez-Flores R, Mendez-Cruz R, Ojeda-Ortiz J, Muñoz-Molina R, Balderas-Carrillo O, Diaz-Soberones Maria de la Luz, Lebecque S, Saeland S, Daneri-Navarro A, Garcia-Carranca A, Ullrich ES, y Flores Romo L (2005). High-risk human papilloma virus infection decreases the frequency of dendritic Langerhans' cells in the human female genital tract. *Immunology* 117(2):220-228.
- Jones C (1995). Cervical Cancer: Is Herpes Simplex Virus Type II a Cofactor?. *Clin Microbiol Rev.* 8(4):549-556.
- Jumnainsong A, Romphruk AV, Jearanaikoon P, Klumkrathok K, Romphruk A, Luanrattanakorn S, y Leelayuwat C (2007). Association of polymorphic extracellular domains of MICA with cervical cancer in northeastern Thai population. *Tissue Antigens* 69(4):326-333.
- Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, Strong RK, Groh V, y Spies T (2007). Disulphide-isomerase-enable shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 447(7143):482-486.
- Kamali-Sarvestani E, Gharesi-Fard B, Sarvari J y Tale AA (2005). Association of TNF α and TNF- β Gene Polymorphism with Steroid Receptor Expression in Breast Cancer Patients. *Pathol Oncol Res.* 11(2):99-102.
- Kang CP, Lee KW, Yoo DH, Kang C, y Bae SC (2005). The influence of a polymorphism at position -857 of the tumour necrosis factor α gene on clinical response to entenercept therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44(4):547-552.
- Kasahara M, Watanabe Y, Samasu M, y Nagata T (2002). A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex. *Proc Natl Aca Sci USA.* 99(21):13687-13692.
- Kato N, Tanaka J, Sugita J, Toubai T, Miura Y, Ibata M, Syono Y, Ota S, Kondo T, Asaka M, e Imamura M (2007). Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B

(MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* 21(10):2103-2108.

- Kaushansky K, Shoemaker SG, O'Rork CA, y McCarty JM (1994). Coordinate regulation of multiple human lymphokine genes by Oct-1 and potentially novel 45 and 43 kDa polypeptides. *J Immunol.* 152(4):1812-1820.
- Kay P, Soeters R, Nevin J, Denny L, Dehaeck MC, y Williamson AL (2003). High Prevalence of HPV 16 in South African Women with Cancer of the Cervix and Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Med Virol.* 71(2):265-273.
- Khoo HS, Pepper L, Snowden N, Hajeer HA, Vallely P, Wilkins GLE, Mandal KB, y Ollier ERW (1997). Tumour necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. *AIDS* 11(4):423-428.
- Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJ, Meijer CJ, Pawade J, y Glew S. (2004). TNF α polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol.* 92(2):675-679.
- Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, y Kwiatkowski D (1999). A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet.* 22(2):145-150.
- Kohaar I, Hussain S, Thakur N, Tiwari P, Nasare V, Batra S, Singh V, Bhambani S, Das BC, Sarkar DP y Bharadwaj M (2009). Association between human leukocyte antigen class II alleles and human papillomavirus-mediated cervical cancer in Indian women. *Hum Immunol.* 70(4):222-229.
- Kohaar I, Thakur N, Salhan S, Batra S, Singh V, Sharma A, Sodhani P, Das BC, Sarkar DP y Bharadwaj M (2007). TNF α -308 G/A polymorphism as a risk factor for HPV associated Cervical Cancer in Indian population. *Cell Oncol.* 29(3):249-256.
- Koskela P, Anttila T, Bjorge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M, Hakulinen T, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Loustarinen T, Pukkala E, Saikku P, Thoresen S, Youngman L, y Paavonen J (2000). *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cancer cervical. *Int J Cancer.* 85(1):35-39.
- Krul EJT, Schipper RF, Schreuder GM, Fleuren GJ, Kenter GG, y Melief CJM (1999). HLA and Susceptibility to Cervical Neoplasia. *Hum Immunol.* 60(4):337-342.
- Kuo WN, Lympay AP, Menezes V, Lagan LA, John S, Yeo KT, Liyanage S, du Bois MR, Welsh IK, y Lightman S (2005). TNF-857T, a genetic risk marker for acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(5):1565-1571.
- Kwiatkowski D (2000). Science, medicine and the future. Susceptibility to infection. *BMJ.* 321(7260):1061-1065.

- Lanham S, Herbert A, Basarab A, y Watt P (2001). Detection of cervical infections in colposcopy clinic patients. *J Clin Microbiol.* 39(8):2946-2950.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M (2001). Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 91(3):412-420.
- Lee GH, Choi YM, Kim SH, Hong MA, Oh ST, Lim YT y Moon SY (2008). Association of tumor necrosis factor- α gene polymorphisms with advanced stage endometriosis. *Hum Reprod.* 23(4):977-981.
- Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, y Strong RK (1999). Crystal Structure of the MHC Class I Homolog MIC-A a $\gamma\delta$ T Cell Ligand. *Immunity* 10(5):577-584.
- Liang J, Xu A, Xie Y, Awonuga AO y 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.
- Lio DC, Di Stefano C, Colonna RG, Ferraro DS, Crivello LA, Licata a, Valenza ML, Candore G, Craxi A, y Almasio LP (2003). IL-10 and TNF- α Polymorphisms and the Recovery From HCV Infeccion. *Hum Immunol.* 64(7):674-680.
- Liu C, Wang J, Zhou S, Wang B y Ma X (2010). Association between -238 but not -308 polymorphism of Tumor necrosis factor alpha (TNF.alpha)v and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in Chinese population. *Reprod Biol Endocrinol.* 28(8):114.
- Lizano-Soberón M, Carrillo-García A, y Contreras-Paredes A (2009). Infección por virus del Papiloma Humano. *Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. Cancerología* 4:205-216.
- Lo FS, Lee YJ, Huang CY, Lin CH, Chang SC, Dang CW y Liu HF (2003). Polymorphism in the transmembrane region of the major histocompatibility complex class I chain-related gene A: association of five GCT repetitions with Grave's disease in children. *Thyroid.* 13(9):839-843.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, y Darnell J. *Biología Celular y Molecular.* Editorial Medica Panamericana, 4ta Edición, 2002, Capítulo 24.
- Loke H, Bethell D, Day N, White NJ, y Hill AVS (1996). A TNF promoter variant, HLA and dengue in Vietnam. *Hum Immunol.* 47(1):680.
- López J y Ancínar AF (2006). Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev Col Cienc Quím Farm.* 35(1):5-32.
- Mak TW y Ferrick DA (1998). The gammadelta T-cell bridge: linking innate and acquired immunity. *Nat Med.* 4(7):764-765.

- Manos M, Ting M, Wright D, Lewis A, Broker T, y Wolinsky S (1989). Use polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7:209-214.
- Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM y Trowsdale J (2010). Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 75(4):435-439.
- Marsh SGE, Packer R, Heyes JM, Bolton B, Fauchet R, Charron D, y Bodmer JG. HLA: genetic diversity of HLA functional and medical implications. The 12th International Histocompatibility Workshop cell lines panel. Paris. Editorial Charron D EDK, 1997, 26-28 pp.
- Martin MP, Borcki IB, Zhang Z, Nguyen L, Ma D, Gao X, Qi Y, Carrington M, y Rader JS (2010). HLA-Cw group 1 ligands for KIR increase susceptibility to invasive cervical cancer. *Immunogenetics* 62(11-12):761-765.
- Matthews DE y Farewell V. Using and understanding medical statistics. New York. Editorial S Karger, 1985, 39 p.
- McCann MF, Irwind DM, Walton LA, Hulka SB, Morton LJ, y Axelrad MC (1992). Nicotine and Cotinine in the Cervical Mucus of Smokers, Passive Smokers and Nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1(2):125-129.
- McCluskey J, Rossjohn J, y Purcell WA (2004). TAP genes and immunity. *Curr Opin Immunol.* 16(5):651-659.
- Merza M, Farnia P, Anoosheh S, Varahram M, Kazampour m, Pajand O, Saeif S, Mirsaeidi M, Masjedi MR, Velayati AA, y Hoffner S (2009). The NRAMPI, VDR and TNF α Gene Polymorphisms in Iranian Tuberculosis Patients: The Study on Host Susceptibility. *Braz J Infec Dis.* 13(4):252-256.
- Milán LM (2006). Morbimortalidad del cancer cérvico uterino en el Estado de Guanajuato. SSA de Guanajuato, gaceta ide@s concyteg. CONCYTEG, 2006, Capítulo 18, 9-10 pp.
- Miller SA, Dykes KK, y Plesky HF (1988). A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Res.* 16(3):1215.
- Mizuki N, Masao O, Minoru K, Sigeaki O, Hitoshi A, Yoshihiko K, Masaaki Y, Koji W, Kaori G, Satoshi N, Seiamak B, y Hidetoshi I (1997). Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(4):1298-1303.
- Molinero LL, Domaica CI, Fuertes MB, Girart MV, Rossi LE, y Zwirner NW (2006). Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Hum Immunol.* 67(3):170-182.

- Moreno V, Bosch XF, Muñoz N, Meijer MLC, Shan VK, Walboomers MMJ, Herrero R, Franceschi S, form the IARC Multicentric Cervical Cancer Study Group (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359(9312):1085-1092.
- Mujeres y Hombres en México. México. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 13va Edición, 2009, 64 p.
- Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, Yoshioka Y, Tsunoda SI, Nakagawa S, Yamagata Y, y Tsutsumi Y (2010). Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal.* 3(148):ra83.
- Muñoz N, Bosh XF, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah VK, Snijders JFP, y Meijer MLJ, for the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group (2003). Epidemiologic Classification on Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 348(6):518-527.
- Muñoz N, Mendez F, Posso H, Molano M, van denBrule JC, Ronderos M, Meijer C, y Muñoz-Source A (2004). Incidence, Duration, and Determinants of Cervical Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Colombian Women with Normal Cytological Results. *J Infect Dis.* 190(12):2077-2087.
- Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, Takahashi S, Takagi S, Satoh J, Shimosegawa T, y Toyota T (1999). Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterology* 117(7):1062-1068.
- Niizeki H, Naruse T, Hashingucci K, Yokoyama M, Yamasaki Y, Akiya K, Tojo T, Urushibara T, Yamazaki Y, Inoko H, y Nishikawa T (2000). Polymorphisms in the TNFA promoter región is not associated with palmoplantar pustulosis. *Tissue Antigens* 56(2):162-165.
- Niwa Y, Hirose K, Matsuo K, Tajima K, Ikoma Y, Nakanishi T, Nawa A, Kuzuya K, Tamakoshi A, y Hamajima N (2005). Lymphotoxin-alpha polymorphism and the risk of cervical cancer in Japanese subjects. *Cancer Lett.* 218(1):63-68.
- Palacio-Mejia LS, Rangel-Gomez G, Hernández-Avila M, and Lazcano-Ponce E (2003). Cervical cancer, a disease of poverty: Mortality differences between urban and rural area in Mexico. *Salud Pública de Mex.* 45(Suppl 3):S315-S325.
- Parra-Rojas I, Ruíz-Madrigal B, Martínez-López E, y Panduro A (2006). Influence of the -308 TNF-alpha and -174 IL-6 polymorphisms on lipid profile in Mexican subjects. *Hereditas* 143(2006):167-172.
- Partida-Rodríguez O, Torres J, Flores-Luna L, Camorlinga M, Nieves-Ramírez M, Lazcano E y Pérez-Rodríguez M (2010). Polymorphisms in TNF and HSP-70 show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer. *Int J Cancer* 126(8):1861-1868.

- Passmore SJ, Morroni C, Shapiro S, Williamson A. y Hoffman M (2007). Papanicolaou smears and cervical inflammatory cytokine responses. *J Inflamm (Lond)* 4:8.
- Pérez-Rodríguez M, Argüello RJ, Fischer G, Corell A, Cox TS, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers JP, Marsh EGS y Madrigal AJ (2002). Further polymorphism of the MICA gene. *Eur J Immunogenet.* 29(1):35-46.
- Piver S. *Oncología Ginecológica*. Editorial Marban, 2da edición, 2000, 85-92 pp.
- Prayitno A (2006). Cervical cancer with Human Papilloma Virus and Epstein Barr Virus positive. *J Carcinog.* 5:13.
- Prehn TR (2007). Does the immune reaction cause malignant transformation by disrupting cell-to-cell or cell-to-matrix communications?. *Theo Biol Med Model.* 4:16.
- Programa de Acción Específico 2007-2012. Cáncer cervicouterino. México, Secretaria de Salud, Primera Edición, 2008, 19 p.
- Purdue MP, Sakoda LC, Graubard BI, Welch R, Chanock SJ, Sesterhenn IA, Rubertone MV, Erickson RL, y McGlynn KA (2007). A Case-Control Investigation of Immune Function Gene Polymorphisms and Risk of Testicular Germ Cell Tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(1):77-83.
- Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang JC, Ho FYG, Klein SR, y Burk DR (1997). PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primer Systems. *J Clin Microbiol.* 35(6):1304-1310.
- Rennert PD, Browning LJ, Mebius R, Mackay F, y Hochman SP (1999). Surface Lymphotoxin α/β Complex Is Required for the Development of Peripheral Lymphoid Organs. *J Exp Med.* 184(5):1999-2006.
- Rohan ET y Shah VK. *Cervical Cancer: From Etiology to Prevention*. Educational strategies for the Prevention of Cervical Cancer. Chapter 9. Academic Publishers Ed. Kluwer, 2004, 237-260 pp.
- Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, Gonzalez E, y Martin J (2002). A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven CGT repeats. *Tissue Antigens* 60(6):526-528.
- Sanabria NJG, Abreu MM, y Salgueiro MV (2005). Tendencias e Incidencia Actual del Cáncer Cérvico Uterino. VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía y Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet. www.conganat.org.
- Santin DA, Hermonat LP, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, Parham PG y Cannon JM (1999). Induction of Human Papillomavirus-Specific CD4(+) and CD8(+) Lymphocytes by E7-Pulsed Autologous Dendritic Cells in Patients with Human Papillomavirus Type 16 and 18 Positive Cervical Cancer. *J Virol.* 73(7):5402-5410.

- Schiffman HM y Brinton AL (1995). The Epidemiology of Cervical Cancer. *Cancer* 76(Suppl 10):1888-1901.
- Schiffman M. y Krüger KS (2003). Chapter 2: Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monog.* 31:14-19.
- Sellors WJ, Karwalajtys LT, Kaczorowski AJ, Mahony BJ, Lytwyn A, Chong S, Sparrow J, Lorincz A, for the Survey of HPV in Older Ontario Women (SHOOW) Group (2002). *CMAJ* 167(8):871-873.
- Sepp R, Szabú I, Uda H, y Sakamoto H (1994). Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J Clin Pathol.* 47(3):318-323.
- Sharma S, Rathored J, Ghosh B y Sharma KS (2010). Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians. *BMC Infect Dis.* 10:165.
- Shiina T, Inoko H, y Kulski JK. (2004). An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens* 64(6):631-649.
- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata k, Tomizawa M, Okuaki n, Kuwano Y, Watanabe k, Fukuzumi Y, Itakira S, Sugawara Ch, Ono A, Yamazaki m, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Brahram S, y Inoko H (1999). Molecular dynamics of the MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(23):13282-13287.
- Silva B, Vargas AG, Zuñiga RJ, Rodríguez RTS, Hernández MB, Osnava N, Korman S, Torres LA, y Granados J (1999). Genetic Features of Mexican Women Predisposing to Cancer of the uterine Cervix. *Hum Pathol.* 30(6):626-628.
- Simões TR, Gonçalves GMA, Castelli CE, Júnior MC, Bettini RSJ, Discorde LM, Duarte G, Quintana MS, Simões LA, Moreau P, Carosella DE, Soares GE y Donadi AE (2009). HLA-G polymorphisms in women with Squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. *Mod Pathol.* 22(8):1075-1082.
- Singal DP, Li J, y Zhang G (2001). Microsatellite polymorphism of the MICA gene and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 19(4):451-452.
- Singh H, Jain M, Sachan R, y Mittal B (2009). Association of TNFA (-308G>A) and IL-10 (-819C>T) promoter polymorphisms with risk of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 19(7):1190-1194.
- Smith SJ, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, y Beral V (2003). Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 361(9364):1159-1167.
- Somoskövi A, Zissel G, Seitzer U, Gerdes J, Schlaak M, y Quermheim MJ (1999). Polymorphisms at position -308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first

intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide induced TNF-alpha release in sarcoidosis. *Cytokine* 11(11):882-887.

- Steen R y Shapiro K (2004). Intrauterine Contraceptive Devices and Risk of Pelvic Inflammatory Disease: Standard of care in high STI prevalence settings. *Reprod Health Matters*. 12(23):136-143.
- Stephens HA, Vaughan RW, Collins R, Kondeatis E, Theron J, y Payne A (1999). Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA encoded by polymorphism in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens* 53(2):167-74.
- Stewart BW y Kleihues P. *World Cancer Report*. Lyon, IARC Press, 2003.
- Strong KR (2001). Asymmetric ligand recognition by the activating natural killer cell receptor NKG2D, a symmetric homodimer. *Mol Immunol*. 38(14):1029-1037.
- Sugimura K, Ota MM, Katsuyama Y, Ishizika KM, Mizuki NS, Honma TI, y Asakura H (2001). A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 57(1):9-14.
- Svejgaard A y Ryder, LP (1994). HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 43(1):18-27.
- Takei K, Ikeda S, Arai T, Tanaka N, Muramatsu M, y Sawabe M (2008). Lymphotoxin-alpha polymorphisms and presence of cancer in 1,536 consecutive autopsy cases. *BMC Cancer* 8:235.
- Tanaka G, Sandford AJ, Burkett K, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, y He JQ (2007). Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms and lung function in smokers. *Eur Respir J*. 29(1):34-41.
- Tingxi Y, Matthew JF, Hong TC, Tong KHC, Yick FW, Smith DI (2005). The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Citogenet*. 158(1):27-34.
- Torres-Labatón A, Rojo-Herrera G, Torres-Rojo A, Hurtado-Estrada G, Román Bassaure E (2004). Cervical cancer. Current view of its epidemiology and risk factors. *Ginecol Obstet Mex*. 72:466-474.
- Touitou I, Picot MC, Domingo C, Notarnicola C, Cattani D, Demaille J y Koné-Paut I (2001). The MICA region determines the first modifier locus in Familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheumatism* 44(1):163-169.
- Udalova IA, Nedospasov SA, Webb GC, Chaplin DD, y Turetskaya RL (1993). Highly Informative Typing of the Human TNF Locus Using Six Adjacent Polymorphic Markers. *Genomics* 16(1):180-186.

- Udalova IA, Richardson A, Denys A, Smith C, Ackerman H, Foxwell B, y Kwiatkowski D (2000). Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promotor region. *Mol Cell Biol.* 20(24):9113-9119.
- US National Institute of Health. Contraceptive Evaluation Branch and Contraceptive Development Branch Programs Reports to the National Advisory Child Health and Human Development Council center for Population Research National Institute of Child Health and Human Development, 1991, 20-31 pp.
- Vaccarella S, Lazcano-Ponce E, Castro-Garduño JA, Cruz-Valdez A, Díaz V, Schiavon R, Hernández P, Kornegay RJ, Hernández-Avila M, y Franceschi S (2006). Prevalence and determinants of human papillomavirus infection in men attending vasectomy clinics in Mexico. *Int J Cancer.* 119(8):1934-1939.
- Verbeke P, Welter-Stahl L, Ying S, Hansen J, Häcker G, Darville T, y Ojcius MD (2006). Recruitment of BAD by the *Chlamydia trachomatis* vacuole correlates with host cell survival. *PLoS Pathog.* 2(5):0408-0417.
- Wallace RGV, Delamaine HD, Ohno JL, Inoki S, Ota H, Mizuki NY, Yabuki K, Kondiatis E, Sthephens AFH, Madanat W, Kanawati AC, Stanford RM, y Vaghan VR (1999). MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behçet disease. *Immunogenetics* 49(7-8):613-617.
- Watt A, Garwood D, Jackson M, Younger N, Ragin C, Smikle M, Fletcher H, y McFarlane-Anderson N (2009). High-risk and multiple human papillomavirus (HPV) infections in cancer-free Jamaican women. *Infect Agent Cancer.* 4 (Suppl 1):S11.
- Weiss-Steider B, Soto-Cruz I, Martínez-Campos CA y Mendoza-Rincon JF (2011). Expression of MICA, MICB and NKG2D in human leukemic myelomonocytic and cervical cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 10:30-37.
- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, y Duff GW (1993). Single base polymorphism in the Human Tumour Necrosis Factor alpha (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1(5):353.
- Winklestein W (1990). Smoking and cervical cancer – current status: a review. *Am J Epidemiol.* 131(6):945-957.
- Wu GD, Lai EJ, Huang N, y Wen X (1997). Oct-1 and CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J Biol Chem.* 272(4):2396-2403.
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, y Phillips JH (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285(5428):730-732.
- Xi FL, Touré P, Critchlow WC, Hawes ES, Dembele B, Sow SP y Kiviat BN (2003). Prevalence of specific types of human papillomavirus and cervical squamous intraepithelial

lesions in consecutive, previously unscreened, west-african women over 35 years of age. *Int J Cancer*. 103(6):803-809.

- Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, y Kawakami Y (2001). The Gene Polymorphism of Tumor Necrosis Factor- β , But Not That of Tumor Necrosis Factor- α , Is Associated with the Prognosis of Sarcoidosis. *Chest* 119(3):753-761.
- Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Nishioka T, Fukunaga S, Futani H, Okamura H y Terada N (2010). Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, augments the expression of cell-surface NKG2D ligands, MICA/B, without increasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity. *Oncol Rep*. 6:1621-1627.
- Yamashina M, Kaneko Y, Maesawa C, Kajiwara T, Ishii M, Fujiwara F, Taneichi H, Takebe N, Ishida W, Takahashi K, Masuda T, y Satoh J (2007). Association of TNF-alpha gene promoter C-857T polymorphism with higher serum LDL cholesterol levels and carotid plaque formation in Japanese patients with type 2 diabetes. *Tohoku J Exp Med*. 211(3):251-258.
- Zhao ZZ, Nyholt DR, Le L, Thomas S, Engwerda C, Randall L, Treloar SA y Montgomery GW (2007). Genetic variation in tumour necrosis factor and lymphotoxin is not associated with endometriosis in an Australian sample. *Human Reprod*. 22(9):2389-2397.
- Zheng ZM y Baker CC (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 11:2286-2302.
- Zoodma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, de Vries EG, teMeerman GJ, y van der Zee AG (2005). Analysis of the entire HLA región in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. *J Med Genet*. 42(8):e49.
- Zuñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK y Granados J (2001). Tumor necrosis factor- α promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun*. 2(7):363-366.
- Zwirner WN, Fernandez-Viña M y Stastny P (1998). MICA a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endotelial cells and monocytes. *Immunogenetics* 47(2):139-148.