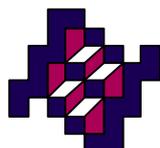


**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**



**ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD PÚBLICA**

**POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN  
DE INTERLEUCINA 10 Y SU ASOCIACIÓN CON LA  
INFECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y EL  
CÁNCER CERVICOUTERINO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA  
SALUD PÚBLICA CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN  
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**PRESENTA**

**M. en C. KIRVIS JANNETH TORRES POVEDA**

**Cuernavaca, Morelos**

**Febrero 2011**

**E**sta tesis doctoral se desarrolló en el Laboratorio de Virus y Cáncer del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer del Instituto Nacional de Salud Pública de México (INSP).

**Bajo la Dirección del:**

Dr. Vicente Madrid Marina. S.N.I. III

**Asesores de Tesis:**

Dra. Ana Burguete García. CISEI/INSP. Candidato S.N.I. I

Dra. Verónica Valverde. CISEI/INSP. S.N.I. I

Dr. Miguel Cruz López. CMN Siglo XXI. S.N.I. II

Dr. José Moreno Rodríguez. CISEI/INSP. S.N.I. II

**Jurado de Examen de Grado:**

**Presidente:** Dr. Alejandro García Carrancá. INCAN. S.N.I. III

**Secretario:** Dr. Vicente Madrid Marina. INSP. S.N.I. III

**Primer sinodal:** Dra. Lizbeth López Carrillo. INSP. S.N.I. III

**Segundo sinodal:** Dr. Gilberto Vargas. InCar. S.N.I. III

**Tercer sinodal:** Dr. Juan Manuel Alcocer. UNAL. S.N.I. I

## Créditos

***Esta tesis corresponde a los estudios de Doctorado realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México.***

**A** la Secretaría de Relaciones Exteriores por haberme otorgado la beca Programa M.Sc. Doctorado o Investigación en diferentes áreas “Programas bilaterales de México”, para realizar el Doctorado en Ciencias de la Salud Pública.

**A**l Instituto Nacional de Salud Pública de México por permitirme realizar los estudios de Doctorado en Ciencias de la Salud Pública en la Escuela de Salud Pública de México, centro de estudios acreditado por la CEPH y pionero en la investigación en salud pública en la Región de las Américas.

**A** la Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer del Instituto Nacional de Salud Pública de México, por permitirme realizar el trabajo experimental en sus instalaciones.

**A**l Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de la investigación a través del proyecto Conacyt-Fosis Salud-2008-C01-87701.

## Dedicatoria

**E**sta tesis doctoral va dedicada a mis Padres Consuelo y Augusto, por ser los semilleros de mi alcanzable deseo de crecer como mujer y profesional y por brindarme su amor y apoyo incondicional a pesar de la distancia.

*Ciertamente, la educación no tiene sentido a menos que nos ayude a comprender la vasta extensión de la vida con todas sus sutilezas, con sus dolores y sus alegrías, con su extraordinaria belleza. Ciertamente, el sentido de aprender es llegar a que vivamos libres y sin temor (Krishnamurti).....  
A este nivel estoy llegando.*

## Agradecimientos

A esa fuerza interior que le llamo Dios por no dejarme vencer ante las adversidades y llenarme de razones para alcanzar mis sueños.

Al Dr. Vicente Madrid Marina por su apoyo incondicional como Director y Tutor, por demostrarme que se puede ser exitoso sin dejar a un lado la calidad humana y por potenciar mi pasión hacia la investigación y hacia la vida.

A la Dra. Ana Burguete por su asesoría en el diseño del estudio y análisis estadístico, sin ello no hubiera podido llegar a buen éxito mi investigación.

Al Dr. Miguel Cruz por su asesoría en el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Lizbeth López por su disposición para la lectura de la tesis y por sus recomendaciones para el mejoramiento de los análisis de la investigación.

A la Maestra Margarita Bahena por su apoyo en el trabajo experimental y su amistad.

A la Bióloga Esmeralda Ortiz y el Ingeniero Biotecnólogo Abrahan Ramírez por su apoyo operativo en la realización de este trabajo.

A la Maestra Gabriela Martínez por su apoyo en el análisis de genotipificación.

A la Dra. Karina Delgado y Dra. Guillermina López, por su apoyo en la selección de la población de estudio de esta investigación en el Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por su apoyo en la logística para el registro de este proyecto en el Instituto Nacional de Cancerología y la selección de la población de estudio de esta investigación.

A todas las personas sanas o enfermas, que dispuestas a participar en este estudio, hicieron posible la investigación.

A Elsa Martínez por su amistad, su apoyo y su confianza.

A todos los que me han brindado su amistad y confianza desde mi llegada a México, muchas gracias.

# Índice

<b>I. Resumen</b>	<b>6</b>
<b>II. Marco Teórico</b>	<b>8</b>
<b>III. Planteamiento del Problema</b>	<b>42</b>
<b>IV. Justificación</b>	<b>44</b>
<b>V. Preguntas de investigación</b>	<b>44</b>
<b>VI. Marco Conceptual</b>	<b>45</b>
<b>VII. Hipótesis</b>	<b>46</b>
<b>VIII. Objetivos Generales</b>	<b>46</b>
<b>IX. Objetivos Particulares</b>	<b>46</b>
<b>X. Metodología</b>	<b>47</b>
<b>XI. Resultados</b>	<b>60</b>
<b>XII. Discusión</b>	<b>81</b>
<b>XIII. Conclusiones</b>	<b>90</b>
<b>XIV. Bibliografía</b>	<b>92</b>
<b>Índice de cuadros</b>	<b>111</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>112</b>
<b>Anexos</b>	<b>113</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>122</b>
<b>Publicaciones</b>	<b>123</b>

## I. Resumen

En lesiones precancerosas del cérvix y en cáncer cervicouterino (CaCU) se ha identificado un estado de inmunosupresión, caracterizado por un aumento de la expresión de las interleucinas tipo II (IL-4, IL-10, supresoras de la respuesta inmune celular) y una concomitante reducción de las interleucinas tipo I (IL-2, INF- $\gamma$ ), el cual favorece la persistencia de la infección por VPH. Así, en la presente investigación se analizó la asociación de polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 con el riesgo de desarrollar lesión escamosa intraepitelial de cuello uterino (LEI) y CaCU y se evaluó si la expresión del ARNm de IL-10 tanto a nivel sistémico como en cérvix y el nivel de proteína en suero, están influenciados por alguno de los genotipos de IL-10 analizados en población mexicana.

Esta investigación incluyó tres estudios transversales: un primer estudio realizado en mujeres con LEI y sin LEI, un segundo estudio realizado en mujeres con CaCU y sin LEI y un tercer estudio que incluyó tanto los casos de LEI como de CaCU para evaluar la expresión del ARNm de IL-10 tanto a nivel sistémico como en cérvix y el nivel sérico de proteína de IL-10. Para la selección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con implicación funcional potencial en la regulación transcripcional de IL-10, un análisis genómico por secuenciación de la región promotora del gen de IL-10 fue realizado. Muestras de sangre periférica de las pacientes con LEI [tanto de bajo grado (LEIBG) como de alto grado (LEIAG)], CaCU y pacientes sin LEI como grupo control, fueron usadas para evaluar cuatro polimorfismos bialélicos seleccionados de la región promotora de IL-10 (-592 C/A, -819 C/T, -1082 A/G y -1352 A/G), por discriminación alélica con sondas Taqman. Exudados cervicales en mujeres sin LEI y biopsias cervicales en mujeres con LEI y CaCU fueron usados para la tipificación de VPH y la evaluación del nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel local. Los niveles de expresión génica fueron evaluados por PCR en tiempo real.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los cuatro SNPs seleccionados fueron evaluadas inicialmente en pacientes con LEI (n= 204) versus sin LEI (n= 166); así mismo, en pacientes con CaCU (n=80) versus sin LEI (n= 166) y se estimaron ORs con sus respectivos intervalos de confianza (IC) mediante regresión logística. Se demostró tras el análisis de asociación de los polimorfismos en la región promotora de IL-10 en pacientes con LEI y CaCU, que individuos que portaron al menos una copia del alelo de riesgo A del SNP -592, presentaron una RM de 2.02 (IC95% 1.26-3.25  $p < 0.003$ ) para LEI y una RM de 1.70 (IC95% 1.06-2.71  $p < 0.02$ ) para CaCU. De tal manera, que una copia del alelo de riesgo A es suficiente para incrementar el riesgo de tener LEI y CaCU y el ser portador de dos copias de este

alelo modifica en igual magnitud este riesgo. En contraste con el análisis en LEI, el SNP -819 C/T resultó asociado significativamente con CaCU. Individuos que portaron al menos una copia del alelo de riesgo T, presentaron una RM de 3.44 (IC95% 1.35-8.73  $p < 0.001$ ), de tal forma, que una copia del alelo de riesgo T es suficiente para incrementar el riesgo de tener CaCU. Al evaluar la asociación de la carga de alelos de riesgo de los -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10 con LEI y CaCU, se encontró que portar tres o más alelos de riesgo para estos SNP`s, es suficiente para incrementar el riesgo de tener LEI y CaCU.

Se demostró una diferencia significativa en el nivel de expresión del ARNm de IL-10 tanto a nivel sistémico como a nivel de cérvix en mujeres con LEI y CaCU en comparación con mujeres sin LEI, así como en el nivel sérico de la proteína de IL-10. Los niveles tanto de ARNm como de proteína de IL-10 fueron progresivamente más altos a medida que aumentaba el grado de malignidad de la lesión, por lo que la presencia de IL-10 puede considerarse como un factor importante para la persistencia viral y la progresión de la enfermedad. Al evaluar la interacción entre cada uno de los SNPs con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en los casos de LEI y CaCU, no se encontró interacción estadística, es decir, no se modificó el efecto de cada uno de los genotipos evaluados sobre el evento (tener o no lesión). Cuando se evaluó la interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en los casos de LEI y CaCU, no se encontró interacción estadística; de tal manera que, no se modificó el efecto de cada uno de los genotipos evaluados sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico.

A pesar del poder estadístico calculado para cada uno de los SNP`s, las asociaciones significativas encontradas para el SNP -592 con LEI y CaCU y para el SNP -819 con CaCU, demuestran que estos dos SNP`s son candidatos potenciales para predecir el riesgo de tener LEI y CaCU. Lo que permitirá identificar poblaciones susceptibles de padecer esta enfermedad y así poder direccionar a estas poblaciones los programas de prevención temprana de la misma.

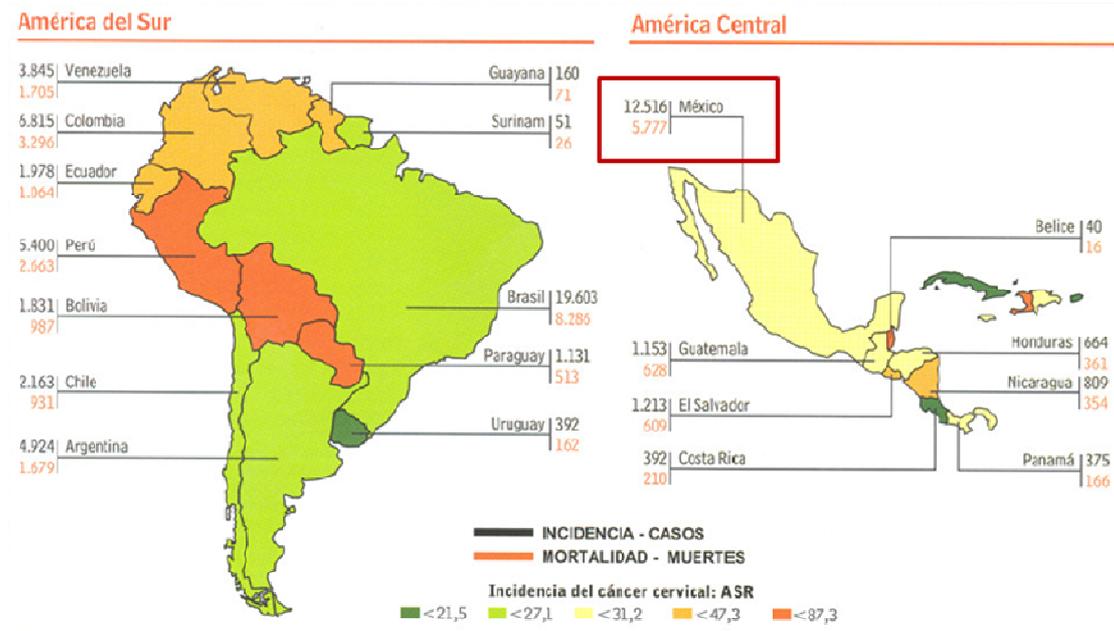
## II. Marco Teórico

### Epidemiología del Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCU) es una enfermedad de distribución mundial, aunque, las tasas más altas de incidencia se reportan en América Central y América del Sur, África Oriental, Asia Meridional y Sudoriental y Melanesia.<sup>1</sup> Las tasas de incidencia y mortalidad debido a CaCU son cerca de 15 veces más altas en países pobres, comparada con países desarrollados.<sup>2</sup> En el año 2005, se registraron, de conformidad con las proyecciones de la OMS, más de 500 000 casos nuevos de CaCU, de los cuales 90% correspondía a países en desarrollo. Se estima que un número superior al millón de mujeres padecen actualmente CaCU en el mundo, la mayoría de las cuales no están diagnosticadas o carecen de acceso a tratamientos que podrían curarlas o prolongarles la vida. Ese año, alrededor de 260 000 mujeres fallecieron de la enfermedad y cerca de 95% de esas defunciones ocurrieron en países en desarrollo; todo ello convierte al CaCU en una de las amenazas más graves para la vida de la mujer.<sup>1</sup>

En la actualidad, para América Latina el CaCU representa la segunda causa tanto de incidencia (29.2%) como de mortalidad (13.6%) por cáncer luego de cáncer de mama.<sup>3</sup> Este cáncer afecta raramente a las mujeres menores de 30 años de edad; es más frecuente en las mujeres de más de 40 años. El número más elevado de fallecimientos suele registrarse en las quincuagenarias y sexagenarias.<sup>1</sup> Las muertes por CaCU en toda la región de las Américas representan un gran número de años de vida potencial perdidos. Con base en los datos más recientes proporcionados por la OPS al respecto, entre 1996 y 2001, 74.855 mujeres de 13 países latinoamericanos murieron de CaCU. De ellas, 50.032 tenían entre 25 y 64 años de edad y su muerte prematura ocasionó más de 1,56 millones de años de vida potencialmente perdidos.<sup>4</sup> Las tasas de incidencia y mortalidad por CaCU disminuyeron en los últimos treinta años en la mayoría de los países desarrollados, probablemente como resultado de los programas de cribado y tratamiento. Por el contrario, dichas tasas aumentaron o permanecieron invariables en la mayoría de los países en desarrollo, donde al no diagnosticarse y tratarse oportunamente los casos, la mayoría de estos, resultan mortales, causan un enorme dolor y sufrimiento a la mujer y ejercen efectos adversos sobre el bienestar de la familia y la comunidad de la persona afectada. Si no se toman medidas urgentes, se prevé que las defunciones a causa del CaCU aumentarán casi 25% en los próximos 10 años.<sup>1</sup>

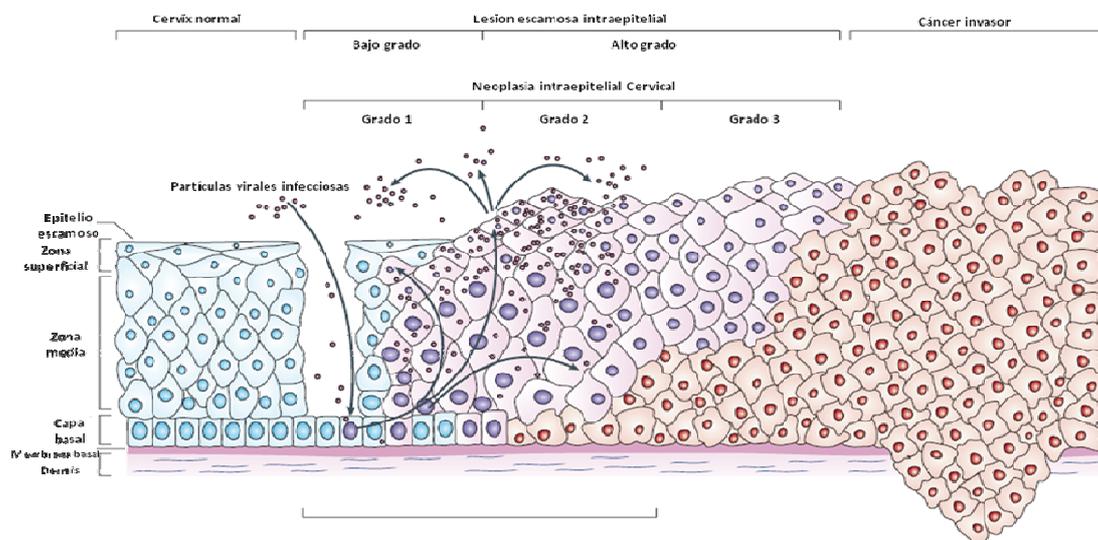
Para el 2004 la tasa media estimada de mortalidad por tumores malignos en México fue de 58.1 por 100 000 mujeres de 25 años o más.<sup>5</sup> Particularmente para el Estado de Morelos, los tumores malignos representaron la primera causa de muerte en las personas en edad productiva para el 2004, destacándose por arriba de la media estatal (62.3 por 100 000 mujeres de 25 años o más) el 45% de los municipios, entre los que se encontraron Zacatepec con 98.4, Coatlán del Río con 98.1, Tetela del Volcán con 84.9 y Cuernavaca con 83.3.<sup>6</sup> La incidencia de CaCU en México se considera una de las más altas a nivel mundial, ocupa el quinto y séptimo lugar en tasa de mortalidad e incidencia, respectivamente, comparado con los 21 países latinoamericanos (figura 1).<sup>7,8</sup> En el 2007 se reportó una tasa de incidencia de 40.5 por cada 100.000 habitantes y según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) una tasa de mortalidad de 14.3 por cada 100.000 habitantes.<sup>9</sup>



**Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino en América Latina.** Tomado de Posso H. Carga de cánceres asociados con el VPH en América Latina. Newsletter on Human Papillomavirus. HPV Today. 2007. 12: 3.<sup>3</sup>

## Patología del cáncer cervicouterino

El desarrollo del CaCU es precedido por una serie de anomalías celulares caracterizadas citológica e histológicamente por variaciones en la maduración de citoplasma e irregularidades nucleares. La enfermedad comienza como una proliferación atípica de las células epiteliales que invaden el espesor del epitelio y degeneran en lesiones más graves hasta invadir el estroma. El desarrollo de una lesión precancerosa del cuello uterino involucra varios eventos: la exposición a un virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (VPH-AR) produce una infección inicial del epitelio escamoso en la zona de transformación, seguido por alteraciones morfológicas y biológicas de las células infectadas por el VPH (figura 2). Algunos estudios apoyan la participación de alteraciones en oncogenes celulares, junto con una respuesta inmune inadecuada del huésped, para que se desarrolle un cáncer invasor.<sup>10</sup>



**Figura 2. Historia natural del cáncer cervicouterino.** Modificado de Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. Nature Reviews Cancer 2007; 7:11-22. El VPH ingresa a las células basales a través de micro abrasiones en el epitelio del cuello uterino. Después de la infección, los genes tempranos del VPH E1, E2, E4, E5, E6 y E7 se expresan y en las células infectadas, el genoma viral se mantiene de forma episomal (núcleos de color morado). En las capas superiores del epitelio (la zona media y la zona superficial), el genoma viral se replica con mayor intensidad, y los genes tardíos L1 y L2, y E4 se expresan. La ruptura de la cápside permite la liberación del genoma viral, la formación de nuevos viriones y el inicio de una nueva infección. Las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) se caracterizan por una replicación viral productiva. Un número desconocido de infecciones por VPH-AR progresan a neoplasia intraepitelial cervical de alto grado. La progresión de las lesiones tratadas a cáncer microinvasor e invasivo se asocia con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped (núcleos rojos), con la consiguiente pérdida o interrupción de E2, y la sobreexpresión posterior de la expresión de los oncogenes E6 y E7.<sup>11</sup>

En la actualidad se conoce que la transformación maligna de las células normales se debe a la alteración de dos tipos de genes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores (anti-oncogenes). Los proto-oncogenes C-myc, Ras y ErbB2 y anti-oncogenes p53 y Rb, son componentes celulares normales que cumplen funciones en el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular y que al alterarse su estructura, ya sea mediante mutaciones o a través de rearrreglos genéticos se convierten en oncogenes y producen cáncer.<sup>12</sup>

A medida que se ha mejorado el conocimiento de la historia natural de la enfermedad, la clasificación de estas lesiones ha recibido diferentes denominaciones (PAP I a V; displasia moderada, severa y carcinoma in situ; neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I, II, III y; lesiones escamosas intraepiteliales de bajo (LEIBG) y alto grado (LEIAG). Microscópicamente la evolución de la lesión se caracteriza por la diferenciación de las células epiteliales que proliferan e invaden el espesor del epitelio. La progresión es descrita en función del incremento en el grado de displasia (leve, moderada, severa) y carcinoma in situ. En displasias, las atipias celulares no comprenden todo el espesor del epitelio, se observa una tendencia a la maduración y proliferación celular normal en los estratos superiores. En carcinoma in situ, las atipias celulares comprometen todo el espesor del epitelio. La única diferencia histológica entre éste y el carcinoma infiltrante es la ausencia de invasión del estroma. Posteriormente, se introdujo la terminología de neoplasia cervical intraepitelial (NIC I, II y III). Este sistema de clasificación ha servido de base para el diagnóstico y manejo clínico de las lesiones cervicales.<sup>13</sup> Posteriormente apareció una nueva clasificación llamada "Bethesda System" en la que se describen los cambios citológicos en relación con las modificaciones histológicas.<sup>14</sup> La nueva nomenclatura introdujo los términos de alto y bajo grado de lesiones escamosas intraepiteliales (LEI). LEI de bajo grado incluye NIC I o ligera displasia, coilocitosis y condiloma. LEI de alto grado incluye NIC II y NIC III o displasia moderada o severa y carcinoma in situ. En los últimos años los cambios morfológicos en las células exfoliadas por la infección del VPH se han incorporado como componentes del diagnóstico citológico (prueba de Papanicolau) e histológico de los estadios tempranos del proceso neoplásico (figura 2).<sup>15</sup>

Las lesiones precoces son actualmente consideradas manifestaciones de la infección del VPH, las cuales se caracterizan por la presencia de alteraciones nucleares y proliferación celular del epitelio. Estas anomalías celulares tienden a la regresión espontánea. Pero algunas de estas lesiones, sobre todo las causadas por los VPH altamente oncogénicos (16, 18, 31, 33, 35, 45, 56, 58) pueden modificar el espesor del epitelio y desarrollar la enfermedad.<sup>16</sup> Sin un diagnóstico y tratamiento oportuno, el CaCU se disemina invadiendo el resto del útero, la

vagina, el parametrio lateralmente y la pelvis. Las metástasis linfáticas se manifiestan en la pelvis, en el retroperitoneo y eventualmente a distancia. La progresión clínica ha sido clasificada por FIGO (International Federation of Gynecology of Obstetrics), quienes han definido los criterios más aceptados para la estadiación clínica del CaCU en cuatro estadios (I-IV) y quince sub-estadios con diferencias marcadas en el pronóstico.

## **Historia natural del CaCU**

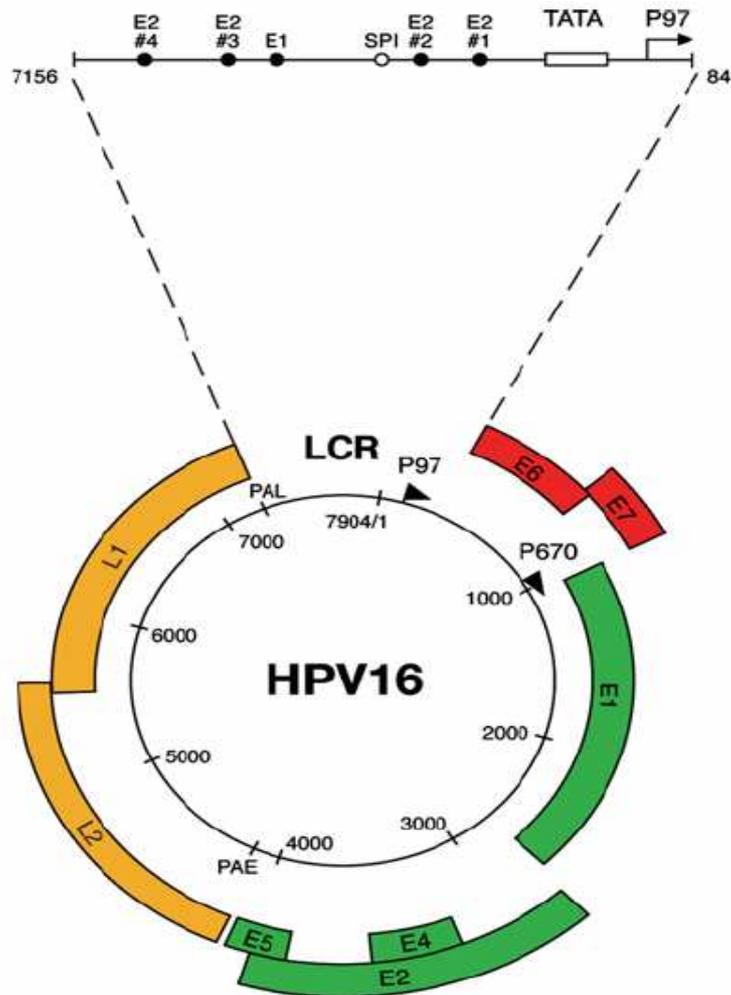
El CaCU se comporta como una enfermedad de transmisión sexual. En 1976, Zur Hausen planteó la hipótesis en la cual proponía al VPH como el agente sexualmente transmitido responsable de la transformación neoplásica en el cuello uterino. Esta hipótesis ha sido validada tanto por estudios epidemiológicos como moleculares, en los que se ha demostrado la integración del ADN del VPH en las células neoplásicas en 99% de los carcinomas cervicales.<sup>17,18</sup> Las LEIBG y NIC II, presentan un contenido de ADN diploide o poliploide, lo que se correlaciona con su tendencia a revertir. En contraste, las NIC III frecuentemente son aneuploides, presentan un grado mayor de atipia celular y tienen mayor tendencia a persistir, progresar o revertir.<sup>19</sup> Las neoplasias intraepiteliales del cérvix se definen como LEI en proliferación, que presentan maduración anormal, alargamiento nuclear y atipia. La gama amplia de lesiones epiteliales son facetas de una misma enfermedad en la cual hay un continuum de los cambios morfológicos (figura 2).<sup>14</sup>

No se conoce con certeza el tiempo que se requiere para que una lesión evolucione desde una LEIBG hasta un cáncer in situ o para que eventualmente progrese a un cáncer invasor. Existe la limitante de que mediante observaciones directas no es posible determinar el tiempo de la progresión, por ello se han desarrollado modelos matemáticos mediante los cuales se han calculado el tiempo promedio que toma a una LEIBG progresar a una LEIAG, que concluyen que se requiere en promedio cinco años y para que una LEIAG progrese a cáncer invasor en promedio de 10 a 13 años.<sup>20</sup> Diversos estudios han investigado la progresión de las LIE, destacándose algunos estudios donde encontraron que cerca de un tercio de las LIEAG no tratadas, podrían progresar a cáncer en aproximadamente diez años y aproximadamente 75% de las LEIBG podrían regresar espontáneamente (entre 6 meses a 1 año) o no progresar.<sup>21</sup>

## Etiología del CaCU

### Agente causal

El desarrollo y avance del CaCU se considera un proceso de múltiples pasos, donde la infección por el papilomavirus humano es necesaria, pero por sí misma no es una causa suficiente.<sup>18,22,23</sup> El VPH pertenece a la familia Papovaviridae, el cual se caracteriza por ser un virus pequeño que presenta una cápside compuesta de 72 capsómeros. Los capsómeros se encuentran formados por las proteínas estructurales L1 y L2.<sup>24,25</sup> Cerca de 120 tipos del VPH han sido identificados y aproximadamente un tercio de estos infectan el epitelio escamoso del tracto genital. Dependiendo del riesgo de malignidad, los VPH's han sido clasificados como VPH-AR [16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82], y bajo riesgo (VPH-BR) [6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 y 82].<sup>24</sup> El genoma del VPH presenta un ADN circular de doble cadena y está dividido funcionalmente en tres regiones.<sup>26</sup> La primera, contiene una Región Larga de Control no codificante (LCR, por sus siglas en inglés), que presenta sitios de regulación de la replicación y transcripción viral. La segunda, es una región que codifica para proteínas de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7). Las proteínas E1 y E2 participan en la replicación del ADN viral. Además, la proteína E2 reprime la transcripción de los genes de expresión temprana, a través de la unión con sitios consenso para la proteína E2 en la LCR. Esta regulación se pierde cuando el ADN viral llega a ser integrado en el genoma celular, ya que la secuencia codificante para la proteína E2 se rompe como consecuencia de la integración, lo que permite un incremento en la transcripción de los genes E6 y E7 y da inicio al proceso de transformación.<sup>27,28</sup> La proteína E4 juega un papel importante en la maduración viral, al favorecer la liberación del virus.<sup>29</sup> E5 induce transformación celular a través de: a) el incremento de las señales mitogénicas del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R) al interactuar con E5-AR; y b) a través de la inhibición de la apoptosis debido a la inactivación funcional de los receptores de muerte, DR4/DR5 y Fas (CD95).<sup>30,31</sup> Las oncoproteínas E6 y E7 son los principales elementos virales que inducen inmortalización y transformación de células infectadas con el VPH.<sup>10</sup> La tercera región, codifica para las proteínas estructurales de la cápside viral L1 y L2, las cuales son requeridas para el ensamblaje de los viriones (figura 3).<sup>27</sup>



**Figura 3. Organización del genoma del VPH.** Tomado de Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci 2006; 110: 525-541. El genoma del VPH 16 (7904 pb) se muestra como un círculo negro con los promotores tempranos (p97) y tardíos (p670) marcados por flechas. Los seis ORFs tempranos [E1, E2, E4 y E5 (en verde) y E6 y E7 (en rojo)] son expresados de p97 o p670 en diferentes etapas durante la diferenciación de las células epiteliales. Los ORFs tardíos [L1 y L2 (en amarillo)] también se expresan de p670, seguido de un cambio en los patrones de splicing y un cambio en el uso del sitio de poliadenilación [desde el sitio de poliadenilación temprano (PAE) al sitio de poliadenilación tardío (PAL)]. Todos los genes virales se codifican en una cadena del genoma de ADN de doble cadena circular. La región larga de control (LCR de 7156-7184) se presenta ampliada para permitir la visualización de los sitios de unión a E2 y el elemento TATA del promotor de p97 y los sitios de unión a E1 y Sp1.<sup>27</sup>

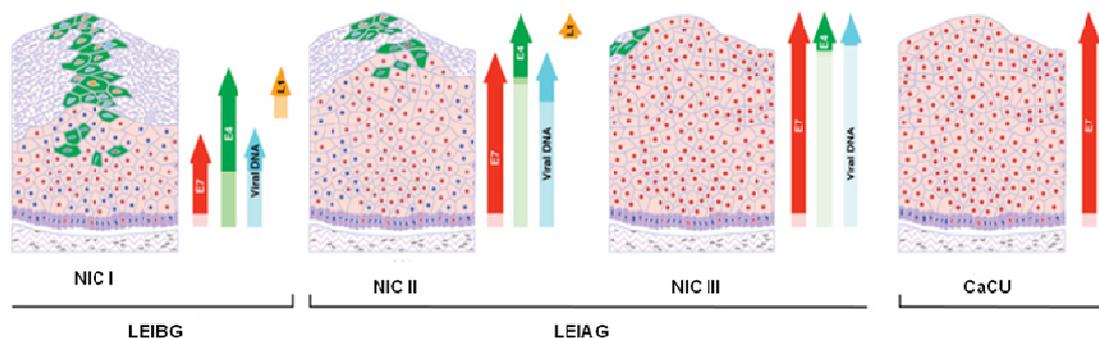
### Mecanismos de carcinogénesis del VPH

Los VPH son especie-específicos e inducen proliferaciones epiteliales o fibroepiteliales benignas de la piel y mucosa en humanos y en varias especies animales. Estos virus tienen un tropismo específico por las células epiteliales escamosas y su ciclo productivo sólo ocurre en ellas. Está bien establecido que la infección crónica de queratinocitos con VPH-AR juega un papel importante en la

patogénesis de CaCU. Este proceso complejo involucra la pérdida progresiva de la diferenciación de células epiteliales infectadas y/o la resistencia a los efectos inhibitorios del crecimiento de señalización endógena. Durante el proceso de persistencia viral, que precede al desarrollo silencioso de cáncer, la expresión de los productos de los genes virales es finamente regulada, las proteínas virales son producidas en el tejido cervical y determinan de manera específica el estado de avance de la lesión o de la neoplasia.<sup>28</sup>

La infección por el VPH comienza en las células basales, que son mitóticamente activas. Después de la infección el virus puede estar latente, replicarse y producir partículas infecciosas o integrarse al genoma celular. La infección productiva se divide en varias etapas que dependen del estado de diferenciación de las células epiteliales. El ciclo completo que incluye, la síntesis de ADN viral, la producción de las proteínas de la cápside viral y el ensamblaje de los viriones, ocurre selectivamente en queratinocitos terminalmente diferenciados.<sup>27</sup> Las células de la capa basal que proliferan, a pesar de que contienen ADN del VPH, parecen ser poco activas en la expresión de algunas proteínas virales. Aparentemente existen factores celulares que regulan negativamente la transcripción viral en estas células. Esta regulación se libera, cuando las células infectadas migran hacia arriba del epitelio en la capa granulosa, donde sufren diferenciación hasta que ya no pueden dividirse. En estas células empieza la transcripción activa de secuencias virales tempranas y tardías, se sintetizan proteínas virales y las partículas virales se ensamblan en algunas de las células superficiales.<sup>29</sup>

Aunque la mayoría de las infecciones por el VPH son transitorias y subclínicas, la progresión está fuertemente relacionada con la persistencia del VPH. Este proceso lleva frecuentemente a la disrupción viral en las regiones E1/E2 y a la integración dentro de la célula del ADN viral. La ruptura de E2 libera los promotores virales E6/E7 e incrementa la expresión de estos genes transformadores (figura 4).<sup>10,32</sup> La infección por un VPH-AR actúa como un detonador de la cascada de eventos en los que los mecanismos de reparación o corrección de la duplicación celular, mediados por las proteínas p53 y del retinoblastoma (Rb) están alterados. De esta manera, el ciclo celular es controlado por el virus, el cual desencadena alteraciones celulares que culminan con la transformación e inmortalización de la célula epitelial; así, se establecen condiciones para el inicio del cáncer.<sup>33</sup>



**Figura 4. Cambios en los patrones de expresión de oncoproteínas del VPH que acompañan la progresión a CaCU.** Tomado de Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci 2006; 110: 525-541. Durante la progresión a cáncer, el patrón de cambios de expresión de oncoproteínas virales. En NIC I (LEBG), el orden de los acontecimientos es similar a lo observado en lesiones productivas. En NIC II y III; sin embargo, la aparición de eventos se retrasa y la producción de viriones se restringe a las zonas más pequeñas cerca de la superficie epitelial. La integración de las secuencias de VPH en el genoma de la célula huésped puede acompañar a estos cambios y puede conducir a una mayor desregulación en la expresión de E7 (y la pérdida de las proteínas de replicación de E1 y E2). En el cáncer cervicouterino, las etapas productivas del ciclo de viral no son permanentes y los episomas virales suelen perderse.<sup>27</sup>

## Historia natural de la infección por el VPH - persistencia del virus

La mayoría de las infecciones por VPH son transitorias e intermitentes, especialmente entre las mujeres menores de 30 años de edad, cerca de 70% desaparecen aproximadamente en un año, 91% en dos años, y solamente 9% de las mujeres estudiadas continúan infectadas y desarrollan alteraciones del epitelio del cuello uterino.<sup>16</sup> La respuesta inmune desempeña un papel muy importante en la regresión o progresión de las lesiones asociadas a VPH.<sup>34</sup>

Estudios de cohorte han demostrado que la presencia continua de un VPH-AR es necesaria para el desarrollo, mantenimiento y progresión de LEIAG. De tal manera que la persistencia de algún tipo de VPH-AR es un predictor de la progresión a neoplasia.<sup>35</sup> Estudios previos sugieren que la infección con un VPH-AR y edad mayor de 35 años están asociadas con persistencia. Ciertos comportamientos tales como el hábito de fumar, exposición hormonal (por ejemplo la multiparidad y el uso prolongado de anticonceptivos), deficiencia nutricional, haplotipos de antígenos leucocitarios humanos (HLA), otras infecciones del tracto vaginal y la inmunodeficiencia (especialmente por HIV), se han relacionado con la persistencia de la infección y el desarrollo de CaCU.<sup>36-38</sup> Las lesiones precursoras causadas por el VPH progresan a cáncer invasor en promedio entre 10 y 20 años, por lo

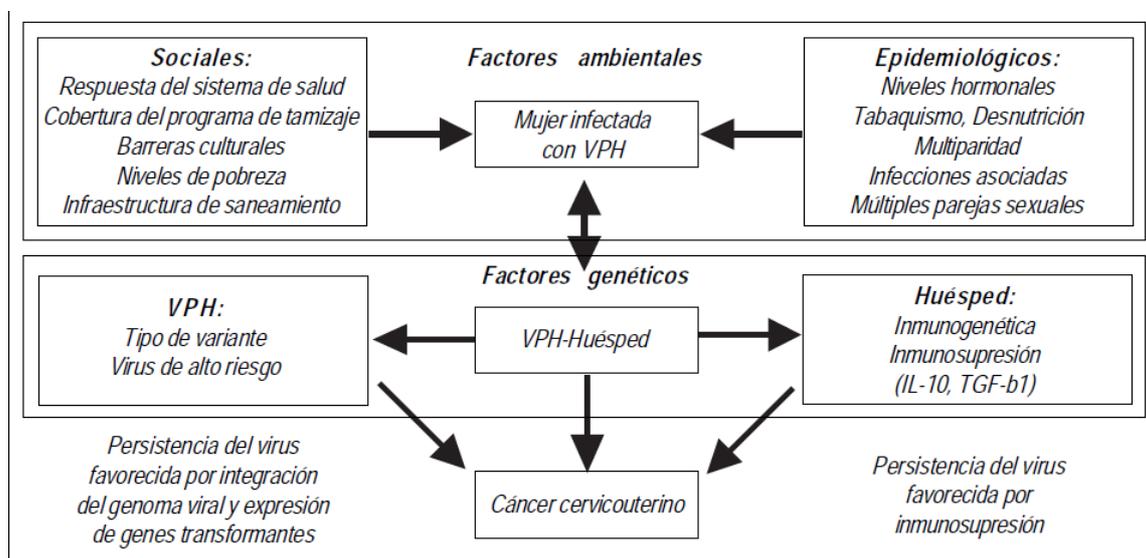
tanto el CaCU pueden prevenirse mediante la detección precoz y el tratamiento anticipado de las lesiones precancerosas.<sup>1</sup>

## Otros cofactores asociados a CaCU

La gran mayoría de las mujeres infectadas por algún tipo de VPH oncogénico nunca presentan CaCU. Esto sugiere que otros factores adicionales que actúan conjuntamente con el VPH influyen en el riesgo de aparición de la enfermedad. En muchos de los estudios epidemiológicos que se han realizado se ha estimado la contribución de factores adicionales al VPH en la etiología del CaCU.<sup>39,40</sup>

- Factores ambientales: estos factores pueden modular el efecto del VPH.

Cofactores como la paridad,<sup>41,42</sup> el uso de anticonceptivos orales por más de cinco años,<sup>42-44</sup> el tabaquismo,<sup>42,45</sup> la infección por otras enfermedades de transmisión sexual (ETS) y la desnutrición se han asociado, con la aparición de cáncer invasivo del cuello uterino. La edad de comienzo de las relaciones sexuales, el número de compañeros sexuales, los antecedentes de ETS y otras características de la actividad sexual se vinculan con la probabilidad de contraer el VPH (figura 5).<sup>46</sup>



**Figura 5. Factores determinantes del desarrollo de CaCU.** Tomado de Torres-Poveda KJ, Burguete A, Bermúdez VH, Madrid-Marina V. La infección por el virus del Papiloma humano y cáncer cérvicouterino: una perspectiva de salud pública. Revista de Investigación Clínica 2008, 60 (5): 414-420.<sup>46</sup>

Un metaanálisis publicado en el 2003, describió la relación entre inequidad social y CaCU y reportó un incremento en el riesgo de CaCU de 100% y de 60% para displasia y cáncer in situ, en mujeres de clase social baja. Dicho incremento se da sobre todo en Suramérica, África y algunas regiones de Asia. Este análisis refleja la relación existente entre la clase social y los estilos de vida como cofactores del VPH o el acceso limitado a programas adecuados de detección oportuna de CaCU.<sup>47</sup>

- Factores no ambientales: respuesta inmune del huésped, tipo y variantes del VPH, carga e integridad viral.

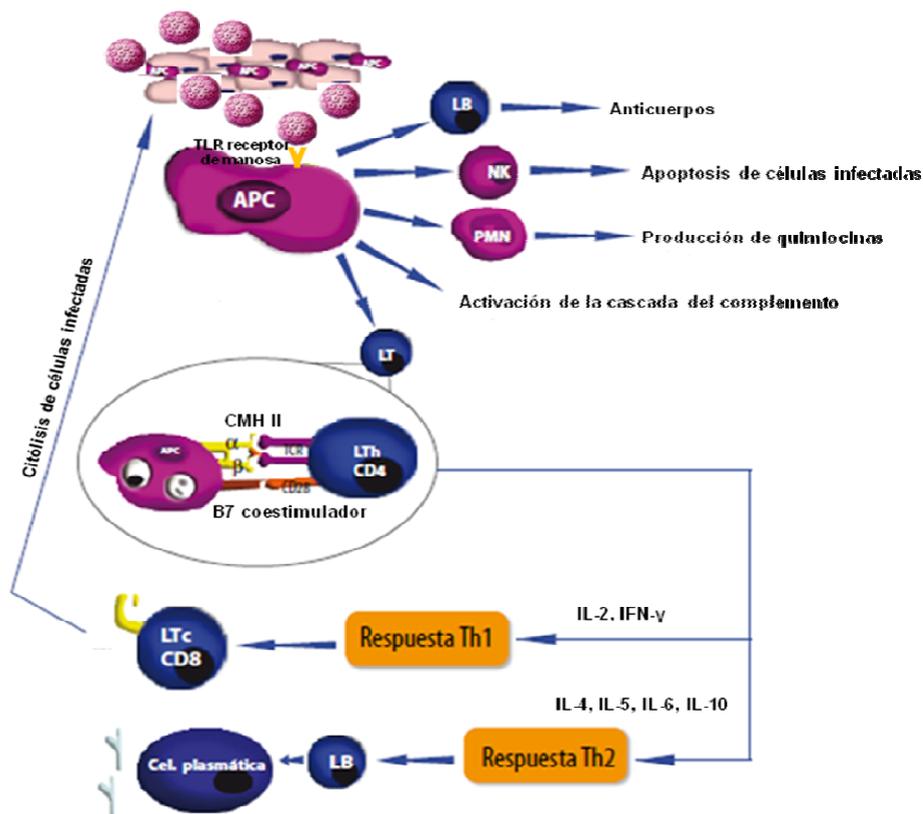
La historia natural de la infección depende principalmente del tipo de VPH, del estado inmunitario de la paciente y de su edad. Se ha observado que las mujeres menores de 35 años son más susceptibles de adquirir infecciones genitales con virus oncogénicos, mismas que desaparecen en la mayoría de los casos; al contrario, en las mujeres mayores de 35 años de edad comúnmente la lesión persiste, con cambios clínicos y morfológicos, además de presentar un mayor riesgo de progresión.<sup>8,48</sup> La inmuno-supresión—particularmente la relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ha sido un cofactor fuertemente asociado.<sup>49</sup>

## **Respuesta inmune en la infección por el VPH y CaCU**

En el ciclo de los VPH que se lleva a cabo dentro de los queratinocitos, los viriones maduros escapan de la superficie epitelial infectada en los queratinocitos que se descaman. La infección por el VPH es poco inmunogénica porque no es productiva (no produce inflamación local característica) y durante la infección hay poca presentación de antígenos virales al sistema inmune por células presentadoras de antígenos profesionales tanto local como sistémicamente.<sup>50</sup> La respuesta inmune celular juega un papel importante en el control y curso de la infección por VPH, esta respuesta varía dependiendo del grado de lesión y el potencial oncogénico del VPH. Existe evidencia de que el VPH interfiere en el ciclo del control celular con la acumulación secundaria de anomalías genéticas, que explican la persistencia viral y la progresión de las lesiones. En muchos pacientes, factores secundarios como una inadecuada respuesta inmune, juegan un papel importante.<sup>51</sup>

A escala cervical, tras la infección de las células del epitelio por el VPH, se desencadenan respuesta inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimiotracción de neutrófilos, activación de macrófagos, activación de células

asesinas naturales (NK), de anticuerpos naturales y del sistema del complemento, lo que constituye una primera barrera defensiva de inmunidad inespecífica. Las células reticulares de Langerhans (CRL) y algunos queratinocitos funcionan como células presentadoras de antígenos (CPA). Las CRL son células dendríticas inmaduras de origen mieloide que residen en el epitelio escamoso, incluyendo peil y mucosa genital. Las CRL reconocen las partículas virales, capturan los antígenos por micropinocitosis o receptores de manosa, procesan las proteínas capturadas y las transforman en péptidos inmunogénicos, inician el proceso de activación, que incluye la presentación en superficie de cadenas polipeptídicas del antígeno junto con HLA clase II, CD40 y B7, migran a los ganglios linfáticos locales y presentan los péptidos virales a los linfocitos T en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40). De esta manera se activan los linfocitos T nativos y se dirige su diferenciación hacia células efectoras, iniciando así la respuesta inmune antígeno específica (figura 6).<sup>52</sup>



**Figura 6. Respuesta inmune en la infección por el VPH.** Modificado de Rincón OL, Pareja LR, Jaramillo S, Aristizabal BH. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología 2007; 58 (3): 202-212.<sup>52</sup>

Los linfocitos T CD4+ activados evolucionan hacia linfocitos ayudadores (Th) en el contexto local de expresión de ciertas interleucinas, de modo que si predomina IL-12, se promoverá la diferenciación hacia una vía Th1 que inducirá la activación y proliferación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos (CTL+8) y la producción de IL-2 e INF- $\gamma$ ; por el contrario, si en el contexto local no se expresa IL-12, se promoverá la vía Th2 que inducirá la activación y expansión de linfocitos B, los cuales evolucionarán, diferenciándose a células plasmáticas productoras de anticuerpos frente a las proteínas virales y se inducirá la expresión de interleucinas del tipo IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (figura 6).<sup>52</sup>

### **Respuesta inmune celular**

La respuesta inmune celular local detectada en LEI se caracteriza por un moderado infiltrado y una invertida y disminuida relación Th/Tc (CD4/CD8), con capacidad de proliferación disminuida.<sup>53</sup> Un desbalance en el patrón de interleucinas Th1/Th2, dado por un aumento en las interleucinas tipo II (IL-4, IL-10, supresoras de la respuesta inmune celular) y una concomitante reducción en las interleucinas tipo I [(IL-2, interferón gamma (INF $\gamma$ ))], ha sido reportado en mujeres con LEI y CaCU.<sup>54-56</sup> La inmunidad anti-tumoral en CaCU es activada por citocinas Th1 e inhibida por citocinas Th2. Citocinas tales como IL-4, IL-12, IL-10 y/o el factor de crecimiento transformante beta1 (TGF- $\beta$ 1), producidas por varios tipos celulares (macrófagos, células dendríticas y queratinocitos), han sido involucradas en la generación de supresión de la respuesta inmune celular.<sup>54</sup>

Nuestro grupo de investigación ha analizado el patrón de citocinas y su nivel de expresión en biopsias de mujeres con CaCU. El 80% de los tumores expresan niveles bajos de ARNm de linfocitos T CD4 y niveles altos de linfocitos T CD8. La mayoría de tumores expresan ARNm de IL-4 e IL-10 y 100% de los tumores expresan el ARNm de TGF- $\beta$ 1 e INF $\gamma$ . Ninguno de los tumores expresan el mensajero de IL-12, IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF).<sup>57</sup> El análisis por inmunohistoquímica de tumores demostró la presencia de IL-10 en células tumorales y células coilocíticas, pero no en linfocitos infiltrantes, lo que sugiere que las células productoras de IL-10 pueden ser transformadas por el VPH. Por otro lado, nuestro grupo ha reportado una correlación entre la inmunotinción para la proteína de IL-10 y el nivel de expresión del ARNm de IL-10 y los sobrenadantes de líneas celulares transformadas por VPH que expresan IL-10 y TGF- $\beta$ 1. Estos hallazgos muestran una expresión predominante de citocinas inmunosupresoras, las cuales ayudan a subregular la respuesta inmune tumor específica en el microambiente tumoral.<sup>57</sup>

En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación, se evaluó la funcionalidad de linfocitos T de sangre periférica (LSP) y de linfocitos infiltrantes de tumor (LIT) de mujeres con LEI y CaCU, que incluyó proliferación, expresión del ARNm de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ 1, como también la expresión de CD3 $\zeta$ . Por inmunohistoquímica se demostró que los LIT se distribuyen en el estroma más que en el epitelio en etapas avanzadas de la enfermedad donde prevalecen linfocitos CD8. Los LSP estimulados con fitohemaglutinina de pacientes con CaCU proliferaron menos que en pacientes con LEI y sujetos sanos y se encontró una diferencia significativa en los LSP estimulados con anti-CD3 entre pacientes con CaCU y sujetos sanos. Lo que demostró que las mujeres con CaCU tienen una respuesta proliferativa de LSP deficiente y una nula respuesta para LIT.<sup>58</sup>

El reconocimiento antigénico de las células con capacidad citotóxica está mediado por receptores. En los linfocitos T, recibe el nombre de "TcR" (del inglés T-cell receptor), el cual está formado por un heterodímero de cadenas  $\alpha\beta/\gamma\delta$  y por cuatro cadenas ( $\epsilon, \delta, \gamma, \epsilon$ ), que en su conjunto son reconocidos como "TcR-CD3". Estos receptores se encuentran asociados, a su vez, con dos cadenas "zetas", que son las responsables de la transmisión de las señales de activación al interior de la célula. Las cadenas zetas también se encuentran presentes en el receptor para antígenos de las células NK. Estudios moleculares han evidenciado una expresión disminuida del dímero formado por la cadena zeta,<sup>58</sup> tanto de linfocitos T como células NK, lo que contribuye a la ineficiencia de los mecanismos efectores del infiltrado linfocitario presente en las lesiones. Estos procesos son regulados por factores locales derivados de las células tumorales. Al existir un desbalance de citocinas en el microambiente de estas lesiones, pueden detectarse ciertas afectaciones a nivel transcripcional. El infiltrado linfocitario presente en las lesiones de cuello uterino refleja una respuesta inmune ineficiente.<sup>59</sup>

Nuestro grupo reportó igualmente, una correlación significativa entre la proliferación baja de linfocitos T y la disminución de la expresión del ARNm de CD3 $\zeta$  en linfocitos T estimulados con anti-CD3, lo que indica una asociación de la función decrecida de linfocitos T con la progresión de CaCU. Adicionalmente, se encontró una asociación positiva entre la expresión del ARNm de CD3 $\zeta$ /IL-2 y CD3 $\zeta$ / IFN- $\gamma$ .<sup>58</sup> Estas alteraciones traen como consecuencia una pérdida del control sobre determinados genes de los VPH 16-18 y una desregulación en los mecanismos de presentación antigénica, de tal manera que la expresión de los antígenos HLA se muestra reducida o ausente,<sup>60</sup> y existe una ausencia parcial o total de células de Langerhans, consideradas como las presentadoras de antígenos fundamentales en la respuesta inmune contra el tumor.<sup>61</sup>

## Respuesta inmune humoral

En cuanto a la respuesta humoral, se ha encontrado variabilidad en los títulos de anticuerpos, independientemente de los altos valores de inmunocomplejos circulantes, sobre todo en aquellas pacientes en estadios más avanzados. En lesiones tempranas, se muestran altos niveles de IgG contra las proteínas oncogénicas E6/E7 y E4 del VPH, como resultado de una mayor estimulación antigénica, con una relación IgG1/IgG2 disminuida, reflejo del desbalance Th1/Th2.<sup>62,63</sup> Un estudio reciente realizado en hombres y mujeres pareja sexual en México, evaluó la respuesta sistémica de anticuerpos contra las proteínas E4 y E7 del VPH 16 y reportó una frecuencia mayor de generación y persistencia de anticuerpos y una respuesta más diversa de perfiles anti-E4 y/o anti-E7 en hombres. De tal manera, que la detección de anti-E7 sugiere la eliminación de infecciones recientes y la detección de anti-E4 sugiere exposición al VPH o infecciones en etapa de replicación viral abundante.<sup>64</sup> En los tumores avanzados, los títulos más elevados son de IgA e IgM, que disminuyen proporcionalmente a medida que avanza la enfermedad, quizá por el deterioro del sistema inmune.<sup>65</sup>

## Gen de Interleucina 10 (IL-10)

El gen humano de IL-10, comprende cinco exones separados por cuatro intrones, se expande aproximadamente 5.2 kb y está localizado en el cromosoma 1(1q21-32).<sup>66</sup> Hay genes adyacentes al gen de IL-10 dentro del segmento de aproximadamente 200 kb que forma el cluster de este gen. Los genes que codifican para IL-10 e IL-19 se encuentran a 90 kb corriente arriba y los genes que codifican para Mapkapk2 y Dyrk3 están localizados corriente abajo. IL-10 es una citocina tipo II, que pertenece a la familia de citocinas que incluyen IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 e IL-29.<sup>67</sup>

Esta citocina fue identificada originalmente por Mosmann y colaboradores<sup>68,69</sup> Desde su descripción original, la lista de células productoras de esta citocina se ha expandido rápidamente como también las células capaces de responder a ella. Las cuatro principales fuentes de IL-10 son las células T colaboradoras tipo 2 (Th2) y los subconjuntos de células T reguladoras designadas como Tr1, Th1 y células Th17.<sup>70</sup> Otros productores importantes de IL-10 son los linfocitos T CD8+, monocitos, macrófagos estimulados, algunos subconjuntos de células dendríticas (CD), linfocitos B,<sup>71</sup> y algunas células granulocíticas como los eosinófilos y los mastocitos.<sup>72</sup> Otras fuentes celulares no inmunes incluyen los queratinocitos, células epiteliales y las células tumorales.<sup>73</sup> El ARNm de IL-10 ha sido encontrado en una variedad de tumores humanos que incluyen el de ovario,<sup>74</sup> mama,<sup>75</sup> renal,<sup>76</sup> pulmonar,<sup>77</sup> CaCU,<sup>78,79</sup> melanoma<sup>80</sup> y especialmente de lesiones metastásicas.

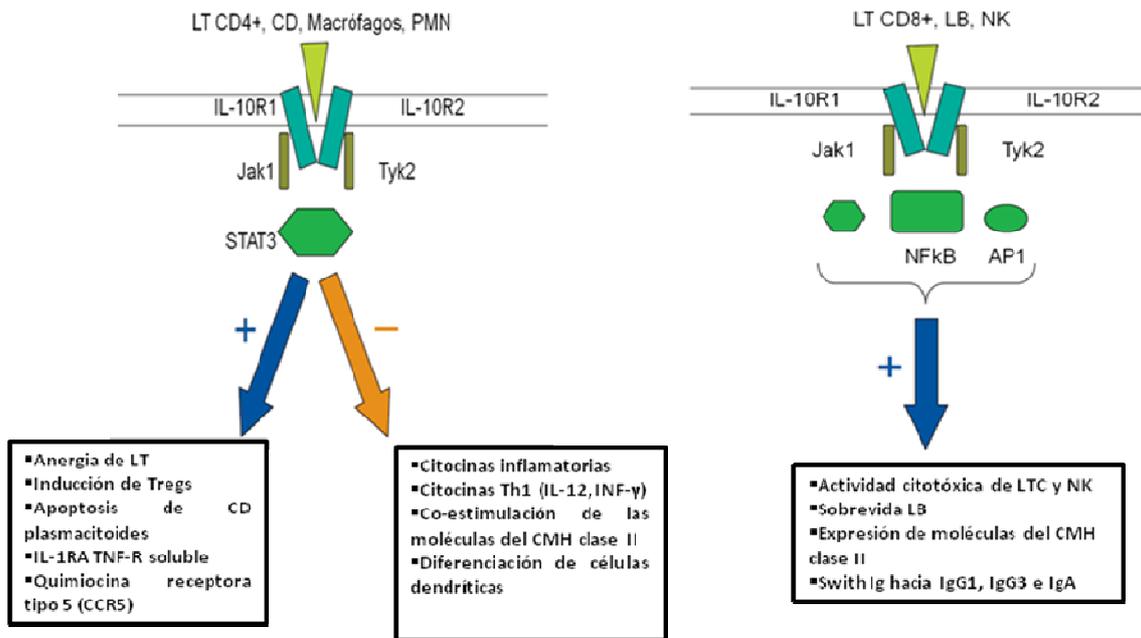
Algunas líneas celulares tumorales de colon, pulmón,<sup>77</sup> piel, melanoma,<sup>81</sup> linfoma y CaCU<sup>57</sup> producen IL-10.

## **Bioactividad de IL-10**

La principal función biológica de IL-10 es ejercida sobre CD y macrófagos (figura 7). IL-10 es un potente inhibidor de la presentación antigénica, lo que inhibe al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II así como la sobrerregulación de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. IL-10 inhibe la diferenciación de CD de precursores de monocitos e inhibe la maduración de CD. Muchas de las características inmunoinhibidoras de IL-10 pueden ser resultado de su efecto sobre las CD que previene la producción de las citocinas Th1 IL-2 e IFN $\gamma$  y de las citocinas Th2 IL-4 e IL-5.<sup>67</sup> Otro de los efectos de IL-10 es inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias y mediadores de los macrófagos y CD. Las principales citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IL-12 y el TNF, son reprimidas luego de la exposición a IL-10. Las quimiocinas inflamatorias de ambos tipos CC y CXC son suprimidas por IL-10 al igual que la producción de metaloproteasas. IL-10 inhibe el proceso inflamatorio al incrementar la liberación del antagonista del receptor de IL-1 por macrófagos. IL-10 puede tener efecto sobre los linfocitos T CD4+ "naive", posiblemente por inhibición de la vía de señalización de CD28. Esta citocina tiene poco efecto sobre linfocitos T de memoria activados, debido a la reducción del receptor de IL-10 en la activación de los linfocitos T.<sup>82</sup>

Aunque la actividad biológica mayor de IL-10 es la supresión de la respuesta inmune, IL-10 puede coestimular la activación de células B, prolongar la sobrevivencia de células B y contribuir al "switching" de clase en las células B. Esto puede también coestimular la proliferación celular de las células NK y la producción de citocinas (figura 7).<sup>83</sup> IL-10 puede actuar como un factor de crecimiento que estimula la proliferación de ciertos subconjuntos de linfocitos CD8+.<sup>84-86</sup> Estas actividades estimuladoras de IL-10 puede ser dosis dependiente y puede explicar la sobreexpresión de citocinas inflamatorias en humanos tratados con dosis altas de rIL-10.<sup>87</sup> La IL-10 es fácilmente medible en la circulación en pacientes con enfermedades sistémicas y una gran variedad de estados inflamatorios y está presente en concentraciones suficientes para tener un impacto fisiológico sobre las respuestas del hospedero a inflamación sistémica.<sup>88</sup> De igual manera, la estimulación inapropiada de células T humanas tumor reactivas resulta en la producción de IL-10 endógena incrementada por estas células, lo que indica también un papel de IL-10 en la anergia específica en tumor. La anergia representa un estado de inactivación inmune caracterizado por respuestas de

citocinas proliferativas abolidas. Esto es generado activamente por eventos moleculares que pueden ser revertidos por ciertas citocinas.<sup>82</sup>



**Figura 7. Efectos inmunoregulatorios y estimuladores de IL-10.** Modificado de Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 557–69.<sup>89</sup>

## Receptor de IL-10

La señalización de IL-10 se dá a través de un complejo de dos receptores que consisten en dos copias del receptor 1 (IL-10R1) y IL-10R2.<sup>90</sup> El IL-10R1 se une a IL-10 con una afinidad alta y el reclutamiento de IL-10R2 al complejo del receptor hace una contribución marginal para la unión al ligando. El receptor funcional consiste en un heterodímero de IL-10R1 y IL-10R2 (figura 8).<sup>67</sup>

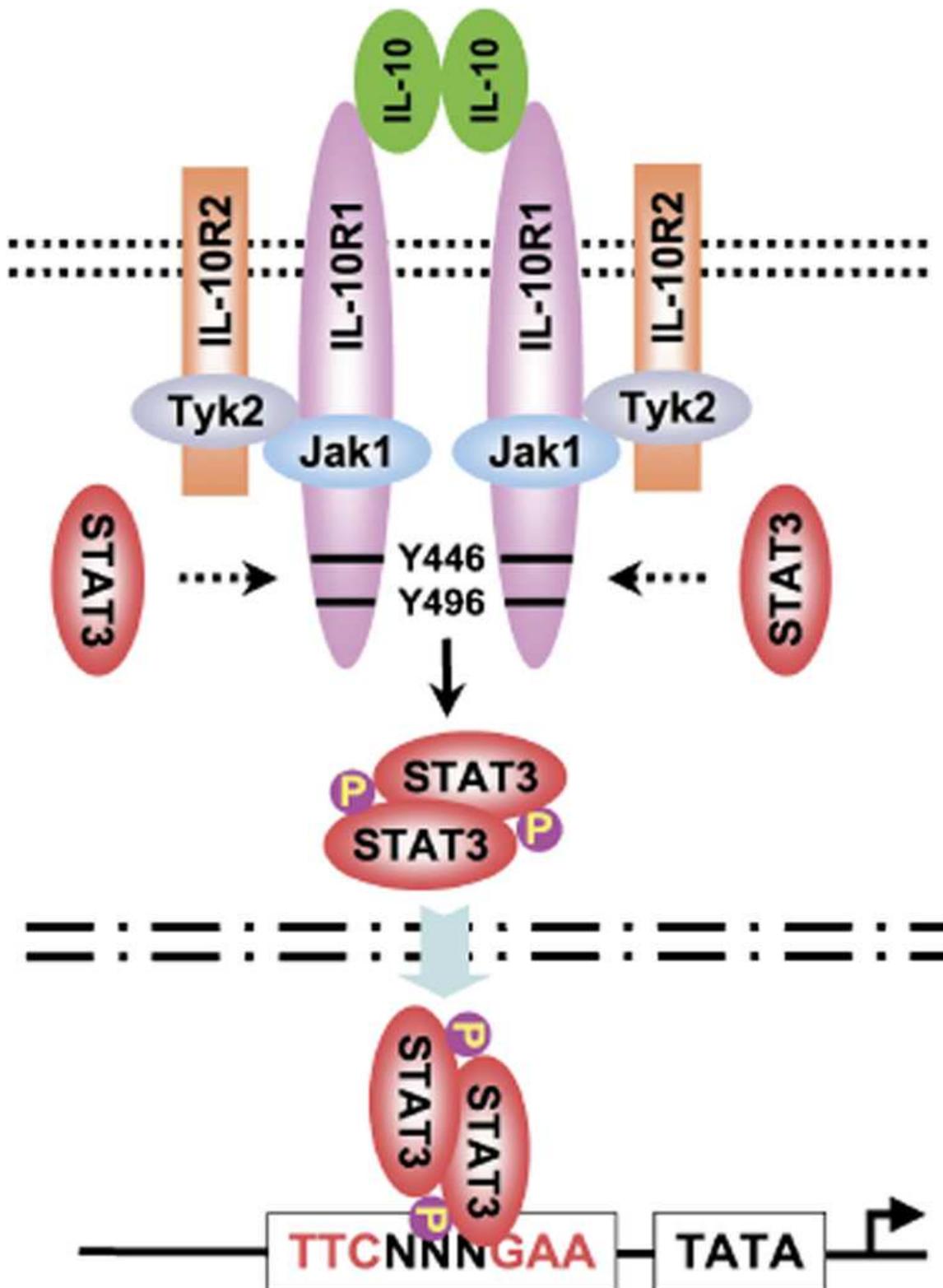


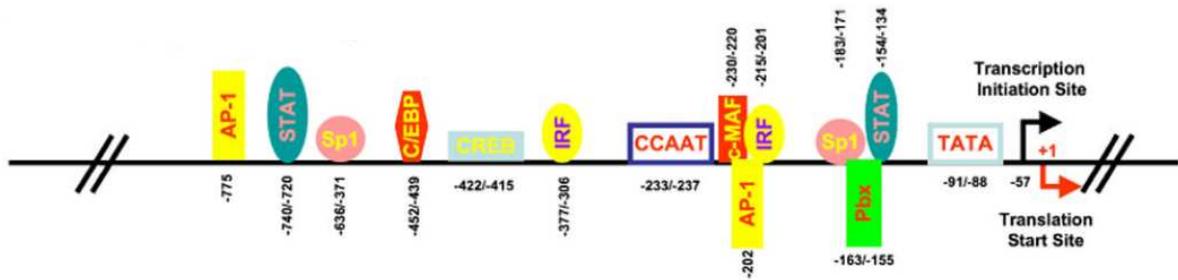
Figura 8. Receptor de IL-10 y una versión simplificada de la señalización de este receptor. Tomado de Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev 2008; 226: 205-218.<sup>67</sup>

Muchas células hematopoyéticas expresan constitutivamente niveles bajos de IL-10 y la expresión del receptor puede ser sub-regulada por varios estímulos. Las células no hematopoyéticas como los fibroblastos y las células epiteliales, pueden responder al estímulo por sub-regulación del receptor IL-10R1. El receptor IL-10R2 es expresado sobre muchas células, por lo tanto, varias células tienen la habilidad de unirse y consumir IL-10.<sup>67</sup> La unión de IL-10 al complejo del receptor activa las tirosin quinasas, JAK1 y Tyk2, asociadas con IL-10R1 y IL-10R2 respectivamente, para fosforilar la cola citoplasmática de los receptores. Esto resulta en el reclutamiento de STAT3 al IL-10R1. El sitio de reclutamiento de STAT3 es conservado entre el receptor humano y murino y es reconocido por otros receptores que reclutan STAT3 como gp130, IL20R1 e IL-22R1. La homodimerización de STAT3 resulta en la liberación del receptor y la translocación del homodímero de STAT dentro del núcleo, donde este se une a los elementos de unión a STAT en los promotores de varios genes.<sup>90</sup>

Uno de estos genes es IL-10, el cual es regulado positivamente por STAT3.<sup>91</sup> STAT3 también activa el supresor de señalización de citocinas 3 (SOCS3), el cual controla la cantidad y calidad de la activación de STAT3.<sup>92,93</sup> SOCS3 es inducido por IL-10 y ejerce efectos regulatorios negativos sobre varios genes de citocinas. EL IL-10R no tiene sitios de unión para SOCS, por lo tanto, no está sujeto a la regulación por SOCS3. La vía de fosfoinositolcinasasa (PI3K) es también activada por IL-10.<sup>94</sup> Aunque el papel de STAT3 y SOCS en la transducción de señal de IL-10 ha sido bien establecida,<sup>92</sup> el entendimiento de los mecanismos moleculares por los cuales IL-10 inhibe la respuesta inmune no se ha dilucidado totalmente. Una EpoR diseñada que activa STAT3 activa una respuesta anti-inflamatoria idéntica a IL-10, pero otros receptores que activa STAT3, tales como IL-6R no ejercen respuesta anti-inflamatoria. Estos hallazgos sugieren que la activación de STAT3 es requerida pero no suficiente para la actividad anti-inflamatoria de IL-10. La regulación diferencial de la señalización por proteínas SOCS puede contribuir a las diferencias entre IL-6R y IL-10R.<sup>92</sup>

## **Regulación transcripcional de IL-10**

IL-10 es producida por diferentes células inmunes y hay aspectos de la regulación génica que son conservados en ciertas células mientras otros mecanismos parecen ser tipo específicos. Los promotores para IL-10 en todas las células productoras de esta citocina son esencialmente los mismos, de tal manera que los factores de transcripción que inician la transcripción son conservados (figura 9).



**Figura 9. Elementos reguladores de la transcripción en el promotor de IL-10 humana.** Tomado de Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev 2008; 226: 205-218.<sup>67</sup>

En contraste a los factores de transcripción conservados, las vías de señalización que inducen IL-10, los cambios epigenéticos y las modificaciones post-transcripcionales son únicas generalmente para cada tipo celular. La caja TATA en el locus humano se encuentra entre 91 y 88 pb corriente arriba del primer codón de metionina y una caja CCAAT está localizada entre -233 y -237pb. Un sitio de inicio de la transcripción del gen IL-10 humano –ACA está localizado a 57pb de la primera ATG. La transcripción del gen de IL-10 ha sido estudiada en células T, células B, células NK, monocitos y macrófagos. Dentro de los factores de transcripción que se han encontrado que regulan positivamente la transcripción de IL-10 están: Sp1 y Sp3, STAT3, C/EBP $\beta$  y  $\delta$  (proteína de unión al enhancer CCATT  $\beta$  y  $\delta$ ), IRF-1 (factor 1 regulador de IFN), c-Maf (cmusculoaponeurótico fibrosarcoma), AP-1 (activador de la proteína-1), proteína CREB (elemento de respuesta a cAMP), y NF- $\kappa$ B (miembros de la familia que incluye heterodímeros que contienen p65 y homodímeros p50).<sup>67</sup>

**Sp1:** es uno de los principales factores de transcripción celulares que se identificaron en virtud de su habilidad para unirse a motivos ricos en G en el promotor temprano de SV-40. Los sitios de unión a Sp1 en el promotor de IL-10 consisten en seis bases (AGGAGG) y están localizados en la región promotora de IL-10 humana entre la región de -183pb a -171pb.<sup>95</sup> Cuando este elemento es reemplazado con GAATTC, la actividad del promotor de IL-10 es drásticamente disminuída. Un segundo sitio de unión a Sp1 en el promotor de IL-10 humana fue identificado entre -636 y -631pb (agacCCCGCctgc) y la actividad del promotor de IL-10 es abolida cuando un plásmido de expresión de una mutante Sp1 es introducido dentro de las células.<sup>96</sup>

**STATs:** son factores de transcripción citoplasmáticos que se translocan al núcleo para regular la expresión génica en respuesta a citocinas y factores de crecimiento. El sitio de unión canónico de STAT contiene la secuencia

TTCCNGGAA. En el gen de IL-10 humana, dos sitios de unión a STAT han sido reportados.<sup>97,98</sup> El primero está localizado entre -740 y -720pb (CCAAGCACagTTGGG). El segundo se encuentra en la región del promotor proximal entre -154 y -134pb (ATCCTGTgCCGGGAAACCTTG). El elemento de unión a STAT proximal interactúa con STAT3 y media la producción de IL-10 inducida por IFN- $\gamma$  en una línea celular B humana.<sup>99</sup> STAT4 también puede inducir la producción de IL-10 en células NK. STAT1 puede ejercer un papel regulador negativo en la expresión de IL-10 en monocitos.<sup>100</sup> Sin embargo, STAT1 y STAT3 son críticos para la expresión de IL-10 inducida por IL-27, STAT3 es esencial para la producción de IL-10 inducida por IL-6.<sup>101</sup>

**C/EBP:** pertenece a la familia de factores de transcripción de cierres de leucina que se unen al ADN como homodímeros o heterodímeros. La secuencia consenso es ATTGCGCAAT. En el promotor de IL-10 humana, el sitio putativo correspondiente de C/EBP se encuentra en la región de -452 a -439 (TTATTTCTCAATCC).<sup>67</sup>

**IRFs:** la familia de factores de transcripción IRF consisten en nueve miembros (IRF1, IRF2, IRF3, IRF4 (PIP, LSIRF, o ICSAT), IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (ICSBP), y IRF9 (ISGF3 $\alpha$ )). El dominio de unión al ADN (DBD) reconoce una secuencia de ADN correspondiente al elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE) (A/GNGAAANNNGAAACT). La región 5'-AANNNGAAA-3' es la secuencia consenso de reconocimiento de IRF. Un motivo putativo de IRF fue encontrado en la región promotora de IL-10 humana de -215 a -201pb relativo al codón de inicio de la transcripción. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que IRF-1 pero no IRF-2 se une al motivo IRF de IL-10 humana.<sup>102</sup>

**AP-1:** es un factor de transcripción heterodimérico compuesto de proteínas relacionadas al factor de transcripción activador (ATF) de c-Fos y c-Jun y la familia "partner" de dimerización de Jun (JDP). AP-1 reconoce una secuencia de ADN definida como un elemento de respuesta del activador del plasminógeno tisular (TPA) (TRE:5'-TGAG/CTCA-3'), vía un cierre de leucina. La asociación de la actividad AP-1 con la producción de IL-10 se ha demostrado en células T, en monocitos y macrófagos.<sup>103,104</sup> Un motivo de unión específico para AP-1 (5'-TGACTCA-3') fue identificado en la región no codificante que está a 1kb corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción de IL-10.<sup>105</sup> Este elemento es el motivo que se une a la proteína Jun/AP-1 y es responsable de la producción de IL-10 por células Th2.<sup>106</sup> Un sitio adicional AP-1 está localizado aproximadamente a 6.45kb, AP-1 se une en la ausencia del factor nuclear de células T activadas (NFAT).<sup>107</sup>

**CREB:** la proteína CREB se une al elemento de respuesta al AMPc (5'-TGAGC/CGTCA-3'). El promotor de IL-10 humana es responsable de la estimulación del AMPc en células THP-1 y macrófagos.<sup>108,109</sup> Cuatro elementos CREB putativos han sido identificados en la región promotora de IL-10 humana: CRE1 a -1272/-1265 bp (5'-TGA $\uparrow$ GTCA-3'), CRE2 a -1055/-1048 bp (5'-TGAC $\uparrow$ TC $\uparrow$ t-3'), CRE3 a -862/-855 bp (5'-TGA $\uparrow$ GTaA-3'), y CRE4 a -411/-404 bp (50-ccACGTCA-3'). La supresión de IL-10 mediada por IFN- $\gamma$  puede ser debida a los mecanismos mediados por CREB y AP-1.<sup>104,110</sup>

**c-Maf:** es el homólogo celular del oncogen viral aviar v-mal, el cual está relacionado con la familia Maf y los factores de transcripción de cierre de leucina. La secuencia de consenso Maf (MARE) ha sido definida como 5'-TGC(TGAG/CTCA) GCA-3' or 5'-TGC (TGAGC/CGTCA)GCA-3'. La secuencia palindrómica MARE contiene un elemento de respuesta TPA [TGA(G/C) TCA] o un elemento de respuesta al AMPc [TGA(GC/CG)TCA]. La primera es la secuencia de unión para las proteínas de la familia AP-1 (Jun/Fos), mientras la segunda es para las proteínas de la familia CREB/ATF. La secuencia MARE es flanqueada por una secuencia 5'-TGCMARE-GCA-3', la cual es la señal única del sitio de unión de las proteínas de la familia Maf. Un elemento de unión de Maf putativo se encuentra en la región -233/-200 pb: 5'-TCATTTTTGC(T $\uparrow$ ACgaT)GCA AAAATTGAAAATA-3'.<sup>111</sup> Una segunda secuencia de unión a Maf está en la región distal a -491/-512 [5'-TGACTGC(ctAAG $\uparrow$ TA) GCAAGGA-3']. El sitio Maf proximal en humanos contiene un elemento de respuesta TPA atípico, mientras el sitio distal contiene un elemento de respuesta al AMPc atípico. El sitio putativo proximal ha sido identificado como un elemento de unión a c-Maf para la producción de IL-10 inducida por lipopolisacáridos en macrófagos. Un tercer candidato posible, el cual está conservado en el gen de IL-10 humano, está en la región contigua al sitio de inicio de la transcripción en +2/+14 pb: 5'-TGC(acAGCTCA)GCA-3'. La secuencia contiene un elemento de respuesta al AMPc atípico. C-Maf fue originalmente identificado como un factor de transcripción Th2 que promueve la expresión de IL-4 y por lo tanto la diferenciación Th2. IL-4 puede aumentar la producción de IL-10 inducida por lipopolisacárido vía su actividad sobre c-Maf.<sup>111-113</sup>

**NF-kB:** cinco miembros de NF-kB de unión al ADN han sido identificados: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50, and p52. Todos ellos tienen un dominio de homología Rel (RHD) que permite la unión al ADN. La secuencia consenso de unión NF-kB es GGG <sup>A/A</sup>G/C <sup>T/C</sup>TT<sup>C</sup>/TCC. En un estudio hecho en monocitos derivados de macrófagos, la sobreexpresión de I $\kappa$ B $\alpha$ , un inhibidor de la translocación nuclear de p65 condujo a la reducción de heterodímeros formados entre p65 y otras proteínas NF-kB que tienen efecto sobre la producción de IL-10 mediada por

lipopolisacáridos.<sup>114</sup> A la fecha, se han reportado hallazgos controversiales en el papel de NF- $\kappa$ B en la expresión de IL-10.<sup>115</sup>

**Pbx1:** las homoproteínas Pbx (factor de transcripción de leucemia de células pre-B), son cofactores para la familia Hox de factores de transcripción que contienen un homodominio que contribuye al patrón corporal por promoción de la expresión de programas genéticos específicos. El Pbx1 es requerido para la hematopoyesis y para la organogénesis. Un sitio de unión a Pbx1 en el promotor de IL-10 humana ha sido localizado entre -106/-98 en relación con el sitio de inicio de la transcripción: 5'-TTGATTGTGT-3'. La secuencia consenso para un elemento de unión a Pbx es 5'-TGATTTAT-3'. La proteína 1 regulada por Pbx media la transcripción de IL-10 en macrófagos seguida por la interacción con células apoptóticas.<sup>116</sup>

De todos los factores de transcripción descritos anteriormente, la expresión de IL-10 es regulada principalmente por los factores de transcripción Sp1 y Sp3, los cuales se expresan constitutivamente y se unen a secuencias consenso ricas en G+C (cajas GC). Estos factores de transcripción pueden regular la expresión constitutiva de muchos genes "housekeeping" controlados por promotores ricos en G+C. Sin embargo, la secuencia de unión a estos factores de transcripción en el promotor de IL-10 no es la caja GC, es un elemento cis que contiene a la secuencia CCCTCCT en la parte central. Esto puede explicar como el gen de IL-10 puede continuamente ser transcrito cuando otras citocinas están inactivas.<sup>117</sup> A nivel posttranscripcional, se han identificado secuencias de ARNm desestabilizadoras (AUUUA con secuencias ricas en U) en las regiones 3' no traducidas del ARNm de IL-10 humana.<sup>118</sup> Esta combinación de expresión constitutiva y control fino a nivel posttranscripcional permite una respuesta homeostática rápida de IL-10 a la inflamación.

## **Polimorfismos Genéticos**

Las diferencias en la secuencia del ADN entre individuos de la misma especie es la característica que los hace biológicamente únicos. Estas diferencias producen alteraciones cualitativas y cuantitativas en la expresión génica e influyen en los procesos bioquímicos que confieren susceptibilidad o resistencia a enfermedades o respuestas adversas a fármacos. Las mutaciones son cambios estables y heredables en el material genético y la diversidad genética depende de la tasa de mutación de los genes, el tamaño e historia demográfica de la población, el tiempo en el cual se acumulan las mutaciones, la selección natural y la deriva génica.<sup>119</sup>

Desde el punto de vista de la teoría neutral de la evolución molecular, propuesta por Kimura, la tasa de mutación y la deriva génica son los elementos más importantes en la evolución molecular. Las mutaciones son neutras o deletéreas; las deletéreas son eliminadas rápidamente de la población porque sus poseedores tienen menos descendientes y por lo tanto no llegan a prosperar; mientras que las neutras, pueden acumularse o no dependiendo de la deriva génica y el azar. Por lo que es muy probable que las mutaciones neutras se vayan acumulando y conservando a través de las generaciones. De esta manera surgen los polimorfismos.<sup>119</sup>

El código genético de individuos no emparentados coincide en 99,9%. Los polimorfismos son lugares del ADN donde frecuentemente difieren las secuencias en distintos individuos (al menos en 1% de la población). Un individuo puede llevar diversas combinaciones de un determinado polimorfismo (dos copias de cada gen). El genotipo es la combinación de secuencias en las dos copias de un gen para un polimorfismo particular. Se pueden distinguir dos tipos de polimorfismos genéticos: los polimorfismos de repetición en tándem (VNTR, del inglés *variable number of tandem repeats*) y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphisms*). Existen dos tipos de polimorfismos de repetición, los VNTR-minisatélites y los VNTR-microsatélites.<sup>120</sup>

Los minisatélites son *loci* que corresponden a secuencias de ADN de unas pocas decenas de nucleótidos repetidas en tándem. El número de dichas repeticiones varía de cromosoma a cromosoma, por lo que cada *loci* puede presentar muchos alelos distintos (tantos como repeticiones). Los minisatélites presentan el inconveniente de no estar distribuidos en el genoma y por lo tanto sólo pueden ser usados en diagnóstico de un número muy reducido de enfermedades. Los microsatélites corresponden a la repetición en tándem de secuencias de entre 2 y 5 nucleótidos. Los microsatélites presentan dos características que los hacen ideales para su uso. En primer lugar, están distribuidos de forma casi homogénea por todo el genoma y, en segundo lugar, presentan un número elevado de alelos con frecuencias similares entre sí, de forma que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto es muy elevada. El genoma humano contiene al menos 30.000 microsatélites localizados en la eucromatina.<sup>120</sup>

Los polimorfismos genéticos más frecuentes son los SNPs, que son cambios de una un solo nucleótido en el código, aproximadamente 90% de los polimorfismos presentes en el genoma humano. Un SNP se define como el cambio en una posición en el ADN genómico, en el cual diferentes secuencias alternativas (alelos) existen en individuos normales en algunas poblaciones y cuya frecuencia con la que se presentan es de al menos 1% en la población. Estos pueden ser bi-,

tri o tetra-alélicos, aunque los más abundantes son los bialélicos. De esta manera los indels (inserciones y deleciones) no son formalmente considerados SNPs.<sup>121</sup> La frecuencia con la que se presentan los posibles SNPs (A,T,C,G) no es similar, casi dos terceras partes de ellos son de tipo C/T, esta frecuencia alta está relacionada probablemente, con la reacción de deaminación de 5-metilcitosina, que se sabe ocurre con frecuencia en dinucleótidos CpG.<sup>121</sup>

Actualmente se considera que existe 1 SNP cada 300 bases por lo que se plantea que existen alrededor de 10 millones de SNPs en el genoma humano. Se han identificado más de 10 millones de SNPs, los más comunes aparecen en 5% a 50% de la población. La mayoría de los humanos somos heterocigotos para más de 50.000 SNPs en nuestros genes, muchos de los cuales implican una alteración en la expresión génica o cambios en la estructura o función de sus productos (proteínas). Los SNPs pueden presentarse tanto en regiones codificadoras (exones) como en no-codificadoras (intrones y promotores) del genoma. Debido a que sólo 3% a 5% del ADN humano codifica para la producción de proteínas, la mayoría de los SNPs se encuentran fuera de las regiones codificadoras. La presencia de los SNPs puede tener diversos efectos dependiendo del tipo de secuencia donde se presente.<sup>120</sup> Cuando el SNP ocurre dentro de la región codificadora del gen, o exón, la probabilidad de que se altere la función biológica de la proteína es mayor, ya que el cambio de base puede traducirse en la sustitución de un aminoácido por otro dependiendo de la posición del codón que afecte (cambio no-sinónimo) y tener efectos estructurales y funcionales. A su vez, puede tener un efecto silencioso, es decir que el cambio en el nucleótido no genere cambio de aminoácido. Si dicho cambio en la secuencia no genera cambio en el aminoácido (cambio sinónimo), el contexto de la secuencia podría ser más favorecedor para que ocurran mutaciones.<sup>120</sup>

Con mayor frecuencia, los SNP ocurren en regiones del gen que no se traducen en proteína. Sin embargo, estos SNP también pueden tener efectos biológicos. Por ejemplo, un SNP en la región promotora de un gen (parte de un gen que contiene la información necesaria para activarlo o desactivarlo) puede alterar la afinidad por la unión con factores de transcripción, o alterar la actividad *enhancer* (potente intensificador de la expresión de un gen), lo que genera una variación de los niveles de transcripción del gen y produciéndose, como consecuencia, cambios en los niveles de proteína. Los SNP en las regiones 5'UTR y 3'UTR (regiones 5' y 3' del ARNm, no traducidas) pueden alterar la estabilidad del ARN mensajero (ARNm), y afectar su traducción a proteína.<sup>120</sup>

Parece menos probable que los SNP presentes en intrones (región no codificadora de un gen) también tengan un significado funcional. Aunque se hipotetiza que un

cambio en la secuencias intrónicas, podría generar alteraciones en los patrones de splicing y afectar la función proteica. Los SNP situados en intrones son los más frecuentes, seguidos de los que se producen en regiones promotoras, siendo los menos frecuentes los SNP que afectan a la secuencia de aminoácidos, lo que refleja una gran presión selectiva que limita los cambios en las proteínas.<sup>120</sup> Otro hecho importante es el desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*) que es el fenómeno por el que dos alelos en diferentes *loci* aparecen juntos más frecuentemente de lo que cabría esperar por probabilidad. En relación con las diferencias en las clases de cambio de base en el ADN, las transiciones (púrica-púrica/pirimidínica-pirimidínica) son más frecuentes que las transversiones (púrica-pirimidínica/pirimidínica-púrica). Además, los alelos G (guanina) y C (citosina) tienden a ser los alelos más frecuentes, mientras que A (adenina) y T (timina) son generalmente los alelos menores.<sup>122</sup>

Los SNPs representan una sola variante nucleotídica, sin embargo, no son heredados independientemente.<sup>123</sup> El hecho de que los SNPs cercanos en la secuencia de ADN de un gen tiendan a heredarse juntos (haplotipo) y que la mayoría de las regiones cromosómicas solo tiene unos cuantos haplotipos comunes, permite de forma práctica el análisis de éstos y de agrupaciones de SNPs (<http://hapmap.org>).<sup>124</sup> Las variantes polimórficas comunes interactúan con factores de exposición para causar cáncer. La correlación entre SNP-fenotipo puede ocurrir como resultado directo de la influencia de tales SNPs en la salud. Debido a su abundancia, diversidad y distribución, los SNPs son considerados marcadores genéticos ideales para identificar *loci* relacionados a enfermedades complejas como el cáncer por medio de ligamiento genético. Los SNPs son parte de los mecanismos de adaptación al entorno en la evolución humana y condicionan la diversidad poblacional, la individualidad, la susceptibilidad a ciertas enfermedades y asimismo la idiosincrasia en las respuestas a fármacos.

## **Análisis de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos**

Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también, pueden contribuir a causar enfermedades.<sup>123</sup> Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de «alta penetrancia», ya que los portadores de la variante suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad. En la actualidad la investigación en este campo se centra en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad (son los llamados polimorfismos de «baja

penetrancia»). También se les denomina variantes que confieren susceptibilidad genética a la enfermedad, y para que dicha variante genética se exprese a menudo es necesaria la participación de una exposición.<sup>125</sup> El análisis de los polimorfismos genéticos permite identificar genes que confieren susceptibilidad a presentar enfermedades. Y mientras estudios moleculares específicos pueden poner de manifiesto si los polimorfismos son funcionales, los estudios epidemiológicos son fundamentales para valorar si hay efectos en la salud de la población.<sup>126</sup> Cuando el objetivo de un estudio es identificar un polimorfismo o variante en un gen que esté relacionado con una enfermedad se pueden emplear diferentes estrategias.

En primer lugar, es importante obtener evidencia de que al menos una fracción de la enfermedad está determinada genéticamente. Para ello son útiles los estudios de agregación familiar, los de gemelos o los de emigrantes. En segundo lugar, hay que identificar dónde están los genes de interés para la enfermedad. En esta fase se realizan estudios denominados de ligamiento (*linkage*), que emplean como marcadores genéticos una serie de polimorfismos repartidos por todo el genoma. En estos estudios se suelen emplear familias grandes con varios miembros afectados y sus análisis permiten identificar zonas del genoma de interés, pero tienen poca resolución.<sup>127</sup>

Para identificar con mayor precisión los genes de interés y, de estos genes, el o los polimorfismos responsables, se emplean *estudios de asociación*, en los que se compara la frecuencia relativa de las diferentes variantes de una serie de polimorfismos entre los individuos afectados y un grupo control adecuado. Estos estudios seleccionan «genes candidatos» (aquellos cuya función puede estar relacionada con la enfermedad de interés), y de estos genes se busca como marcadores genéticos a determinados polimorfismos, normalmente de tipo SNP, repartidos a lo largo del gen.<sup>127</sup> En cuanto a la metodología de estudio, se suelen emplear diseños epidemiológicos clásicos basados en individuos no relacionados, como estudios de casos y controles o de cohortes. También se pueden emplear diseños basados en familias, en los que los individuos de control son parientes de los casos, como los diseños de casos y hermanos sanos o tríos (caso y padres).<sup>128</sup>

En enfermedades poligénicas como el cáncer, donde existe más de un gen que contribuye a la susceptibilidad y al pronóstico, se analiza un gen que pueda participar en la patogénesis de la enfermedad (gen candidato), cuya principal característica es que tenga importancia funcional. Posteriormente, se compara la frecuencia de aparición del genotipo polimórfico en una población de pacientes (casos) y de controles. La asociación entre el genotipo y el fenotipo se realiza mediante asociaciones estadísticas. En la selección de casos y controles se deben

considerar aspectos fundamentales, como los criterios diagnósticos adecuados y estrictos de la enfermedad que se está investigando y la selección de casos y controles dentro del mismo grupo étnico.<sup>129</sup>

### **Análisis descriptivo de un polimorfismo**

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina *locus*. A cada posible variante se le denomina alelo. Si se trata de un SNP, normalmente serán dos los posibles alelos en un *locus*. La pareja de alelos observada en un individuo se denomina genotipo y, para el *locus* T > C del ejemplo, las tres posibilidades de parejas de alelos son: TT, TC y CC. Los individuos con los dos alelos idénticos, sean TT o CC, se denominan homocigotos y los que tienen diferentes alelos (TC), heterocigotos. En general se considera variante al alelo menos frecuente, pero esto puede diferir de una población a otra.<sup>127</sup> La descripción estadística de un polimorfismo consiste, en primer lugar, en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y de cada genotipo posible (estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente). En general, las técnicas de laboratorio permiten determinar el genotipo de cada individuo. Las frecuencias genotípicas, por tanto, se estiman directamente calculando la proporción de individuos con cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con dos cromosomas) y se calcula la proporción de cada alelo.<sup>127</sup>

### **Equilibrio de Hardy-Weinberg**

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. Las frecuencias esperadas se pueden comparar con las observadas utilizando el test de la  $\chi^2$  HW =  $\sum (O-E)^2/E$ , con 1 grado de libertad. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo.<sup>127</sup>

Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles (como representantes de la población general). En el caso de que se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación, pues en

ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otros. Otras posibilidades son que los individuos no sean independientes (por ej., por consanguinidad) o que se dé una selección de un alelo (verbigracia., por estar asociado con la longevidad). Si se emplea un nivel de significancia de 5%, por azar puede observarse falta de ajuste a lo esperado, aunque la condición de transmisión de alelos con independencia sea correcta en la población del estudio. En la muestra de casos es posible que no se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg; ello puede ser indicativo de que el polimorfismo pueda estar asociado con la enfermedad.<sup>127</sup>

### **Análisis de asociación de un polimorfismo con la enfermedad**

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye la tabla de contingencia correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación mediante un test de la  $\chi^2$ .<sup>127</sup> También se pueden calcular las *odds ratios* (OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación. Los modelos de regresión logística permiten ajustar los análisis por posibles variables de confusión y evaluar fácilmente si hay interacciones entre el polimorfismo y otros factores. Si se denomina  $p$  a la probabilidad de ser caso,  $G$  al polimorfismo (que codificará los diferentes genotipos: TT, TC, CC) y  $Z$  a una o más variables por las que se desea ajustar el modelo. El modelo logístico se define por la ecuación:  $\log [p/(1-p)] = \alpha + \beta G + \gamma Z$ , donde  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son parámetros estimados. Si el polimorfismo  $G$  es un SNP en el que el alelo variante  $C$  modifica el riesgo de la enfermedad de interés, ya que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias de  $C$ , lo que permite definir varios modelos de herencia posibles cuya verosimilitud se puede explorar mediante la adecuada codificación de los genotipos.<sup>127</sup>

Los cuatro modelos principales de herencia posibles son: a) Modelo dominante, que supone que una única copia de  $C$  es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos  $TC$  y homocigotos  $CC$  tienen el mismo riesgo. b) Modelo recesivo, supone que son necesarias dos copias de  $C$  para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos  $TC$  y homocigotos del alelo más frecuente  $TT$  tienen el mismo riesgo. c) Modelo aditivo, supone que cada copia de  $C$  modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala logit); por tanto, los homocigotos  $CC$  tienen el doble de riesgo que los heterocigotos  $TC$ . Se compara la combinación ponderada, donde se da peso uno a los heterocigotos  $TC$  y peso dos a los homocigotos. d) Modelo codominante, es

el más general. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos (He) y homocigotos variantes (Va) por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente. Para hallar un criterio para establecer el modelo de herencia más adecuado para un polimorfismo concreto, se suele comparar el ajuste del modelo codominante, que es el más general (dos parámetros), con los demás modelos (un parámetro). Estas comparaciones pueden realizarse mediante el test de la razón de verosimilitudes.<sup>127</sup>

Los modelos de interacción añaden un término producto entre el genotipo y una variable que puede potenciar o inhibir el efecto del genotipo. También pueden incluir el producto de dos genotipos si se exploran interacciones gen-gen. A partir de los coeficientes  $\beta$  y  $\delta$  de los modelos se puede calcular las OR de asociación entre cada genotipo y la enfermedad y los correspondientes intervalos de confianza de 95%. Se puede analizar el riesgo al comparar la distribución de alelos entre casos y controles. Para ello, cada individuo contribuye con dos observaciones en la muestra, una por cada cromosoma, y se compara el riesgo del alelo variante respecto al más frecuente. Este análisis sólo es correcto en el caso de que la distribución de los alelos sea independiente en la población (equilibrio de Hardy-Weinberg en controles).<sup>127</sup>

### **Análisis simultáneo de múltiples *loci***

Con frecuencia son varios los polimorfismos que se analizan simultáneamente en un gen o región candidata de un gen. El motivo es que el polimorfismo realmente responsable de influir o modificar el riesgo de la enfermedad puede ser desconocido; por ello se analizan varios polimorfismos para intentar identificarlo. Entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma y relativamente próximos entre sí suele observarse cierto grado de correlación o asociación estadística denominada desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*). Ello es debido a que en el proceso de meiosis que genera los gametos, los cromosomas que se transmitirán serán copias exactas a las del progenitor, a excepción de los entrecruzamientos que generan recombinación. Es decir, cada cromosoma transmitido a la descendencia estará formado por una composición de fragmentos largos que son una copia exacta de los del progenitor, pero se combinan partes del cromosoma paterno y del materno. La frecuencia de entrecruzamientos por cromosoma es pequeña, de 1 a 4, y depende de su tamaño. La probabilidad de que entre dos *loci* cercanos se dé una recombinación es baja y, por ello, se observa el desequilibrio de ligamiento, que tiende a disminuir en sucesivas generaciones hasta llegar al equilibrio (independencia estadística).<sup>127</sup>

El desequilibrio de ligamiento es muy útil, pues permite localizar polimorfismos relacionados con la enfermedad. Si aparece una mutación que genera un polimorfismo responsable de la enfermedad, es posible que otros polimorfismos cercanos también estén asociados con ella. De hecho, como lo que se transmite de padres y madres a sus hijos son cromosomas, suele ser interesante identificar el conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente en cada cromosoma, de manera que sea más fácil así identificar el polimorfismo causal. A este conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente se le denomina haplotipo. Un individuo, para un conjunto de *loci* cercanos, posee dos haplotipos, cada uno en un cromosoma.<sup>127</sup>

### **Análisis descriptivo de haplotipos**

Para estimar la frecuencia de los haplotipos hay varias posibilidades: a) Métodos basados en reglas, consisten en observar la distribución de alelos en los haplotipos que no presentan incertidumbre e imputar los casos con incertidumbre a aquellas combinaciones observadas con más frecuencia. El principal inconveniente de este método es que la solución puede no ser única en función de cómo se inicie el algoritmo. b) Estimación estadística mediante el algoritmo esperanza-maximización (EM), este es un método estadístico genérico, para tratar variables no observadas (en este caso, la proporción de individuos con cada posible haplotipo en caso de incertidumbre). El algoritmo itera repetidamente entre dos pasos hasta conseguir convergencia. En primer lugar, se usan unas frecuencias iniciales, no necesariamente correctas, para cada posible haplotipo. En el supuesto de que esas frecuencias fuesen correctas, y asumiendo que hay equilibrio de Hardy-Weinberg, se podría calcular la frecuencia esperada de cada combinación de genotipos con incertidumbre. Con las frecuencias de cada combinación de genotipos se pueden obtener las frecuencias de cada haplotipo maximizando la función de verosimilitud de los haplotipos. Este paso consiste en contar los haplotipos compatibles con cada combinación de genotipos. El algoritmo converge a valores estables de frecuencia de combinaciones de genotipos con incertidumbre y de frecuencia de haplotipos. Para los individuos con incertidumbre, a cada pareja de haplotipos posible se le puede calcular una probabilidad. Una limitación de este método es que no proporciona directamente varianzas de las estimaciones y, si se analizan simultáneamente muchos polimorfismos (más de 20) con un alto grado de incertidumbre, pueden obtenerse soluciones incorrectas, pues el algoritmo puede tender hacia un máximo local. En estas situaciones es importante repetir el algoritmo empleando diferentes valores iniciales de las frecuencias de haplotipos. c) Estimación estadística mediante métodos Montecarlo basados en cadenas de Markov (MCMC). Se trata de una aproximación bayesiana al problema que ha permitido mejorar los resultados en

caso de analizar muchos polimorfismos.<sup>130</sup> Este método proporciona como información adicional una muestra aleatoria de la distribución a posteriori de la frecuencia de cada haplotipo, que puede ser empleada para calcular la varianza, además del valor esperado. De esta manera podemos conocer directamente la precisión de la estimación de la frecuencia de cada haplotipo.

### **Análisis de la asociación de los haplotipos con la enfermedad**

Cualquiera de los métodos anteriores permite identificar o estimar, para cada individuo, la pareja de haplotipos que posee en función de los genotipos. Estos haplotipos pueden analizarse en relación con la enfermedad mediante modelos de regresión logística. Normalmente se realiza un análisis de cromosomas y no de individuos, es decir, se duplica la muestra, de manera que cada individuo contribuye con dos observaciones, una para cada haplotipo, y se compara el riesgo asociado con los diversos haplotipos entre sí, tomando como referencia el más frecuente. Este análisis es más sencillo de analizar e interpretar que el de parejas de haplotipos y no requiere la realización de ajustes, pues los haplotipos se heredan de manera independiente.<sup>130</sup> En caso de incertidumbre por múltiples heterocigotos o valores perdidos, los métodos basados en el algoritmo EM o MCMC proporcionan una lista de parejas de haplotipos compatibles, cada una con una probabilidad de aparición asociada. Entonces, estos individuos contribuyen en los datos con más de dos observaciones y se emplean las probabilidades de aparición de cada haplotipo como pesos en el modelo de regresión logística. El análisis combinado de genotipos y haplotipos suele ser más informativo que cualquiera de los dos aislados, aunque hay cierta discusión sobre qué análisis es preferible en cada situación.<sup>131</sup>

### **Métodos básicos para el estudio de polimorfismos genéticos**

Los SNPs pueden ser genotipados mediante la técnica de polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP del inglés, *restriction fragment length polymorphism*), mediante extensión del cebador, técnica que mide la capacidad del ADN polimerasa para extender un oligonucleótido a través de un sitio polimórfico en la presencia de nucleótidos que sólo permiten la extensión de una de las variantes. Esta técnica se basa en que el cambio de un nucleótido altera la diana para una determinada enzima de restricción (ER) con lo que se puede detectar el polimorfismo en función de la variación que éste genera en el patrón de restricción. Para ello se amplifica el ADN con sondas específicas mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), se somete a restricción enzimática y posteriormente se realiza una electroforesis. Los polimorfismos de repetición pueden ser genotipados mediante PCR, utilizando como cebadores

oligonucleótidos que flanquean a la región que contiene la repetición. De cada individuo se amplifican fragmentos de ADN que difieren entre sí por el número de repeticiones. El resultado de la amplificación se fracciona en un gel de acrilamida para determinar el genotipo de cada individuo.<sup>132</sup>

La tecnología de la PCR en tiempo real, combina el método de amplificación desarrollado por Mullis (PCR) con la utilización de moléculas de fluorocromo para poder monitorizar de manera secuencial y de manera cuantificable el proceso de amplificación de un segmento específico de ADN de interés. Esta técnica es aplicable en distintos campos de la biología molecular, y actualmente se usa tanto para la cuantificación absoluta o relativa de ARN (expresión génica) como para determinar SNP's. La amplificación para la genotipificación (discriminación alélica), se basa en el ensayo de la 5'-nucleasa por la técnica de PCR, en combinación con sondas TaqMan fluorogénicas.<sup>133</sup> Entre los métodos empleados para la detección de polimorfismos genéticos, la secuenciación ha sido utilizada como estándar de oro. Esta técnica generalmente se realiza en productos de más de 100 pares de bases, lo cual hace que esta técnica sea costosa y complicada en su proceso. La secuenciación del ADN ha sido la técnica más exacta y que ha proporcionado mayor información a pesar de su empleo limitado en diagnóstico. La limitación se ha debido principalmente a la complejidad del empleo de estas técnicas. En la actualidad se dispone de métodos basados en la secuenciación o mini-secuenciación de un iniciador adyacente al sitio del SNP, tal como el método de pirosecuenciación.<sup>133</sup>

## **Polimorfismos y cáncer cervicouterino**

El cáncer es una enfermedad compleja, resultado de múltiples interacciones genéticas y ambientales. En este sentido, los polimorfismos, no se consideran directamente como causa de enfermedad como las mutaciones, pero en combinación con factores ambientales, tienen efectos en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades como el cáncer. Dentro de los factores inmunogenéticos asociados a CaCU, algunos estudios han documentado el papel de las variaciones de los genes del HLA, de la proteína p53 y de algunos genes de citocinas. Hildesheim y colaboradores, realizaron una revisión de los principales estudios y concluyen que los más consistentes reportan que las mujeres que presentan los alelos DRB1\*13 y/o DRB1\*0603 están protegidas contra CaCU con una RM de 0.3-0.4. En relación con los alelos DQB1\*03 se encontró que existe evidencia de aumento en el riesgo de CaCU en quienes presentan dichos alelos, aunque sólo 41% del total de estudios revisados esta evidencia es estadísticamente significativa.<sup>134</sup> En el caso de alelos DRB1\*1501 y DRB1\*0602,

Apple y colaboradores, reportaron un aumento en el riesgo (RM=2.9) con la presencia de dichos alelos.<sup>135</sup> Sin embargo, otros estudios no encontraron una asociación significativa entre la presencia de alelos DRB1\*1501 y DRB1\*0602 y CaCU.<sup>136-138</sup> Un estudio de casos de CaCU VPH-16 positivos y controles realizado en población Mexicana, reportó resultados consistentes de asociación entre el HLA-DRB1\*15 (OR, 3.9; 95% CI, 1.6-10.2) y el haplotipo DRB1\*15 DQB1\*0602 (OR, 4.1; 95% CI, 1.4-12.7) en CaCU comparado con el grupo control. Los haplotipos HLA-A2-B44-DR4-DQ\*0302, HLA-A24-B35-DR16-DQ\*0301 y HLA-A2-B40-DR4-DQ\*0302 mostraron una asociación positiva con CaCU (OR >1) mientras HLA-A2-B39-DR4-DQ\*0302, HLA-A24-B35-DR4-DQ\*0302 y HLA-A68-B40-DR4-DQ\*0302 mostraron una asociación negativa (OR<1), por lo que los haplotipos de HLA clase I y II pueden estar asociados con la susceptibilidad a CaCU.<sup>139</sup> Madrid-Marina y colaboradores, de igual forma reportaron en población mexicana una asociación fuerte del HLA-DQ3 en CaCU VPH 16 positivo.<sup>140</sup>

Recientemente nuestro grupo de investigación reportó, la asociación de un SNP en el codón 1119 del gen AKNA, un factor de transcripción involucrado en la maduración de linfocitos T y B, e inducción transcripcional de las moléculas co-estimuladoras, con CaCU. Este polimorfismo produce un cambio biológicamente relevante del aminoácido R por Q en el dominio AT-hook del sitio de unión al ADN.<sup>141</sup> Existen estudios que describen un fenotipo característico (SNP, del gen que codifica para p53), que predispone para el desarrollo de carcinomas en pacientes infectadas con VPH. Las pacientes que lo presentan son homocigotas para el alelo Arginina en el codón 72 y tienen siete veces más probabilidad de desarrollar CaCU que los homocigotos de Prolina en el mismo codón 72.<sup>142,143</sup> El polimorfismo -308 G/T en la región promotora del gen TNF-alpha ha sido estudio en varios tipos de cáncer. Si se presenta la transición G/T ocurre un incremento de transcripción de 6 a 9 veces. El fenotipo de baja transcripción (GG) se ha encontrado con mayor frecuencia en mujeres con lesiones precursoras del cérvix uterino, en comparación con mujeres sin neoplasia.<sup>144</sup> Un estudio en población Mexicana evaluó la asociación del polimorfismo CYP1A1 (Msp1 y exón 7) en CaCU y reportó un incremento en el riesgo de CaCU en portadores de los genotipos T/C y C/C comparado con el genotipo T/T, aumentando este riesgo al considerar el hábito de fumar.<sup>145</sup>

## **Polimorfismos en citocinas anti-inflamatorias**

En años recientes, muchos SNP's y un número limitado de polimorfismos microsatélite han sido detectados dentro de secuencias de genes de citocinas, particularmente dentro de las regiones promotoras de estos genes.<sup>146</sup> La IL-10

junto con la IL-4 son las citocinas anti-inflamatorias más potentes. La IL-10 es sintetizada por los linfocitos Th2 e inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte del monocito/macrófago. Algunos estudios han relacionado polimorfismos del promotor de IL-10 y enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico y el asma. Existen revisiones en la literatura que consideran los polimorfismos de citocinas, relacionados con la expresión génica y su asociación a enfermedades.<sup>147,148</sup>

Howell M y colaboradores, realizaron una revisión de 22 estudios en 13 tipos de cáncer, donde se evaluaron asociaciones entre haplotipos de IL-10 y la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad o su progresión. De los 13 tipos de cáncer analizados, por cada neoplasia se exploraron como máximo tres estudios en un número amplio de poblaciones humanas y grupos étnicos. De los resultados de 22 se encontraron en 17 estudios, asociaciones positivas entre el genotipo o el haplotipo de IL-10 y la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad o su progresión. En algunos cánceres, genotipos asociados con una expresión baja de IL-10, fueron un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad o favorecer su progresión (melanoma maligno cutáneo, cáncer de próstata, cáncer gástrico no cardíaco y carcinoma celular renal), mientras en otros, genotipos asociados con expresión alta de IL-10, fueron considerados un factor de riesgo (CaCU, cáncer gástrico cardíaco, carcinoma hepatocelular posterior a infección por el virus de la hepatitis B, carcinoma celular escamoso de la piel y mieloma múltiple). Debido a las propiedades inmunosupresoras de IL-10 como promotor del cáncer y anti-angiogénicas como inhibidor del cáncer, los polimorfismos de este gen se han asociado tanto con susceptibilidad a cáncer como con el desarrollo de tumores.<sup>146</sup>

Estudios previos han hipotetizado que la herencia de dos polimorfismos en los codones 10 y 25 del gen TGF- $\beta$ 1, puede influir en el desarrollo de CaCU invasivo. Aunque no se ha encontrado una asociación significativa entre los alelos y el grado histológico de diferenciación del cáncer, por lo que el rol del TGF- $\beta$ 1 en la oncogénesis cervical no está relacionado con mutaciones puntuales en los codones 10 y 25 del gen TGF- $\beta$ 1.<sup>149</sup>

### **III. Planteamiento del problema**

El CaCU en América Latina es la segunda causa tanto de incidencia (29.2%) como de mortalidad (13.6%) por cáncer luego de cáncer de mama. Representa un problema de salud pública en México dada su tasa de incidencia (40.5 /100.000 habitantes) y su tasa de mortalidad (14.3 /100.000 habitantes).<sup>7</sup> La población de mujeres más afectada es en su mayoría de clases socioeconómicas marginadas

donde el estilo de vida y diversos factores ambientales favorecen la persistencia de infección por el VPH y el desarrollo posterior de CaCU.<sup>1</sup>

Existe la evidencia de un mecanismo de evasión de la respuesta inmune en pacientes con infección persistente por VPH y de una probable predisposición genética a producir niveles altos de citocinas inmunosupresoras como la IL-10 que inducen supresión de la respuesta inmune celular.<sup>79</sup> Bermúdez y colaboradores, identificaron que en la región promotora del gen de la IL-10, existe un elemento regulador que puede ser reconocido por la proteína E2 de VPH. Se demostró que la proteína E2 se une a esta región reguladora de la IL-10, induce la actividad promotora y la expresión de la IL-10 en células epiteliales.<sup>150</sup> De tal manera, que las proteínas del VPH pueden inducir la expresión de IL-10 y en consecuencia el estado de inmunosupresión en pacientes infectados con VPH-AR. Adicionalmente, se encontró que en la región reguladora de esta citocina (-4168) existe un SNP, que potencialmente pueda proporcionar mayor afinidad a la proteína E2, y aumentar la expresión de la IL-10. La identificación de polimorfismos en la región reguladora de IL-10, que puedan estar asociados con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado y CaCU, permitirá identificar mujeres con mayor susceptibilidad al desarrollo de lesiones premalignas y CaCU.

Para abordar la génesis de esta enfermedad, es necesario investigar de qué manera los factores de riesgo presentes en el medio ambiente interactúan con la constitución genética de la población de estudio. Se requiere de información que permita conocer el nivel de susceptibilidad genética de la población de estudio frente a la infección por el VPH persistente y el desarrollo posterior de CaCU. De tal manera que se pueda desarrollar un sistema de detección de la población susceptible, a la cual se debe intervenir para disminuir los índices de morbilidad y mortalidad por esta enfermedad. La predisposición genética al cáncer implica que un gran número de personas tengan un riesgo mayor a consecuencia de su historia familiar y/o personal. Los estudios epidemiológicos, clínicos y genéticos brindan información, que permite establecer líneas de conducta para reducir la morbilidad y mortalidad, realizar diagnósticos precoces (fase preclínica) y lo fundamental que es trabajar con grupos de alto riesgo en materia de prevención primaria.

#### **IV. Justificación**

Durante el desarrollo del CaCU, se ha demostrado la generación de un microambiente tumoral de inmunosupresión que contribuye a la progresión del CaCU.<sup>57</sup> Este estado de inmunosupresión se manifiesta por la disminución de citocinas que inducen actividad anti-tumoral (Th1) y la reducción o pérdida de moléculas del CMH clase I, lo cual produce deficiente presentación de antígenos a los CTL's. Así, la progresión del tumor está asociada a la presencia a nivel local de citocinas inmunosupresoras, en especial IL-10.<sup>79</sup> Entre los factores inmunogenéticos con los que se ha relacionado el desarrollo de CaCU, están polimorfismos de los genes que participan en la respuesta inmune celular. Esta respuesta se encuentra disminuida por citocinas inmunosupresoras como la IL-10. Algunos polimorfismos del gen de IL-10, han sido asociados con niveles altos de expresión de esta citocina y considerados como factores de riesgo. Sin embargo, se requieren de estudios adicionales, para confirmar los hallazgos previos y ampliar el análisis detallado de genotipos/haplotipos y su asociación como factores de riesgo y/o pronóstico para lesiones premalignas de cuello uterino y CaCU (figura 10).

A pesar de la existencia del Programa Nacional de Detección Oportuna de Cáncer y de que se han introducido en México dos vacunas profilácticas, ambas muy efectivas; el costo de las mismas es muy alto y muy difícil de pagar por las poblaciones en riesgo.<sup>151</sup> No obstante, el CaCU sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública del país. Dada la alta incidencia de CaCU en México, la identificación temprana de mujeres con mayor susceptibilidad al desarrollo de lesiones premalignas de bajo y alto grado y subsecuentemente CaCU, aportará nuevas evidencias que permitirán identificar a quienes dirigir los programas de prevención.

#### **V. Preguntas de investigación**

- ¿Cuáles son las variantes polimórficas encontradas en la región reguladora del gen de IL-10 en mujeres con LEI y CaCU?
- ¿Existe asociación entre las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 analizados con LEI ajustando por el grado de oncogenicidad del VPH y con CaCU?
- ¿Existe asociación entre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 en sangre periférica y a nivel de cérvix con LEI ajustando por el grado de oncogenicidad del VPH y con CaCU?
- ¿Existe asociación entre el nivel de proteína de IIL-10 a nivel sérico con LEI ajustando por el grado de oncogenicidad del VPH y con CaCU?

- ¿Existe interacción entre las frecuencias genóticas de los polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 analizados con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 en sangre periférica en LEI y en CaCu?
- ¿Existe interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 en sangre periférica en LEI y en CaCu?
- ¿Cuál es la carga de alelos de riesgo en LEI y en CaCu?

## V. Marco conceptual

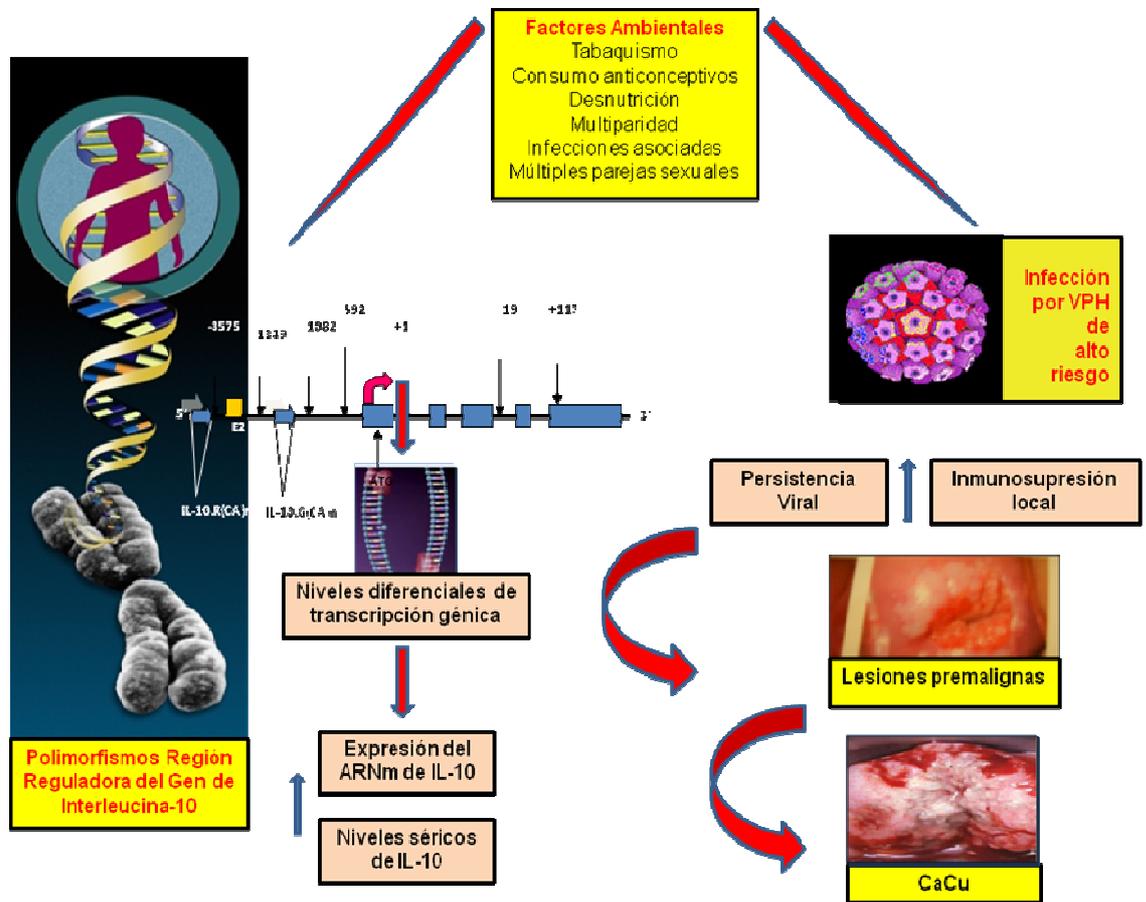


Figura 10. Marco conceptual de la investigación.

## **VII. Hipótesis**

Los polimorfismos en la región reguladora del gen de IL-10 se asocian con lesiones escamosas intraepiteliales y cáncer cervicouterino en la población mexicana.

## **VIII. Objetivos Generales**

- Evaluar la asociación entre polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 en mujeres mexicanas con la presencia de lesiones premalignas en cuello uterino y CaCU.
- Evaluar el nivel de expresión del ARNm del gen de IL-10 a nivel sistémico y a nivel local en mujeres mexicanas con lesiones premalignas en cuello uterino y CaCU.

## **IX. Objetivos Particulares**

- Describir las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos identificados en la región reguladora del gen de IL-10, en mujeres con LEI y CaCU.
- Analizar las concentraciones séricas de IL-10 y el nivel de expresión del ARNm del gen de IL-10, a nivel sistémico y a nivel del cérvix en la población de estudio.
- Evaluar la asociación entre las frecuencias genotípicas de los polimorfismos -592, -819, -1082, -1352 de la región reguladora del gen de IL-10, con LEI ajustando por el grado de oncogenicidad del VPH y con CaCU.
- Evaluar la asociación entre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 en sangre periférica y a nivel de cérvix, con LEI ajustando por el grado de oncogenicidad del VPH y con CaCU.
- Evaluar la asociación entre el nivel de proteína de IIL-10 a nivel sérico, con LEI ajustando por el grado de oncogenicidad del VPH y con CaCU.
- Determinar si existe interacción entre las frecuencias genotípicas de los polimorfismos -592, -819, -1082, -1352 de la región reguladora del gen de IL-10, con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 en sangre periférica en en LEI y en CaCU.
- Determinar si existe interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 en sangre periférica en LEI y en CaCU.
- Determinar la asociación de la carga de alelos de riesgo de los polimorfismos -592, -819, -1082, -1352 con LEI y CaCU.

## **X. Metodología**

Esta investigación fue un estudio de asociación en el que se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes polimórficas en la región reguladora del gen de IL-10 mediante un barrido genómico y discriminación alélica y su asociación con la presencia de lesiones premalignas en cérvix y CaCU.

### **Diseño del Estudio**

La presente investigación incluyó tres estudios:

- a. Un estudio transversal en el que se invitaron a participar a mujeres que acudieron a consulta ginecológica al Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos (CAPASAM), durante el periodo comprendido entre junio 2008 a Noviembre 2010.
- b. Un estudio transversal en el que se invitaron a participar a mujeres que acudieron a consulta ginecológica al Servicio de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), durante el periodo comprendido entre septiembre a diciembre de 2010.
- c. Un estudio transversal que incluyó tanto los casos del CAPASAM como los del INCan en el que se evaluó la expresión del ARNm de IL-10 tanto a nivel sistémico como en cérvix y el nivel sérico de proteína de IL-10.

A las pacientes que aceptaron participar en el estudio mediante la firma de la carta de consentimiento (Anexo 1), se les solicitó lo siguiente: responder a un cuestionario que realizó el profesional encargado de toma de muestra, permitir la toma de muestra de muestra sanguínea por el profesional especializado encargado y la toma de muestra de exudado de cérvix en mujeres sin lesión en cuello uterino y biopsia en el caso de lesiones premalignas en cuello uterino y CaCU, por el ginecólogo colposcopista.

### **Procedimiento de llenado de Cuestionario y captura de datos**

El profesional encargado de toma de muestra luego de tener el consentimiento firmado por el participante, realizó un cuestionario de 42 preguntas estandarizado y previamente validado sobre características demográficas, antecedentes gineco-obstétricos, actividad sexual y características socioeconómicas (Anexo 2). Para evaluar el nivel socioeconómico se construyó un índice que incluyó las siguientes variables: número de contribuyentes al ingreso familiar; situación de la vivienda; materiales de construcción de la vivienda en piso, techo y muros de la vivienda;

disponibilidad de cocina y de agua entubada; tratamiento del agua de consumo; forma de eliminación de excretas; disponibilidad de luz eléctrica y número de focos en la vivienda. El índice construido tuvo una buena confiabilidad ( $\alpha$  de Cronbach= 0.80) y permitió clasificar a los participantes en dos niveles: bajo y medio. La información descrita en el cuestionario fue capturada por el investigador encargado y se generó la base de datos del estudio. El software utilizado fue Stata 9.2 (StataCorp, Collage Station, TX, EUA).

### **Procedimiento Toma de Muestra**

A cada participante se le tomó muestra sanguínea con material nuevo y estéril (6ml con anticoagulante-EDTA y 5ml sin anticoagulante). De la muestra de sangre anti-coagulada se realizó el aislamiento de linfocitos, extracción de ADN y ARN y posterior análisis de los polimorfismos de IL-10 y expresión de ARNm. De la muestra de sangre sin anti-coagular se extrajo suero y se analizó el nivel de la proteína de IL-10. La muestra de exudado de cérvix (citobrush) y biopsia según haya sido el caso, fue tomada por el ginecólogo colposcopista y colocada en un tubo con buffer de fosfatos (PBS 1X) para realizar posteriormente la prueba de detección del VPH por PCR y extracción de ARN para el análisis de expresión de IL-10 en cérvix. El diagnóstico colposcópico, citológico e histopatológico de cada participante fue proporcionado por la Unidad de Patología del CAPASAM e INCan.

### **Procedimiento Transporte y almacenamiento de muestras**

Las muestras fueron transportadas a  $-4^{\circ}\text{C}$  al laboratorio 4 planta baja del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública para su procesamiento. A partir de la muestra sanguínea con anticoagulante se realizó el aislamiento de linfocitos, se dejaron dos alícuotas, una resuspendida en PBS para la extracción de ADN y otra en trizol para la extracción de ARN. Ambas alícuotas se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A partir de la muestra sanguínea sin anticoagulante se realizó la extracción de suero. Se almacenaron dos alícuotas de suero a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las muestras de exudado de cérvix y biopsias se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Los bancos de muestras se ubicaron en refrigeradores de propiedad del laboratorio 4 planta baja del CISEI y el manejo de los mismos fue responsabilidad de los investigadores del proyecto.

## **Selección de la Población de estudio:**

### **Criterios de inclusión:**

- Mujer que acudió a consulta a CAPASAM durante el periodo de junio 2008 a noviembre 2010 y a la Unidad de Ginecología del INCan con diagnóstico histopatológico de CaCu invasor, en cualquier estadio, durante el periodo de septiembre a diciembre de 2010.
- Diagnóstico citológico, colposcópico e histopatológico reciente
- Información completa en cuestionario
- Consentimiento informado firmado donde se autorice la toma de muestra sanguínea y de cérvix
- Residencia en México mínimo cinco años
- Edad: mujer mayor de 18 años
- No haber iniciado tratamiento

### **Criterios de exclusión:**

- Padecer de enfermedad autoinmune o con un cuadro inflamatorio
- Coinfección de transmisión sexual
- Haber iniciado tratamiento

En el estudio transversal realizado en CAPASAM, aceptaron participar 204 casos de lesiones intraepiteliales de cuello uterino y 166 casos sin lesión en cuello uterino. En el estudio transversal realizado en el INCan, aceptaron participar 80 casos de cáncer cervicouterino, como grupo control se tomaron los 166 casos sin lesión en cuello uterino obtenidos en CAPASAM. Para el tercer estudio transversal de análisis del nivel de expresión del ARNm de IL-10 tanto a nivel sistémico como en cérvix y el nivel sérico de proteína de IL-10, se analizaron tanto los casos del CAPASAM (n=204) como los del INCan (n=80) comparados con los casos sin lesión en cuello uterino (n=166).

## **Poder estadístico y tamaño de muestra**

Se realizó el cálculo del poder estadístico para cada uno de los SNPs de la región promotora de IL-10 analizados, teniendo en cuenta la n fija para cada uno de los estudios (estudio transversal de LEI y estudio transversal de CaCU) y la frecuencia del alelo de menor frecuencia en el grupo control sin lesión en cuello uterino ( $P_1$ ). Se estableció un valor alfa de 0.05 (cuadro 1, figuras 11 y 12). El cálculo del poder

estadístico se realizó en el programa Stata 9.1. El cálculo de  $P_2$  se realizó con la fórmula  $P_1 \cdot OR / (1 - P_1) + (P_1 \cdot OR)$ .

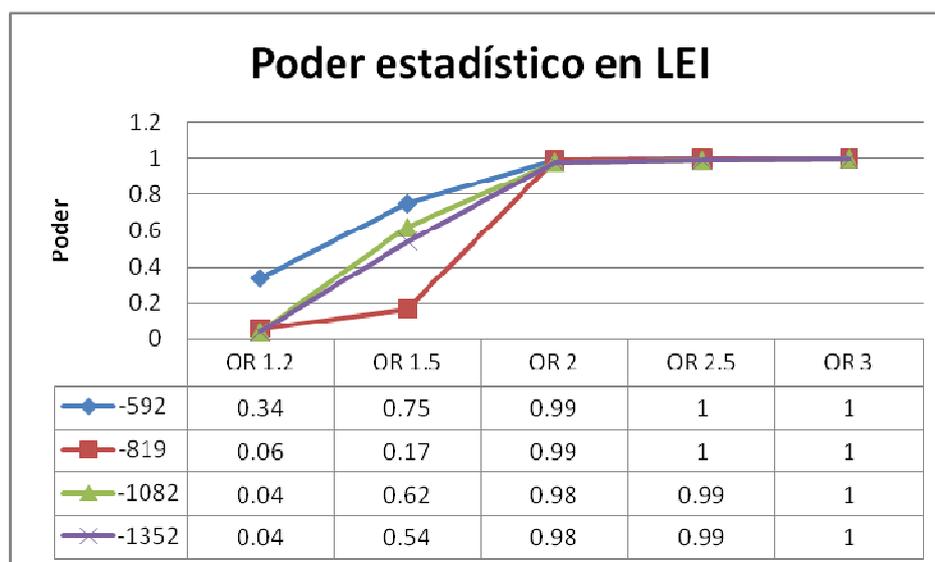
**Cuadro 1. Cálculo del poder estadístico en la población de estudio con lesiones escamosas intraepiteliales en cuello uterino y con cáncer cervicouterino.**

Poder estadístico en LEI					Poder estadístico en CaCU			
SNP	P1	RMa (IC95%)	Valor p*	Poder (1-β)	RMa (IC95%)	P1	Valor p*	Poder (1-β)
(-592 C/A)	0.40	<b>1.32 (0.97-1.81)</b>	<b>0.07</b>	<b>0.34</b>	<b>1.70 (1.06-2.71)</b>	0.39	<b>0.02</b>	<b>0.74</b>
(-819 C/T)	0.43	1.10(0.80-1.50)	0.53	0.06	<b>1.58(0.99-2.53)</b>	0.43	<b>0.05</b>	<b>0.59</b>
(-1082 A/G)	0.26	1.01(0.71-1.45)	0.92	0.04	0.68(0.38-1.22)	0.26	0.20	0.38
(-1352 G/A)	0.23	1.08(0.74-1.58)	0.65	0.04	0.71(0.38-1.32)	0.23	0.28	0.31

P1: frecuencia del alelo de menor frecuencia en el grupo de no expuestos

a. Razones de Momios ajustadas por edad y genotipo VPH en LEI y por edad en CaCU en el análisis de asociación por alelos

\*p<0.05



**Figura 11. Poder estadístico en la población de estudio con lesiones escamosas intraepiteliales en cuello uterino.**

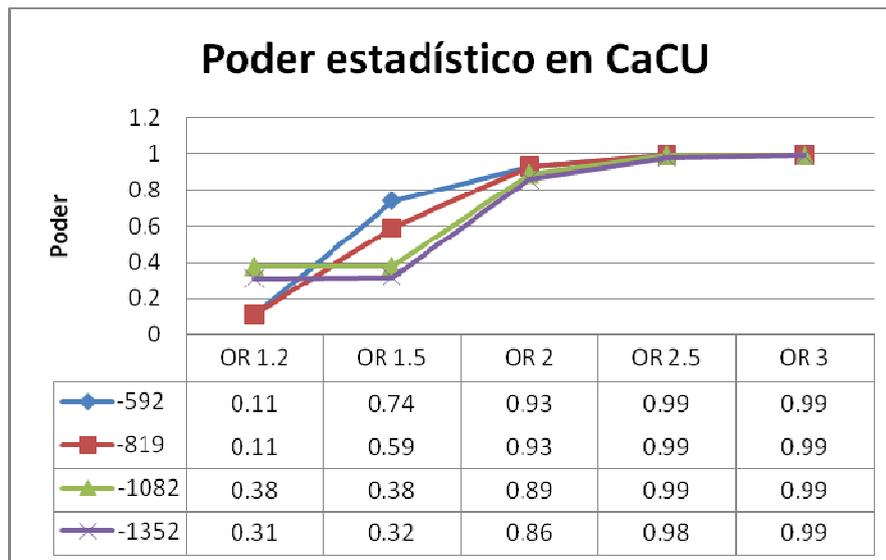


Figura 12. Poder estadístico en la población de estudio con cáncer cervicouterino.

## Metodología Experimental

### Aislamiento de linfocitos de muestras de sangre

Se realizó a partir de muestra de sangre total anticoagulada, la cual se diluyó 1:1 en PBS previamente estéril. Por cada 4 ml de sangre diluida en PBS se adicionaron 3 ml de ficoll. La sangre diluída con PBS fue vertida cuidadosamente al tubo que contiene ficoll para formar el gradiente. Se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la capa de linfocitos. Se realizó un lavado de los linfocitos con PBS estéril, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y la pastilla de linfocitos resultante se dividió en dos alícuotas (tubos 1.5ml): una se resuspendió en PBS (300ul) y la otra en Tri-pure (1000ul). Ambas alícuotas se almacenaron a -20°C. Por cada mililitro de sangre se obtuvieron aproximadamente 800 mil a 1 millón de linfocitos.

### Extracción de ADN a partir de linfocitos

200µl de muestra (linfocitos resuspendidos en PBS) se mezclaron con 400µl de solución de lisis y se incubaron a 65°C por cinco minutos. Se adicionaron 600µl de cloroformo, se mezcló por inversión (3 a 5 veces) y se centrifugó la muestra a 10,000 rpm por dos minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó la solución de precipitación (720µl de H<sub>2</sub>O con 80µl de solución concentrada). Se mezcló por inversión a temperatura ambiente por 1 a 2 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por dos minutos. La pastilla de ADN resultante se resuspendió en

100µl de NaCl al 1.2M y se homogenizó en vórtex. Se adicionó 300µl de etanol frío y se precipitó 10 minutos a -20 °C. Se centrifugó por 3 a 4 minutos a 10,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se centrifugó a 10,000 por tres minutos y se secó la pastilla. La pastilla fue resuspendida en 100 µl de agua estéril.

### **Cuantificación del ADN**

La cuantificación y evaluación de la pureza del ADN extraído fue evaluado en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000. Se preparó una dilución del ADN 1:100 en un volumen total de 100µl y se analizó a una longitud de onda de 260 nm. La concentración de ADN se calculó utilizando la fórmula:  $ADN = (260) / (40) \times (Dil.)$ . Se realizó una reacción de PCR para el gen constitutivo (GAPDH), para evaluar la integridad del ADN y la cual fue evaluada en un gel de agarosa al 0.8% tenido con bromuro de etidio y visualizado en luz UV.

### **Extracción de ARN de linfocitos, exudado de cérvix y biopsia**

Por cada seis millones de células o de 50 a 100 mg de muestra (linfocitos resuspendidos en Tri-pure, exudado de cérvix, ó biopsia), se agregó 1ml de Trizol. Se homogenizó la muestra, para el caso de tejido se usó un politrón. Se incubó cinco minutos a temperatura ambiente. Se agregó 200µl de cloroformo por cada mililitro de Trizol, se mezcló e incubó de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm, 15 minutos a 8°C o 10 minutos a 4°C. La fase superior correspondiente a ARN se transfirió a un tubo donde se añadió 500µl de isopropanol, se mezcló e incubó a -20°C por 15 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm, 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se lavó el paquete de ARN con 1ml de etanol al 75%, se mezcló y centrifugó a 10,000 rpm, siete minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20µl de agua libre de RNasas y DNasas. Se calentó a 65°C por 10 minutos, se cuantificó el ARN y se almacenó a -80°C hasta su uso en los ensayos de RT-PCR tiempo real para el análisis de expresión de IL-10.

### **Extracción de ADN a partir de exudado cervical y biopsia**

Para el caso de exudado de cérvix tomado con un cepillo exfoliativo (citobrush), se tomó la muestra tratando de tomar la mayor parte de las células del cepillo y el sobrenadante fue centrifugado a 5000 rpm por tres minutos. Para el caso de biopsia, la pieza de tejido fue digerida con 300ul de buffer de reacción para proteinasa K y 15ul de proteinasa K (50µg/mL), por dos horas a 56°C. Tanto a las células tomadas del citobrush y a la pastilla del sobrenadante como la biopsia

previamente digerida se agregó 400uL de solución de lisis. Se incubó a 65°C durante cinco minutos, se adicionó 600uL de cloroformo y se mezcló por inversión cinco veces, se centrifugó a 10 000 rpm durante cuatro minutos, se transfirió la fase superior a un tubo nuevo y se agregó 800uL (por muestra) de solución de precipitación previamente preparada (80uL de solución concentrada de precipitación más 720uL de agua esterilizada), se mezcló por inversión durante 40 segundos, se centrifugó a 10 000 rpm durante cuatro minutos, se desechó el sobrenadante y se disolvió la pastilla del ADN obtenida con solución de NaCl, se homogenizó 3 a 4 veces, se agregó 300uL de etanol absoluto, se incubó a -20°C durante 10 a 20 minutos, se centrifugó a 10 000 rpm durante cuatro minutos, se desechó el sobrenadante, se agregó 1ml de etanol al 70%, se centrifugó a 10 000 rpm durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante, la pastilla de ADN se disolvió en 50uL de agua estéril. La cuantificación y evaluación de la pureza del ADN se realizó según las indicaciones descritas previamente para la cuantificación de ADN a partir de linfocitos.

## Genotipificación

### Secuenciación por el método de Sanger. Método automático. 3100 Genetic Analyser de Applied Biosystems

El barrido genómico inicial de la región reguladora del gen de IL-10 se realizó a través de secuenciación por el método de Sanger. La estrategia que se siguió fue dividir un segmento de la región reguladora del gen de IL-10 (2439pb corriente arriba desde el sitio de inicio de la transcripción), en seis fragmentos superpuestos (figura 13), para los cuales se diseñaron oligonucleótidos para su amplificación por PCR.

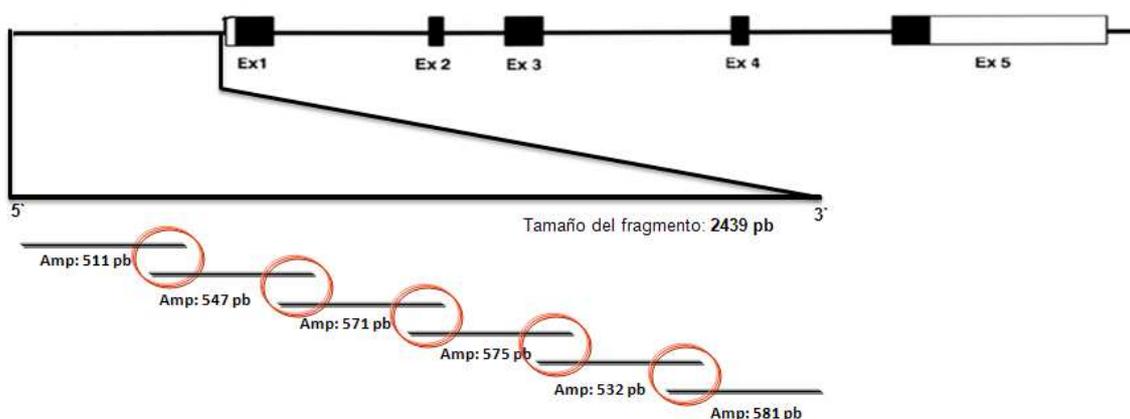


Figura 13. Estrategia secuenciación de la región reguladora de IL-10.

Se realizó la extracción del ADNg de 10 muestras de leucocitos (Buffy coat) de 10 mujeres sin lesión en cuello uterino VPH positivas (cinco) y VPH negativas (cinco), por el método de purificación de ADN genómico (Fermentas Life Sciences). Se secuenció en ambos sentidos la región reguladora del gen de IL-10 en segmentos sobrelapados para asegurar la secuencia de los extremos de dichos segmentos. Las condiciones de PCR para la amplificación de cada uno de los fragmentos se especifican a continuación:

*Amplicón 1 (511pb, desde -1850 a -2361):* 25ul de reacción conteniendo 300ng/ul de concentración final de ADN, 0.2 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 3.5mM, 10 pmol/ul de cada oligonucleótido, 2.5ul de buffer de reacción, 1ul de MMSO 4x y 0.1ul de Taq DNA polimerasa 5U/ul. La amplificación se realizó en un termociclador en gradiente (Eppendorf, Germany) bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 94°C, 40 ciclos a 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 69.7°C, 1 minutos a 72°C y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

*Amplicón 2 (547pb, desde -1466 a -1992):* las mismas condiciones del amplicón 1, excepto la concentración de MgCl<sub>2</sub> 2.5mM y la temperatura de amplificación de 63.9°C.

*Amplicón 3 (571pb, desde -1032 a -1603):* las mismas condiciones del amplicón 1, excepto la concentración de MgCl<sub>2</sub> 2.5mM y la temperatura de amplificación de 65.9°C.

*Amplicón 4 (575pb, desde -676 a -1251):* las mismas condiciones del amplicón 1, excepto la concentración de MgCl<sub>2</sub> 2.5mM y la temperatura de amplificación de 62.9°C.

*Amplicón 5 (532pb, desde -287 a -819):* las mismas condiciones del amplicón 1, excepto la concentración de MgCl<sub>2</sub> 2.5mM y la temperatura de amplificación de 63.9°C.

*Amplicón 6 (581pb, hasta -503 del sitio de inicio de la transcripción):* las mismas condiciones del amplicón 1, excepto la concentración de MgCl<sub>2</sub> 1.5mM y la temperatura de amplificación de 57.5°C.

El gen constitutivo de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa GAPDH (250pb), fue usado para verificar la integridad del ADN. Los productos de amplificación fueron corridos por electrophoresis en un gel de policrilamida al 6% y visualizados con luz ultravioleta luego de teñir el gel con bromuro de etidio. Los productos de PCR se purificaron con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) así: se agregó

cinco volúmenes de buffer PB a un volumen de producto de PCR, la mezcla resultante se transfirió a un tubo colector de 2ml a través de una columna QIAquick, se centrifugó a 13 000 rpm durante 60 segundos, se descartó el volumen del tubo colector conservando la columna, se agregó 750 uL de Buffer PE a la columna, se centrifugó a 13 000 rpm durante 60 segundos, se descartó el volumen del tubo colector conservando la columna, se centrifugó a 13 000 rpm durante 60 segundos, se descartó el buffer PE residual, se agregó 50 uL de Buffer EB en el centro de la columna, se centrifugó a 13 000 rpm durante 60 segundos, se descartó la columna y se almacenó a -20°C el eluido de ADN resultante.

Para la secuenciación se utilizó 750ng de ADN de doble cadena previamente cuantificado y puro, 5pmol/μl del primer de secuencia, para un volumen máximo de 16μl. Para la PCR se usaron 10ng / 100pb. Se realizaron cuatro mezclas de reacción, cada una con nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto y el primer adecuado. Este sistema permitió automatizar el proceso de manera que fue posible leer al mismo tiempo los ADNs de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción. Se purificaron las muestras precipitando con isopropanol y un lavado con etanol al 70%. Las muestras se diluyeron en Hi Di Formadida y se desnaturalizaron. Se introdujeron las muestras al 3100 Genetic Analyser de Applied Biosystems y el color de cada banda correspondió al del dideoxinucleótido 3'-terminal del fragmento analizado. Se generó un registro informático de los cuatro perfiles de color, que combinados se interpretó como una secuencia.

Las secuencias obtenidas por paciente se compararon con la secuencia de referencia<sup>152</sup> del gen de IL-10 y se realizó el análisis de las secuencias obtenidas con los software Phred y Phrad.<sup>153,154</sup> Posteriormente, se seleccionaron 100 pacientes, 50 con LEI VPH positivas y 50 sin lesión VPH negativas, para realizar el análisis por secuenciación del amplicón 1 de 511pb, región donde nuestro grupo de investigación identificó previamente un elemento regulador que puede ser reconocido por la proteína E2 de VPH, e induce la actividad promotora y la expresión de la IL-10 en células epiteliales.<sup>150</sup> Se usó la paquetería Phred/Phrap/Consed para evaluar las secuencias sentido y contrasentido de cada paciente. Las secuencias abarcaron las cordenadas 205,007,571-205,012,462 del cromosoma 1 humano y fueron analizadas en conjunto con la correspondiente secuencia referencia HG18 (human Genome annotation). Cada tétrada (REFseq1,REFseq2, SampleSense, SampleAntiSense) fue validada visualmente en búsqueda de posibles SNPs.

## **Discriminación Alélica**

Siete SNP's (-4168 C/G, -2025 A/G, -1352 A/G, -1082 A/G, -819 C/T, -657 A/G, y -592 A/C) de la región promotora de IL-10, fueron genotipificados por discriminación alélica basada en el ensayo 5'-nucleasa, con la tecnología de PCR en combinación con sondas Taqman fluorogénicas en el equipo de PCR en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems. Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 5ul conteniendo 25ng de ADN, 1X de Master Mix para genotipificación (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 900nM de cada sonda. Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 92°C y un minuto a 60°C. Se hizo una pre-lectura de la fluorescencia basal y la fluorescencia final fue medida inmediatamente después de la reacción de PCR. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado y los alelos fueron asignados usando el software SDS 2.1 (Applied Biosystems). El control de calidad para los resultados de genotipificación se realizó con controles sin muestra problema y controles del homocigoto común y el menos frecuente, en adición, se re-analizó las muestras con resultados indeterminados. La concordancia entre genotipos fue mayor a 90%, para el control de calidad de la genotipificación se usó una tasa de asignación de 0.99 tanto para los casos con LEI y CaCU como para los de sin lesión. Cuando la tasa de asignación fue menor a 0.99, el ADN fue re-extraído y la genotipificación se realizó nuevamente.

## **Criterios para la selección de SNP's**

Los SNPs fueron seleccionados con los siguientes criterios: 1) SNP's validados por frecuencia o por el proyecto HAPmap. 2) SNP's en región promotora para los cuales se ha publicado alguna evidencia científica de su papel potencial en la regulación transcripcional de IL-10. Para la selección se usó el programa Ensembl disponible en la página electrónica <http://www.ensembl.org/index.html>. 3) SNP's en el promotor de IL-10 localizados en sitios de unión de factores de transcripción que puedan influenciar potencialmente en la actividad transcripcional de IL-10 y reportados en la base de datos SNPper, disponible en URL: <http://snpper.chip.org>. Las sondas Taqman usadas para la genotipificación fueron: -4168 C/G (rs3001100), -2025 A/G (rs1800892), -1352 A/G (rs1800893), -1082 A/G (rs1800896), -819 C/T (rs1800871), -657 A/G (rs1800895) y -592 A/C (rs1800872).

## **Análisis de expresión de IL-10 por PCR Tiempo Real**

El ARN total fue aislado de células mononucleares de sangre periférica, exudado cervical y biopsias usando el reactivo trizol de Invitrogen. La síntesis de cDNA complementario fue realizada en la presencia de 200 U de reverso transcriptasa M-MLV y 2.5ug de ARN total usando condiciones estándar. La reacción de PCR se llevó a cabo para un volumen de reacción de 25ul conteniendo 1ul de cDNA, 0.2 mM de dNTPs, 15 pmol de cada oligonucleótido, 2.5ul de buffer de reacción y 1U de Taq DNA polimerasa recombinante. El gen constitutivo de GAPDH (250pb), fue usado para verificar la integridad del ADN. La reacción de PCR fue hecha en un termociclador Mastercycler PCR gradient (Eppendorf, Germany) bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 60°C y un minuto a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron corridos por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% y visualizados con luz ultravioleta luego de teñir el gel con bromuro de etidio.

Las sondas de expresión para IL-10 y HPRT1 (hipoxantina fosforibosil transferasa) fueron obtenidas de Applied Biosystems para el análisis de expresión por PCR tiempo real. El gen de HPRT1 fue usado para normalizar la cantidad de ARNm presente en cada muestra.<sup>155,156</sup> La reacción de PCR por tiempo real fue hecha adicionando 2ul de cada cDNA a un volumen final de reacción de 10ul, conteniendo 5ul de Master Mix para expresión, 0.4ul de sonda y 2.6ul de agua libre de DNAsas grado molecular. Los ciclos de amplificación fueron realizados en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems, Foster City, bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 94°C, 40 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 54°C y un minuto y 30 segundos a 72°C, con una extensión final de 15 minutos a 72°C. Para establecer la concentración óptima de cDNA para el análisis de expresión de IL-10 por tiempo real, se construyó la curva de rango dinámico con células mononucleares de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina por 72 horas para el análisis a nivel sistémico y con la línea celular SiHa que expresa IL-10 constitutivamente para el análisis de IL-10 a nivel de cérvix.

## **Detección de IL-10 en suero**

Muestras de suero de cada paciente fueron almacenadas a -80°C y descongeladas inmediatamente antes de la determinación del nivel de citocina. Los niveles de IL-10 fueron determinados usando el kit de ELISA de alta sensibilidad (Abcam UK). Todas las muestras fueron medidas por duplicado y la

concentración final de IL-10 fue calculada como el promedio de las lecturas de los duplicados. Los resultados fueron expresados como picogramos por mililitro (pg/ml) y la sensibilidad de detección fue de 1.30 pg/ml.

### Detección y tipificación de VPH en muestras de exudado y biopsia de cérvix

Luego de evaluar la integridad del ADN se realizó una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos que flanquean la región L1 de la cápside del VPH y que amplifican un fragmento de 450pb (MY09/MY11), 250pb (LIC1LIC2) y 150pb (GP5+/GP6+), según las indicaciones descritas en los cuadros 2 y 3. Se utilizaron como controles positivos las líneas celulares que expresan VPH-16 (SiHa), VPH-18 (HeLa) y como control negativo H<sub>2</sub>O desionizada. El análisis de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de acrilamida al 6%, teñidos con bromuro de etidio. El equipo utilizado fue es el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000. Aquellas muestras que amplificaron con los oligonucleótidos anteriormente mencionados, se digirieron con diferentes enzimas de restricción: para los oligonucleótidos (MY09/MY11) 450pb: (Dde1, BamH, Hae111, Hinf1, Pst1, Rsa1); para los oligonucleótidos (LIC1LIC2) 250pb: (Rsa1, Dde1, Hae111, Hinf1, Xba1, Acc1, Pst1) y para los oligonucleótidos (GP5+/GP6+) se esperó una banda de 150 pb.

**Cuadro 2. Condiciones de PCR para los oligonucleótidos GAPDH, L1C1, MY09 y GP5.**

GENES	DESNATURALIZACIÓN				ALINEAMIENTO				EXTENSIÓN		
	T(°C)	Tiempo minutos	T(°C)	Tiempo minutos	T(°C)	Tiempo minutos	T(°C)	Tiempo minutos	T(°C)	Tiempo minutos	No. de ciclos
<b>GAPDH</b>	94	4	94	1	57	1	72	1	72	5	30
<b>L1C1</b>	95	5	95	1	50	1.5	72	2	72	2	40
<b>MY09</b>	94	5	94	45seg	57	1	72	1.30	72	10	35
<b>GP5</b>	94	4	94	1	40	2	72	1.5	72	4	40

**Cuadro 3. Concentraciones de reactivos para la reacción de PCR para los oligonucleótidos GAPDH, L1C1, MY09 y GP5.**

Concentración de reactivo						
	dNTPs (2.5mM)	Buffer (10X)	MgCl2 (50mM)	Primer sentido (pmol)	Primer antisentido (pmol)	Taq pol (5U/ul)
GENES	mM	mM	pmol	pmol	u/ul	
<b>GAPDH</b>	0.2	1	1.5	15	15	1
<b>L1C1</b>	0.2	1	3	20	20	1
<b>MY09</b>	0.2	1	1.5	20	20	1
<b>GP5</b>	0.2	1	3.4	20	20	1

Aquellas muestras en las que no fue posible determinar el tipo viral por RFLP, se purificó la banda de ADN obtenida y se secuenció por el método de Sanger. La purificación de los fragmentos de agarosa de bajo punto de fusión se realizó con el QIAquick PCR Purification Kit (Fermentas Life Sciences) así: se cortaron los fragmentos amplificados del gel de agarosa, se pesó el fragmento de agarosa en balanza analítica, se agregó buffer QG, dos volúmenes de buffer por cada volumen de fragmento (100mg = 100ml). En el caso de agarosa al 2%, se agregaron seis volúmenes de buffer, se incubó a 50°C por 10 minutos hasta que el gel se disolvió completamente, se adicionó un volumen de isopropanol, se homogenizó y se dispensó en una columna en un tubo de colección, se centrifugó a 13000 rpm, se desechó el volumen colectado en el tubo, se adicionó 500ul de buffer QG a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 13000 rpm, se adicionó 75ml (750ul) de buffer PE a la columna y se centrifugó dos veces por 1 minuto a 13000 rpm, el ADN fue eluido de la columna en un tubo limpio con 50ul de agua de calidad PCR, libre de DNAsas (pH 7-8.5). Para la secuenciación se utilizó 750ng de ADN de doble cadena previamente cuantificado y puro, 5pmol/μl del primer de secuencia, para un volumen máximo de 16μl.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis descriptivo de las características sociodemográficas de la población de estudio, antecedentes gineco-obstétricos y heredofamiliares de cáncer y variables relacionadas con el estilo de vida de la población de estudio. Se compararon las variables relevantes entre mujeres con LEI y mujeres sin LEI y entre mujeres con CaCU y mujeres sin LEI, usando la prueba de  $\chi^2$  o Kruskal Wallis para las variables categóricas y continuas, respectivamente. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el estudio de la distribución de las frecuencias, tanto genotípicas como alélicas para cada uno de los polimorfismos. La distribución observada para cada SNP`s en toda la población de estudio se comparó con la esperada por medio de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de controles (mujeres sin lesión).

Tanto para el análisis entre mujeres con LEI (n=204) y mujeres sin LEI (n=166) y el análisis entre mujeres con CaCU (n=80) y mujeres sin LEI, fue realizado un análisis bivariado y de regresión logística considerando el modo de heredabilidad (codominante, recesivo y dominante), ORs fueron obtenidos con sus respectivos intervalos de confianza (IC) 95% para cada una de las variantes genotípicas posibles. La variante de referencia fue el homocigoto de la variante más común. Potenciales confusores para LEI y CaCU fueron incluidos en el modelo multivariado (edad y genotipo de VPH). Para evaluar la asociación de la carga de alelos de riesgo con LEI y CaCU se realizó el análisis por regresión logística.

Interacciones SNP-SNP y SNP-nivel de expresión de IL-10 a nivel sistémico, fueron evaluadas adicionando términos multiplicativos en los modelos logísticos multivariados; para ello, se hizo una transformación doble-logarítmica de la variable, nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y en cérvix ya que no se distribuyó normalmente. Para evaluar la interacción SNP-nivel de expresión de IL-10 a nivel sistémico se generaron variables “dummies” para cada uno de los SNP’s y se evaluó mediante regresión logística la interacción estadística tomando como variable dependiente el diagnóstico de lesión. Para evaluar la interacción SNP-SNP se generaron variables “dummies” para cada uno de los SNP’s y se evaluó mediante regresión lineal la interacción estadística tomando como variable dependiente el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico. El análisis de la expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y en cérvix en mujeres con LEI versus sin LEI y en mujeres con CaCU versus sin LEI fue realizado usando la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. El análisis intergrupar (mujeres sin LEI, con LEI y CaCU), de la expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y en cérvix y de la concentración de proteína de IL-10 a nivel sérico, fue realizado usando la prueba de Kruskal Wallis. Todos los análisis se llevaron a cabo mediante el programa STATA versión 9.2 (StataCorp, Collage Station, TX, EUA) para Windows.

Por otro lado, se evaluó el desequilibrio de ligamiento mediante el valor estandarizado de  $D'$  propuesto por Lewontin y el cálculo de  $R^2$  usando el programa SNPstat. Para evitar la estratificación por etnicidad que pudiera potencialmente confundir el análisis genético, fue el análisis confinado a población mexicana con dos generaciones previas nacidas en México. El análisis de haplotipos fue hecho sobre los genotipos de tres de los polimorfismos analizados en este estudio (-1082 A/G, -819 C/T y -592 C/A), usando el programa SNPstat disponible en la siguiente página electrónica: <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>. El haplotipo más frecuente fue automáticamente seleccionado como categoría de referencia y los haplotipos raros fueron asignados como un sólo grupo. El análisis de haplotipos se realizó mediante un modelo log-aditivo por defecto.<sup>157</sup>

## **XI. Resultados**

### **1. Análisis por secuenciación de la región reguladora del gen de IL-10 (2439pb)**

Se realizó el análisis exploratorio de 2439pb corriente arriba del sitio del inicio de la transcripción de la región reguladora del gen de IL-10, con el objeto de buscar nuevas variantes polimórficas en esta región con respecto a las reportadas en el

HapMap. Los resultados de amplificación por PCR de cada uno de los seis fragmentos analizados de la región reguladora del gen de IL-10 se presentan a continuación (figura 14):

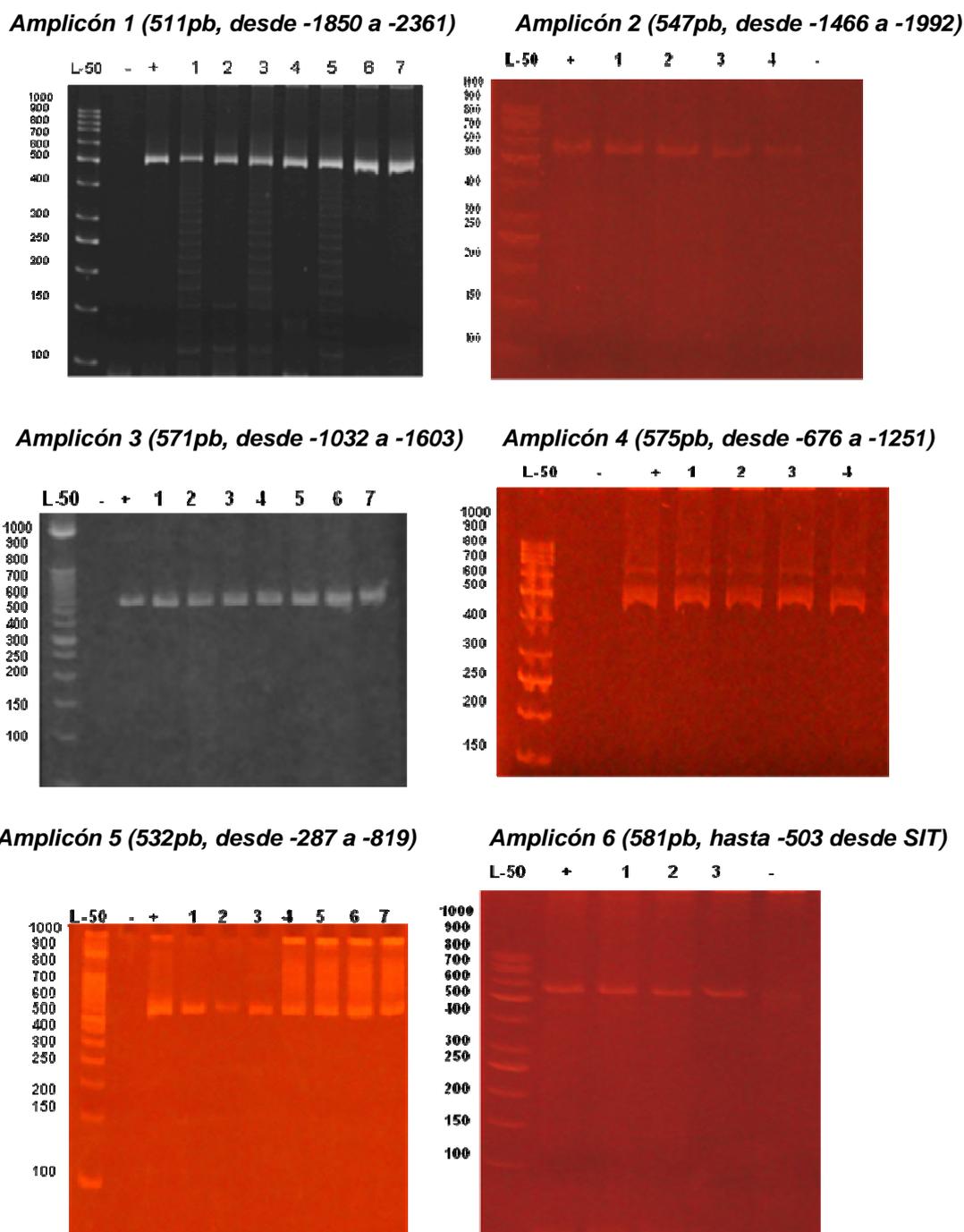


Figura 14. Resultados de amplificación por PCR de cada uno de los seis fragmentos analizados de la región reguladora del gen de IL-10.

Tras el análisis bioinformático exploratorio inicial con la paquetería Phred/Phrap/Consed de las secuencias sentido y antisentido de los seis fragmentos de la región reguladora de IL-10 secuenciados, se encontraron 21 SNPs con un Phred score mayor a 20, de los cuales sólo tres (-592C/A, -819 C/T y -102 A/G) han sido validados (cuadro 4).

**Cuadro 4. SNPs encontrados tras el análisis por secuenciación de 2439pb corriente arriba de la región promotora del gen de IL-10.**

Posición			SNP
chr1:205012542	-	104	A/C
chr1:205012565	-	127	C/G
chr1:205012694	-	256	C/T
chr1:205012738	-	300	C/T
chr1:205012867	-	429	G/T
chr1:205012970	-	532	A/G
chr1:205013030	-	592	C/A
chr1:205013036	-	598	C/T
chr1:205013095	-	657	A/G
chr1:205013257	-	819	C/T
chr1:205013289	-	851	A/G
chr1:205013453	-	1015	A/C
chr1:205013502	-	1064	A/G
chr1:205013520	-	1082	A/G
chr1:205013790	-	1352	A/G
chr1:205013927	-	1489	C/T
chr1:205013980	-	1542	A/G
chr1:205014125	-	1687	C/T
chr1:205014194	-	1756	A/C
chr1:205014463	-	2025	G/A
chr1:205014623	-	2185	T/C

Al menos 175 SNPs en el gen de IL-10 han sido reportados en la literatura, en el HapMap se reportan a la fecha 79 en región promotora, 40 en región 5'UTR, 14 en región 3'UTR y únicamente un polimorfismo resulta en un cambio de la secuencia del aminoácido (SNPper, disponible en URL: <http://snpper.chip.org>).

## 2. Análisis de la secuencia de la región promotora de IL-10 donde existe un elemento regulador que es reconocido por la proteína E2 de VPH

El amplicón 1 de 511pb que va desde -1850 a -2361 alberga el sitio putativo de unión de la proteína E2 de VPH (ACCN6GGT) ubicado entre -2166 a -2179, corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Al comparar el elemento regulador de E2 de VPH entre mujeres con LEI y sin lesión no se encontraron diferencias significativas (cuadro 5). La secuencia predominante fue ACCCTACGTGGT. Los dos SNPs ubicados dentro del amplicón 1 analizado fueron: -2025 G/A rs1800892 y -2185 T/C rs45493296, los cuales resultaron no polimórficos en la población de estudio (figura 15).

**Cuadro 5. Análisis del elemento regulador de E2 de VPH en la región promotora de IL-10 en mujeres con LEI y sin lesión**

Diagnóstico	ELEMENTO REGULADOR DE E2 VPH	Diagnóstico	ELEMENTO REGULADOR DE E2 VPH
SIN LESIÓN	ACCCTACGTGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCCTACGTGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCCTACGTGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCACGTAGGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCCTACGTGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT
SIN LESIÓN	ACCCTACGTGGT	LESIÓN	ACCACGTAGGGT



3. **Análisis de asociación de los polimorfismos -592, -819, -1082, -1352 de la región reguladora de IL-10 con lesiones escamosas intraepiteliales en cuello uterino**

**Análisis descriptivo**

Las características sociodemográficas y antecedentes gineco-obstétricos de la población de estudio se presentan en el cuadro 6. Los casos de LEI reportaron una edad de inicio de vida sexual menor que las mujeres sin LEI [18 años vs. 20 años] y un número mayor de embarazos [más de 3 (40.35% vs. 12.65%)]. Hubo diferencias significativas entre los grupos para las variables edad de inicio de vida sexual, nivel socioeconómico, número de embarazos y antecedentes de ETS ( $p < 0.0001$ ).

**Cuadro 6. Características generales de la población de estudio en LEI versus no LEI**

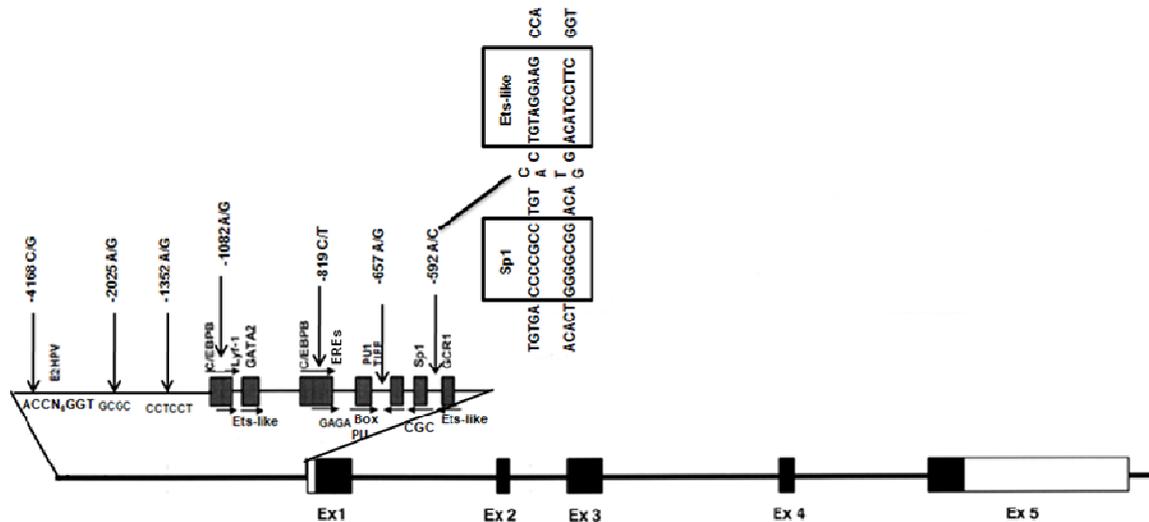
<b>Características generales de la población de estudio</b>			
<b>Características Sociodemográficas</b>	<b>Con LEI (204)</b>	<b>Sin LEI (166)</b>	<b>valor <i>p</i>&amp;</b>
<b>Edad</b>			
Media (DS)	36.3 (10.37)	35.8 (11.40)	0.42
<b>Edad inicio vida sexual</b>			
Media (DS)	18 (3.07)	19.83(3.98)	<b>0.001</b>
<b>Edad menarca</b>			
Media (DS)	12.79 (1.55)	12.88 (1.42)	0.57
<b>IMC</b>			
Media (DS)	26.02 (4.21)	25.14 (4.37)	0.06 <sup>∞</sup>
<b>Etnicidad (%)</b>			
Indígena	84.24	2.4	<b>0.001</b>
Blanco	11.76	97.6	
<b>Nivel socioeconómico (%)</b>			
Bajo	<b>81.86</b>	21.08	<b>0.001</b>
Medio	18.14	78.92	
<b>Paridad</b>			
< 3	31	87.3	<b>0.001</b>
>3	<b>69</b>	12.65	
<b>No. parejas sexuales</b>			
<3	88.24	81.93	0.12
4 a 9	9.31	16.27	
>10	2.45	1.81	
<b>Antecedentes ETS</b>			
No	28.43	52.4	<b>0.001</b>

Otras ETS	<b>55.39</b>	36.14	
IVPH	16.18	11.45	
<b>Método de planificación familiar</b>			
Ninguno	12.75	21.69	<b>0.001</b>
No hormonales	41.18	43.37	
Hormonales 6m-5a	<b>46.08</b>	34.94	
<b>HPV genotype</b>			<b>0.001</b>
Negativo	29.9	38.55	
Otros genotipos	16.67	22.29	
VPH 18	7.84	21.69	
VPH 16	<b>41.67</b>	14.46	
VPH 16 y 18	3.92	3.01	

Las variables continuas se expresan en medias y DS  
Las variables categóricas se expresan en porcentajes  
&Valor  $p$  kwallis variables continuas y  $X^2$  categóricas  
∞Prueba T para variables con distribución normal

Los modelos de regresión logística ajustados por edad y genotipo de VPH, confirmaron la asociación conocida de factores socio-demográficos y reproductivos (edad de inicio de vida sexual, multiparidad, nivel socioeconómico bajo y antecedentes de ETS) con LEI y la asociación de los genotipos analizados con LEI. La prevalencia global de VPH en la población estudiada fue de 68%. EL grupo de mujeres sin LEI presentó una prevalencia de VPH de 60%. El genotipo más prevalente fue el VPH-16 (42%) seguido por el VPH-18 y VPH-59. La prevalencia de co-infección fue de 40%, siendo más frecuente la co-infección con tres o más genotipos de VPH.

Siete SNPs de la región promotora proximal de IL-10, -4168 C/G, -2025 A/G, -1352 A/G, -1082 A/G, -819 C/T, -657 A/G y -592 A/C, fueron analizados por discriminación alélica (figura 16). Tres de ellos (-592 A/C, -819 C/T, -1082 A/G), conocidos por su influencia potencial sobre la expresión de IL-10. Los polimorfismos -4168 C/G, -2025 A/G y -657 A/G no fueron polimórficos en la población de estudio.



**Figura 16. Mapa del gen de IL-10 sobre el cromosoma 1q21-32.** Los exones se marcan como bloques oscuros y los 5' - y 3' -UTR como bloques blancos. Los sitios putativos de unión de factores de transcripción se indican ([molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html), putative score >0.9). Las posiciones de cada uno de los SNPs se calculan desde el sitio de inicio de la transcripción.

Un análisis descriptivo de los polimorfismos seleccionados fue llevado a cabo, se establecieron las frecuencias genotípicas y alélicas para los SNPs-592 A/C, -819 C/T, -1082 A/G y -1352 A/G en mujeres con LEI versus sin LEI (cuadro 7). La frecuencia más alta fue observada para el genotipo A/C del polimorfismo -592, LEI (52%) vs., sin LEI (42%). No se encontraron desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg entre controles en ninguno de los SNPs analizados. En el cuadro 7 se presenta la asociación de los cuatro polimorfismos con el riesgo de LEI, con los ORs estimados a través de regresión logística condicional. Únicamente se encontró asociación del polimorfismo -592 con LEI. Se observó que el genotipo heterocigoto A/C con un OR de 2.0 (IC 95%, 1.21-3.32) y el homocigoto del alelo de riesgo A/A con un OR de 2.0 (IC 95%, 1.10-3.89), tuvieron una asociación significativa para el modelo codominante. Para el modelo dominante, se encontró una asociación significativa con un OR de 2.0 (IC 95%, 1.26-3.25). Al evaluar la asociación por alelos se encontró una asociación marginal con un OR de 1.32 (IC 95%, 0.97-1.81). Los otros tres SNPs no mostraron diferencias significativas en ninguno de los modelos analizados. El modelo multivariado ajustado por edad y genotipo de VPH no cambiaron de manera considerable los resultados.

**Cuadro 7. Análisis de asociación de los SNPs (-592, -819, -1082, -1352) de la región promotora del gen de Interleucina 10 con lesiones intraepiteliales de cuello uterino (LEI).**

(-592 C/A)				(-819 C/T)			
Genotipo	n(%)con LEI/(%)Sin LEI (n=204/166)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)con LEI/(%)Sin LEI (n=204/166)	RMa (IC95%)	Valor p*
<b>Modelo Codominante</b>				<b>Modelo Codominante</b>			
C/C	50(24.5)/66(40)	1		C/C	64(31.4)/57(34.3)	1	
C/A	105(52)/70(42)	<b>2.0(1.21-3.32)</b>	<b>0.007</b>	C/T	94(46)/75(45.2)	1.16(0.71-1.92)	0.53
A/A	49(24)/30(18)	<b>2.07(1.10-3.89)</b>	<b>0.02</b>	T/T	46(22.6)/34(20.5)	1.15(0.62-2.12)	0.64
<b>Modelo Dominante</b>				<b>Modelo Dominante</b>			
C/C	50(24.5)/66(40)	<b>1</b>		C/C	64(31.4)/57(34.3)	1	
C/A + A/A	154(76)/100(60)	<b>2.02(1.26-3.25)</b>	<b>0.003</b>	C/T + T/T	140(68.5)/109(65.7)	1.16(0.73-1.84)	0.51
<b>Modelo Recesivo</b>				<b>Modelo Recesivo</b>			
C/C + C/A	155(76)/136(82)	1		C/C + C/T	158(77.4)/132(79.5)	1	
A/A	49(24)/30(18)	1.37(0.79-2.39)	0.25	T/T	46(22.6)/34(20.5)	1.05(0.61-1.81)	0.84
<b>Alelos</b>				<b>Alelos</b>			
C	205(51)/202(60)	1		C	222(54)/189(57)	1	
A	203(49)/130(40)	<b>1.32 (0.97-1.81)</b>	<b>0.07</b>	T	186(46)/143(43)	1.10(0.80-1.50)	0.53
p EHW**			0.13	p EHW**			0.31
(-1082 A/G)				(-1352 G/A)			
Genotipo	n(%)Con LEI/(%)Sin LEI (n=204/166)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Con LEI/(%)Sin LEI (n=204/166)	RMa (IC95%)	Valor p*
<b>Modelo Codominante</b>				<b>Modelo Codominante</b>			
A/A	125(61.3)/92(55.4)	1		G/G	130(63.72)/102(61.44)	1	
A/G	66(32.3)/62(37.3)	0.95(0.59-1.52)	0.84	G/A	64(31.37)/53(31.94)	1.28(0.78-2.07)	0.31
G/G	13(6.4)/12(7.3)	1.02(0.42-2.44)	0.96	A/A	10(4.9)/11(6.62)	0.85(0.33-2.22)	0.75
<b>Modelo Dominante</b>				<b>Modelo Dominante</b>			
A/A	125(61.3)/92(55.4)	1		G/G	130(63.72)/102(61.44)	1	
A/G + G/G	79(38.7)/74(44.6)	0.96(0.61-1.50)	0.87	G/A + A/A	74(36.27)/64(38.56)	1.20(0.76-1.90)	0.42
<b>Modelo Recesivo</b>				<b>Modelo Recesivo</b>			
A/A + A/G	191(93.6)/154(92.7)	1		G/G + G/A	194(95)/155(93.38)	1	
G/G	13(6.4)/12(7.3)	1.04(0.44-2.44)	0.92	A/A	10(4.9)/11(6.62)	0.78(0.30-1.99)	0.6
<b>Alelos</b>				<b>Alelos</b>			
A	316(77)/246(74)	1		G	324(79)/257(77)	1	
G	92(23)/86(26)	1.01(0.71-1.45)	0.92	A	84(21)/75(23)	1.08(0.74-1.58)	0.65
p EHW**			0.72	p EHW**			0.26

a. Razones de Momios ajustadas por edad y genotipo VPH

\*\* Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg en controles.

\*p<0.05

Un análisis posterior de los cuatro SNPs evaluados anteriormente fue realizado usando el software SNPstat. El desequilibrio de ligamiento fue evaluado mediante el valor estandarizado de  $D'$  propuesto por Lewontin y el cálculo de  $R$  (figura 17). El SNP -1352 estuvo es desequilibrio de ligamiento con el SNP -1082.

		Linkage Disequilibrium		
		SNP..1082..A.G	SNP..819..C.T	SNP..592..C.A
Marker 1	SNP..1352..G.A	0.1701 0.903 0.900 546 <2e-16 337	-0.0947 0.861 -0.440 130 <2e-16 337	-0.0961 0.898 -0.448 135 <2e-16 337
	SNP..1082..A.G		-0.0917 0.829 -0.425 122 <2e-16 337	-0.0907 0.843 -0.422 120 <2e-16 337
	SNP..819..C.T	D D' r X <sup>2</sup> P-value n		0.2193 0.917 0.895 540 <2e-16 337
		Marker 2		

**Figura 17. Desequilibrio de ligamiento en LEI versus sin LEI**

Se realizó el análisis de haplotipos para los SNPs -1082/-819/-592. El haplotipo (ACC/ATA) fue el haplotipo más común seguido por el heterocigoto (ACC/GTA) y el homocigoto (ATA/ATA); sin embargo, ninguno de los haplotipos se asoció con LEI.

#### 4. Análisis de asociación de los polimorfismos -592, -819, -1082, -1352 de la región reguladora de IL-10 con cáncer cervicouterino

##### Análisis descriptivo

Al realizar el análisis en pacientes con CaCU, hubo diferencias significativas con las mismas variables asociadas en el análisis realizado en mujeres con LEI. No obstante, la variable edad fue significativamente diferente entre los grupos ( $p < 0.001$ ), dado que la edad promedio en las mujeres con CaCU fue de 53 vs. 36 años de edad en el grupo sin LEI (cuadro 8). La prevalencia de VPH-AR para CaCU fue de 99% comparado con el grupo sin LEI (56%). La prevalencia de co-infección con dos o más genotipos de VPH para los grupos de sin LEI y CaCU fue de 19% vs. 25%, respectivamente.

**Cuadro 8. Características generales de la población de estudio en CaCU versus no LEI**

<b>Características generales de la población de estudio</b>			
<b>Características Sociodemográficas</b>	<b>CaCU (80)</b>	<b>Sin LEI (166)</b>	<b>valor p&amp;</b>
<b>Edad</b>			
Media (DS)	53 (11.7)	35.8 (11.40)	<b>0.001</b>
<b>Edad inicio vida sexual</b>			
Media (DS)	16.42(2.80)	19.83(3.98)	<b>0.001</b>
<b>Edad menarca</b>			
Media (DS)	13.2 (0.98)	12.88 (1.42)	<b>0.07</b>
<b>IMC</b>			
Media (DS)	24.88 (3.61)	25.14 (4.37)	0.64 $\infty$
<b>Etnicidad (%)</b>			
Indígena	98.75	2.4	<b>0.001</b>
Blanco	1.25	97.6	
<b>Nivel socioeconómico (%)</b>			
Bajo	<b>98.75</b>	21.08	<b>0.001</b>
Medio	1.25	78.92	
<b>Paridad</b>			
< 3	22.5	87.35	<b>0.001</b>
>3	<b>77.5</b>	12.65	
<b>No. parejas sexuales</b>			
<3	85	81.93	0.45
4 a 9	15	16.27	
>10	0	1.81	
<b>Antecedentes ETS</b>			
No	1.25	52.41	<b>0.001</b>

Otras ETS	<b>98.75</b>	36.14	
IVPH	0	11.45	
<b>Método de planificación familiar</b>			
Ninguno	78.75	21.69	<b>0.001</b>
No hormonales	0	<b>43.37</b>	
Hormonales 6m-5a	21.25	34.94	
<b>HPV genotype</b>			<b>0.001</b>
Negativo	1.25	38.55	
Otros genotipos	0	22.29	
VPH 18	0	21.69	
VPH 16	<b>98.75</b>	14.46	
VPH 16 y 18	0	3.01	

Las variables continuas se expresan en medias y DS  
Las variables categóricas se expresan en porcentajes  
& Valor p kwallis variables continuas y X<sup>2</sup> categóricas  
∞ Prueba T para variables con distribución normal

Las frecuencias genotípicas y alélicas para los SNPs -592 A/C, -819 C/T, -1082 A/G y 1352 A/G en mujeres con CaCU versus sin LEI se describen en el cuadro 9. Para el análisis de asociación de los polimorfismos analizados con el riesgo de CaCU, ORs fueron estimados a través de regresión logística. Se observó al igual que para el análisis con LEI, asociación significativa con el polimorfismo -592; el genotipo heterocigoto A/C tuvo un OR de 8.10 (IC 95%, 2.67-24.56) y el homocigoto del alelo de riesgo un OR de 7.27 (IC 95%, 2.17-24.36), al evaluar el modelo codominante. Al evaluar el modelo dominante se encontró un OR de 7.83 (IC 95%, 2.66-23.04). Esta asociación se conserva significativa al evaluar la asociación por alelos, encontrándose un OR de 1.70 (IC 95%, 1.06-2.71).

En contraste con el análisis en LEI, el genotipo C/T del SNP -819 resultó asociado significativamente al evaluar el modelo codominante, con un OR de 3.08 (IC 95%, 1.16-8.12) para el genotipo heterocigoto y un OR de 4.26 (IC 95%, 1.47-12.31) para el homocigoto del alelo de riesgo. Para el modelo dominante se observó un OR de 3.44 (IC 95%, 1.35-8.72). Al evaluar la asociación por alelos, se encontró una asociación significativa con un OR de 1.58 (IC 95%, 0.99-2.53).

Los SNPs -1082 y -1352 no mostraron diferencias significativas en ninguno de los modelos analizados. El modelo multivariado ajustado por edad no cambió de manera considerable los resultados.

**Cuadro 9. Análisis de asociación de los SNPs (-592, -819, -1082, -1352) de la región promotora del gen de Interleucina 10 con cáncer cervicouterino (CaCU)**

(-592 C/A)				(-819 C/T)			
Genotipo	n(%)CaCU/(%)Sin LEI (n=80/166)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)CaCU/(%)Sin LEI (n=80/166)	RMa (IC95%)	Valor p*
<b>Modelo Codominante</b>				<b>Modelo Codominante</b>			
C/C	5(6.25)/66(40)	1		C/C	8(10)/57(34.3)	1	
C/A	50(62.5)/70(42)	<b>8.10(2.67-24.56)</b>	<b>0.001</b>	C/T	45(56.25)/75(45.2)	<b>3.08(1.16-8.12)</b>	<b>0.02</b>
A/A	25(31.25)/30(18)	<b>7.27(2.17-24.36)</b>	<b>0.001</b>	T/T	27(33.75)/34(20.5)	<b>4.26(1.47-12.31)</b>	<b>0.001</b>
<b>Modelo Dominante</b>				<b>Modelo Dominante</b>			
C/C	5(6.25)/66(40)	<b>1</b>		C/C	8(10)/57(34.3)	1	
C/A + A/A	75(93.7)/100(60)	<b>7.83(2.66-23.04)</b>	<b>0.001</b>	C/T + T/T	72(90)/109(65.7)	<b>3.44(1.35-8.73)</b>	<b>0.001</b>
<b>Modelo Recesivo</b>				<b>Modelo Recesivo</b>			
C/C + C/A	55(68.7)/136(82)	1		C/C + C/T	53(66.25)/132(79.5)	1	
A/A	25(31.25)/30(18)	1.46(0.68-3.15)	0.32	T/T	27(33.75)/34(20.5)	1.85(0.88-3.88)	0.10
<b>Alelos</b>				<b>Alelos</b>			
C	60(37)/202(61)	1		C	61(38)/189(57)	1	
A	100(63)/130(39)	<b>1.70 (1.06-2.71)</b>	<b>0.02</b>	T	99(62)/143(43)	<b>1.58(0.99-2.53)</b>	<b>0.05</b>
<b>p EHW**</b>			0.13	<b>p EHW**</b>			0.310
<b>(-1082 A/G)</b>				<b>(-1352 G/A)</b>			
Genotipo	n(%)CaCU/(%)Sin LEI (n=80/166)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)CaCU/(%)Sin LEI (n=80/166)	RMa (IC95%)	Valor p*
<b>Modelo Codominante</b>				<b>Modelo Codominante</b>			
A/A	56(70)/92(55.4)	1		G/G	60(75)/102(61.44)	1	
A/G	20(25)/62(37.3)	0.56(0.26-1.19)	0.13	G/A	17(21.25)/53(31.94)	0.54(0.24-1.18)	0.12
G/G	4(5)/12(7.3)	0.74(0.18-3.01)	0.68	A/A	3(3.75)/11(6.62)	1.03(0.22-4.65)	0.96
<b>Modelo Dominante</b>				<b>Modelo Dominante</b>			
A/A	56(70)/92(55.4)	1		G/G	60(75)/102(61.44)	1	
A/G + G/G	24(30)/74(44.6)	0.59(0.29-1.19)	0.14	G/A + A/A	20(25)/64(38.56)	0.60(0.29-1.24)	0.16
<b>Modelo Recesivo</b>				<b>Modelo Recesivo</b>			
A/A + A/G	76(95)/154(92.7)	1		G/G + G/A	77(96.27)/155(93.38)	1	
G/G	4(5)/12(7.3)	0.89(0.22-3.52)	0.87	A/A	3(3.75)/11(6.62)	1.21(0.27-5.39)	0.80
<b>Alelos</b>				<b>Alelos</b>			
A	132(82)/246(74)	1		G	137(86)/257(77)	1	
G	28(18)/86(26)	0.68(0.38-1.22)	0.20	A	23(14)/75(23)	0.71(0.38-1.32)	0.28
<b>p EHW**</b>			0.72	<b>p EHW**</b>			0.26

a. Razones de Momios ajustadas por edad

\*\* Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg en controles.

\*p<0.05

## 5. Análisis de asociación del nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y a nivel de cérvix con LEI

Los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel sistémico se muestran en la figura 18. Los niveles promedio de expresión del ARNm de IL-10 relativo a HPRT1 fueron más altos en pacientes con LEI (1.18).

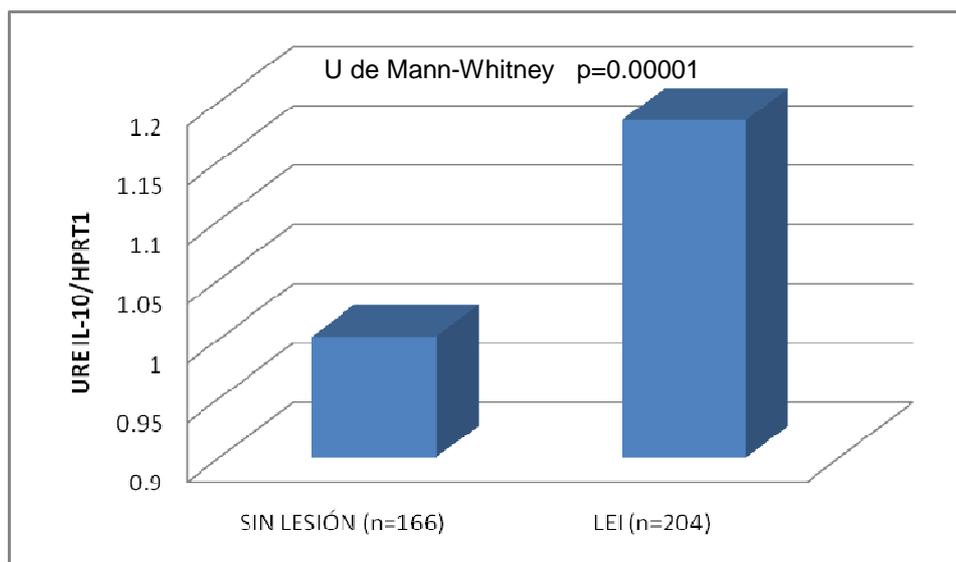


Figura 18. Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel sistémico en mujeres con LEI versus sin LEI.

Al evaluar la asociación entre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y a nivel de cérvix con LEI, la diferencia estimada de medias de URE entre el grupo sin lesión y con LEI fue de 0.13 unidades a nivel sistémico y de 0.52 unidades a nivel local (cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de asociación de la expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y a nivel local en lesiones intraepiteliales de cuello uterino (LEI)

URE	LEI (n=204) versus no LEI (n=166)		
	$\beta$ a (IC95%)	Valor p*	R <sup>2</sup>
A nivel sistémico	0.13 (0.09-0.18)	<b>0.001</b>	0.12
A nivel local	0.52 (0.44-0.59)	<b>0.001</b>	0.44

a. Coeficientes  $\beta$  de regresión lineal ajustados por edad y genotipo VPH

URE: Unidades relativas de expresión

Los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel de cérvix fueron más bajos que a nivel sistémico tanto en mujeres con LEI (1.12 vs. 1.18) como sin LEI [0.42 vs. 1.00] (figura 19).

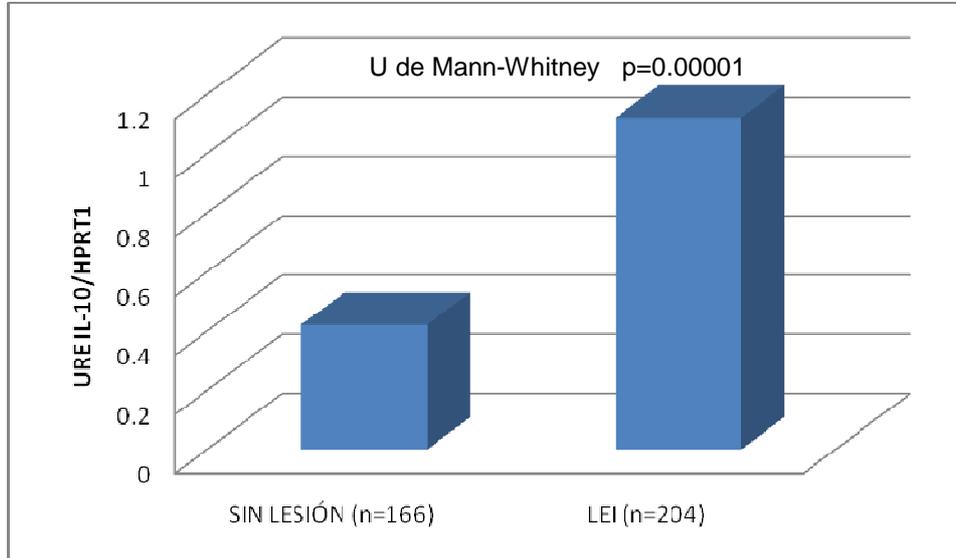


Figura 19. Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel de cérvix en mujeres con LEI versus sin LEI.

## 6. **Análisis de asociación del nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y a nivel de cérvix con CaCU**

Los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel sistémico se muestran en la figura 20. Los niveles promedio de expresión del ARNm de IL-10 relativo a HPRT1 fueron más altos en pacientes con CaCU (1.31).

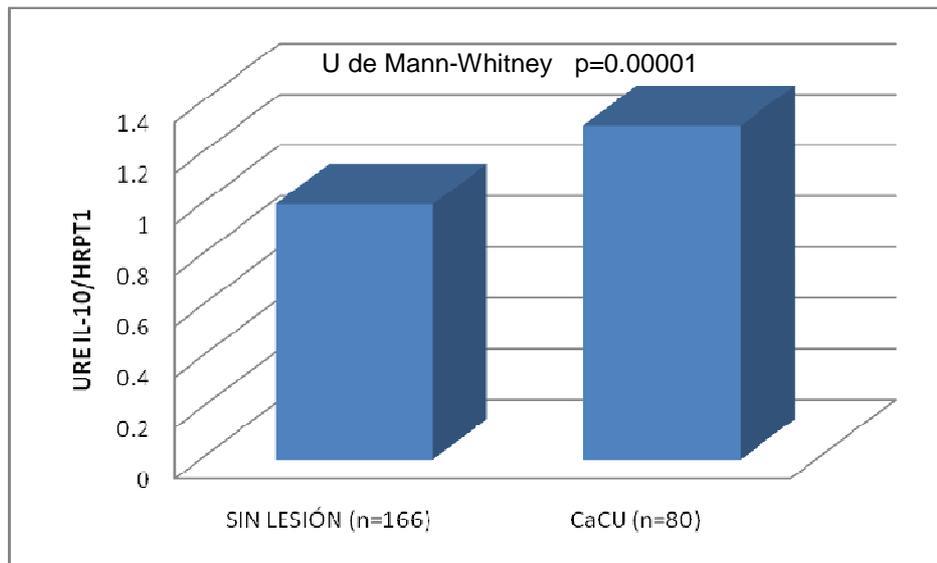


Figura 20. Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel sistémico en mujeres con CaCU versus sin LEI.

Al evaluar la asociación entre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y a nivel de cérvix con CaCU, la diferencia estimada de medias de URE entre el grupo sin lesión y con CaCU fue de 0.30 unidades a nivel sistémico y de 0.95 unidades a nivel local (cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de asociación de la expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y a nivel local en cáncer cervicouterino (CaCU)

URE	CaCU (n=80) versus no LEI (n=166)		
	$\beta$ a (IC95%)	Valor p*	R <sup>2</sup>
A nivel sistémico	0.30 (0.25-0.36)	<b>0.001</b>	0.42
A nivel local	0.95 (0.84-1.05)	<b>0.001</b>	0.66

a. Coeficientes  $\beta$  de regresión lineal ajustados por edad

URE: Unidades relativas de expresión

Los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel de cérvix fueron más altos que a nivel sistémico en mujeres con CaCU (1.45 vs. 1.31) y más bajos en las mujeres sin LEI [0.42 vs. 1.00] (figura 21).

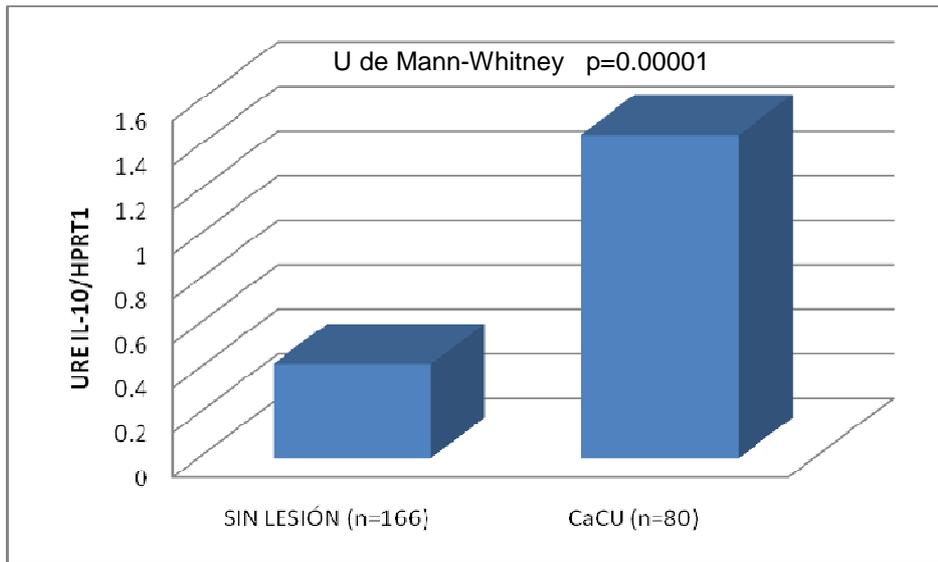


Figura 21. Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel de cérvix en mujeres con CaCU versus sin LEI.

### 7. Análisis del nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y en cérvix en mujeres con LEI y CaCU versus sin LEI

Los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel sistémico se muestran en la figura 22. Los niveles promedio de expresión del ARNm de IL-10 relativo a HPRT1 fueron progresivamente más altos a medida que aumentó el grado de malignidad.

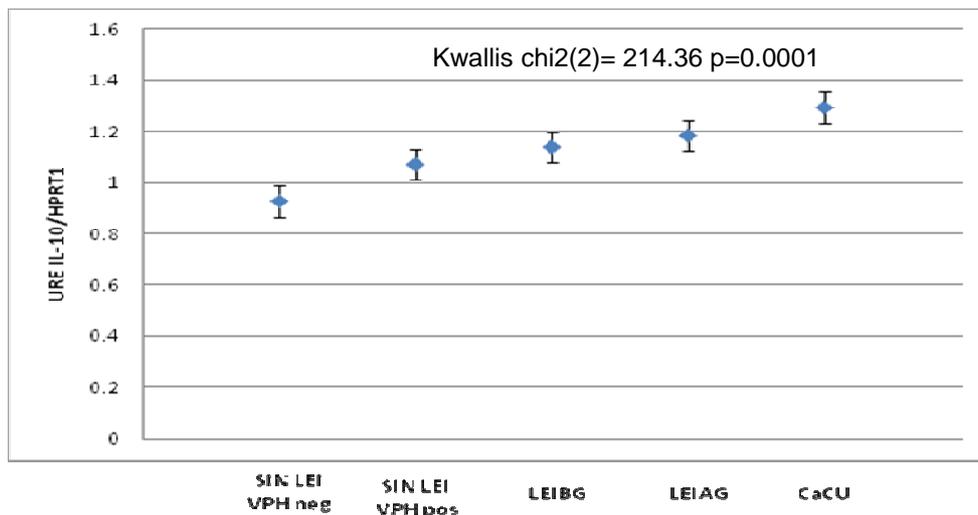


Figura 22. Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel sistémico en mujeres con LEI estratificado por grado de lesión y CaCU versus sin LEI.

Los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel de cérvix fueron más altos que a nivel sistémico sólo en las mujeres con CaCU. Los niveles fueron más bajos en cérvix con respecto a nivel sistémico en los demás grupos, siendo esta diferencia más marcada en el grupo sin LEI (figura 23).

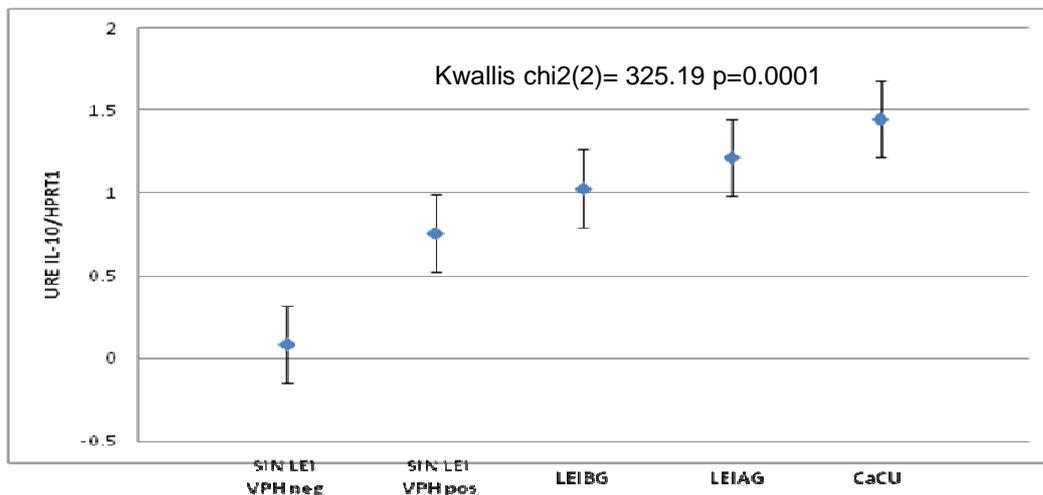


Figura 23. Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel de cérvix en mujeres con LEI estratificada por grado de lesión y CaCU versus sin LEI.

### 8. Análisis de asociación del nivel sérico de IL-10 con LEI

Los niveles promedio de proteína de IL-10 a nivel sérico tanto en mujeres sin LEI como con LEI se muestran en la figura 24. Los niveles promedio de expresión de proteína de IL-10 a nivel sérico fueron más altos en LEI (2.06 pg/ml).

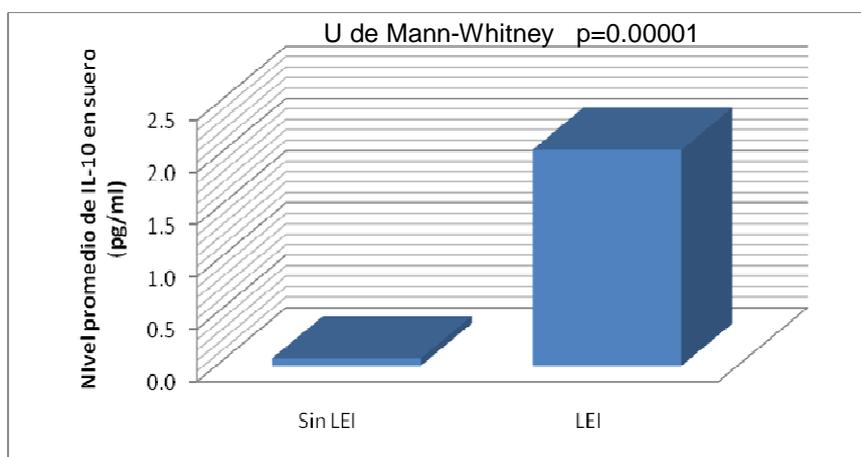


Figura 24. Niveles de proteína de IL-10 a nivel sérico en mujeres con LEI versus sin LEI.

Al evaluar la asociación entre el nivel de proteína de IL-10 sérico con LEI, la diferencia estimada de medias de proteína de IL-10 a nivel sérico entre el grupo sin lesión y con LEI fue de 1.86 unidades (cuadro 12).

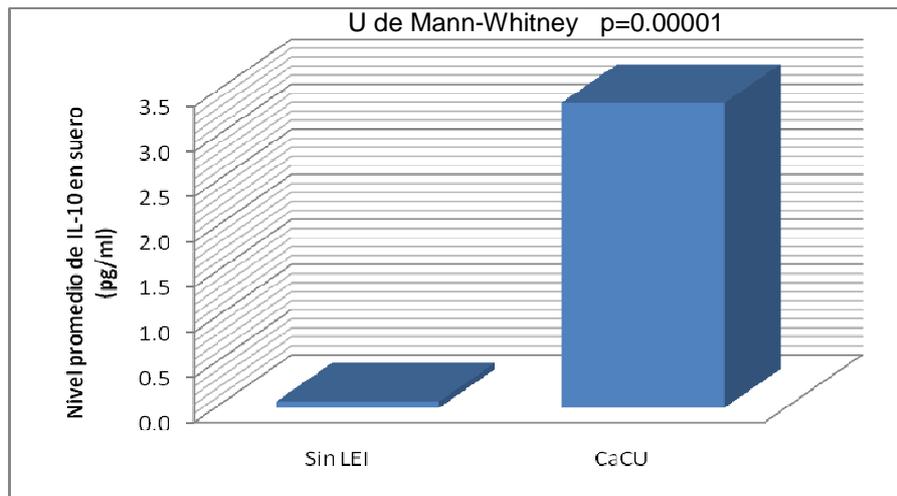
**Cuadro 12. Análisis de asociación del nivel sérico de proteína de IL-10 con lesiones intraepiteliales de cuello uterino (LEI)**

Nivel de proteína de IL-10 (pg/ml)	LEI (n=204) versus no LEI (n=166)		
	$\beta$ a (IC95%)	Valor p*	R <sup>2</sup>
	1.86 (1.69-2.03)	<b>0.0001</b>	0.58

a. Coeficientes  $\beta$  de regresión lineal ajustados por edad y genotipo VPH

### 9. Análisis de asociación del nivel sérico de IL-10 con CaCU

Los niveles promedio de proteína de IL-10 a nivel sérico tanto en mujeres sin LEI como con CaCU se muestran en la figura 25. Los niveles promedio de expresión de proteína de IL-10 a nivel sérico fueron más altos en LEI (3.38 pg/ml).



**Figura 25. Niveles de proteína de IL-10 a nivel sérico en mujeres con CaCU versus sin LEI.**

Al evaluar la asociación entre el nivel de proteína de IL-10 sérico con CaCU, la diferencia estimada de medias de proteína de IL-10 a nivel sérico entre el grupo sin lesión y con CaCU fue de 3.55 unidades (cuadro 13).

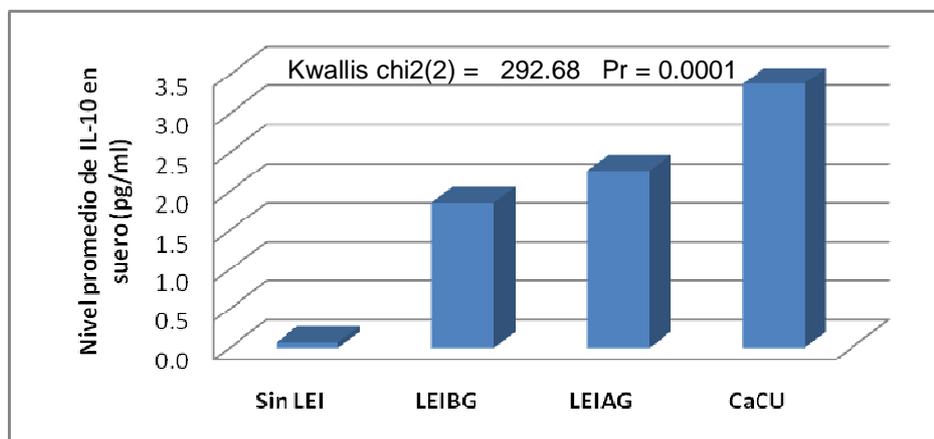
**Cuadro 13. Análisis de asociación del nivel sérico de proteína de IL-10 con cáncer cervicouterino (CaCU)**

Nivel de proteína de IL-10 (pg/ml)	CaCU (n=80) versus no LEI (n=166)		
	$\beta$ (IC95%)	Valor p*	R <sup>2</sup>
	3.55 (3.22-3.87)	<b>0.0001</b>	0.71

a. Coeficientes  $\beta$  de regresión lineal ajustados por edad

### 10. Análisis del nivel sérico de IL-10 en mujeres con LEI y CaCU versus sin LEI

Al evaluar los niveles de proteína de IL-10 en suero en mujeres con LEI estratificada por grado de lesión y CaCU se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.0001$ ) (figura 26).



**Figura 26. Niveles promedio de IL-10 en suero en mujeres con LEI estratificada por grado de lesión y CaCU versus sin LEI.**

### 11. Análisis de interacción

Al evaluar la interacción entre cada uno de los SNPs -592, -819, -1082 y -1352 con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en los casos de LEI (Anexo 4) y CaCU (Anexo 5), no se encontró interacción estadística. Al evaluar la interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en los casos de LEI (Anexo 6) y CaCU (Anexo 7), no se encontró interacción estadística.

## 12. Análisis de asociación de la carga de alelos de riesgo de los SNP`s -592/-819/-1082/-1352 con lesiones intraepiteliales de cuello uterino

El análisis de asociación de la carga de alelos de riesgo con LEI se presenta en el cuadro 14. Tras este análisis se encontró que portar tres o más alelos de riesgo para los SNP`s -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10, implica poseer dos veces más posibilidades de tener LEI.

Cuadro 14. Carga de los alelos de riesgo de los SNPs -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10 en LEI

Número de alelos asociados a LEI	n			ORa.	IC 95%	Valor p*
	Total	LEI	No LEI			
0	372	174	198	1	-	
1	280	127	153	1.07	0.78-1.47	0.66
2	38	17	21	1.17	0.58-2.33	0.65
≥3	50	14	36	<b>2.58</b>	1.33-5.00	<b>0.005</b>
<b>P de tendencia</b>						<b>0.014</b>

n= número de alelos

a. Razones de momios ajustadas por edad y genotipo de VPH

\*p<0.05

## 13. Análisis de asociación de la carga de alelos de riesgo con cáncer cervicouterino

El análisis de asociación de la carga de alelos de riesgo con CaCU se presenta en el cuadro 15. Tras este análisis se encontró que portar tres o más alelos de riesgo para los SNP`s -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10, implica poseer tres veces más posibilidades de tener CaCU.

Cuadro 15. Carga de los alelos de riesgo de los SNPs -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10 en CaCU

Número de alelos asociados a CaCU	n			ORa	IC 95%	Valor p*
	Total	LEI	No LEI			
0 a 1	256	174	82	1	-	
2	185	130	55	0.92	0.46- 1.84	0.81
≥3	51	28	23	<b>3.31</b>	1.03-10.57	<b>0.04</b>
<b>P de tendencia</b>						0.14

n= número de alelos

a. Razones de momios ajustadas por edad y genotipo de VPH

\*p<0.05

## **XII. Discusión**

Para el desarrollo del CaCU, la infección persistente por un VPH-AR es una causa necesaria pero no suficiente, de tal manera que se requiere la combinación de varios factores de riesgo para que se desarrolle la enfermedad. El genotipo de VPH más prevalente en la población de estudio fue el VPH-16 (42%), similar a otros estudios reportados en población femenina mexicana.<sup>158-160</sup> La co-infección con tres o más genotipos de VPH fue mayor en mujeres con LEIBG, cuya edad promedio fue de 35 años de edad, por lo que podría explicarse el predominio de co-infección en este grupo de pacientes al tener una mayor exposición a infección por VPH y reinfección con otros genotipos al estar en una etapa sexualmente activa.

La asociación encontrada en este estudio para las variables edad de inicio de vida sexual, nivel socioeconómico bajo, multiparidad, consumo de contraceptivos y antecedentes de ETS confirman la asociación conocida y reportada en estudios epidemiológicos previos.<sup>159</sup> La conducta individual de las personas en el terreno de la sexualidad, condiciona la probabilidad de infección por VPH. Mujeres que inician su vida sexual activa antes de los 20 años de edad, tienen mayor actividad sexual y, por consiguiente, más tiempo de exposición y probabilidad de estar en contacto con un VPH-AR y presentar co-infecciones con otras ETS. El uso de anticonceptivos hormonales por dos o más años ha sido sugerido como un factor de riesgo potencial para displasia cervical, dado que puede generarse cambios en las propiedades químicas y físicas del mucus cervical y puede facilitarse la entrada de mutágenos y generar alteración de la respuesta inmune local que incrementa la susceptibilidad a agentes virales.<sup>161,162</sup> Así mismo, se ha reportado que hormonas sexuales pueden aumentar la transcripción del VPH.<sup>163,164</sup> Por otro lado, la literatura indica que los niveles socioeconómicos bajos, impiden el acceso a los servicios de salud y, por ende, a la detección temprana de la enfermedad.<sup>165</sup>

### **A**sociación de los polimorfismos -592, -819, -1082, -1352 en pacientes con LEI y CaCU versus sin LEI

Se ha demostrado que la habilidad de un individuo para producir niveles altos o bajos de citocinas puede estar genéticamente predeterminada.<sup>166,167</sup> Estudios hechos en gemelos han demostrado que al menos 50% de la producción de IL-10 esta influenciada por factores genéticos.<sup>168,169</sup> Los polimorfismos que flanquean la región 5' del gen de IL-10 pueden genéticamente afectar las diferencias inter-individuales en la producción de IL-10. Tres polimorfismos bi-alélicos dentro del

promotor de IL-10, en las posiciones -592, -819 y -1082 desde el sitio de inicio de la transcripción han sido previamente identificados.<sup>170</sup>

El polimorfismo localizado a 592 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (algunas veces referido como -627), fue descrito como un cambio de C por A (transversión sustitución) en el promotor de IL-10, el cual está localizado dentro de unas secuencias consenso de unión putativas para Sp1 y para proteínas de la familia Ets, en una región que ejerce una función reguladora negativa de la expresión de IL-10.<sup>171</sup> El polimorfismo localizado a 819 pb del sitio de inicio de la transcripción es una transición sustitución de C por T, localizado en una secuencia consenso a la que se une un elemento de respuesta a estrógenos (EREs).<sup>172,173</sup> El polimorfismo localizado a 1082 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción es una transición sustitución de A por G (algunas veces referido como -1087), dentro de un sitio de unión putativo del factor de transcripción similar a ETS. La secuencia de ADN que flanquea esta posición contiene un motivo GGAA/G, el cual corresponde a una secuencia consenso común a la familia de factores de transcripción ETS.<sup>172</sup> Una correlación entre este genotipo y la producción de IL-10 in vitro ha sido reportado, en particular, el alelo G ha sido asociado con un fenotipo productor de IL-10 alto comparado con el alelo A.<sup>174</sup>

Los otros cuatro SNPs analizados en este estudio no han sido estudiados previamente. El SNP -657 es una transición sustitución de A por G contiguo a una caja PU, sitio donde se une el factor de transcripción PU.1, específico del linaje mielo-monocítico y que está implicado en la proliferación y diferenciación de macrófagos.<sup>175</sup> El SNP -1352 es una transición sustitución de A por G localizado adyacente a la secuencia CCTCCT, la cual es una secuencia consenso reconocida por los factores de transcripción Sp1 y Sp3.<sup>117</sup> El SNP -2025 es una transición sustitución de A por G localizado contiguo a una secuencia consenso rica en G+C (caja GC).<sup>117</sup> El SNP -4168 C/G es una transversión sustitución localizada en la secuencia ACCN6GGT, sitio de reconocimiento putativo de la oncoproteína E2 en el promotor de IL-10.<sup>172</sup> Nuestro grupo de investigación encontró que la oncoproteína E2 tiene la propiedad de inducir la actividad promotora de IL-10 al reconocer la secuencia putativa antes mencionada en el promotor de IL-10. Lo que sugiere que la oncoproteína E2 puede inducir la expresión de IL-10 in vivo.<sup>150</sup> De tal manera, que el SNP -4168 podría tener un papel potencial al afectar la afinidad de unión de la oncoproteína E2 a la secuencia consenso.

## **Polimorfismo -592 C/A y su asociación con LEI y CaCU**

Previamente, Hobbs y colaboradores describieron este SNP C/A localizado entre una secuencia consenso de unión para Sp1 y una secuencia putativa a la reconocida por miembros de la familia de proteínas Ets (AGGAA). Este polimorfismo está ubicado en una región de regulación negativa y está asociado con pérdida de esta actividad.<sup>171</sup> Steinke y colaboradores, fueron los primeros en demostrar que el cambio del nucleótido C por A resulta en un aumento de la actividad promotora, lo que apoya su papel como un elemento represor. La unión específica de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 fue demostrada en una región inmediatamente corriente arriba del polimorfismo. Sp1 es un factor ubicuo que ha mostrado ser importante tanto para la activación como para la represión transcripcional. La región incluye un sitio Sp1/Sp3 y el polimorfismo adyacente funciona como un represor, de tal manera que el cambio de base de C por A libera la represión mediada por Sp1.<sup>176</sup> Un trabajo previo de nuestro grupo de investigación reportó que el factor de transcripción Sp1 se une a las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 y sobrerregula la expresión de TGFβ1 a través de una secuencia consenso GGGGCGG localizada de -180 a -172 en el promotor de TGFβ1. Por lo tanto, nosotros hipotetizamos que las oncoproteínas E6 y E7 pueden subregular la expresión de IL-10.<sup>177</sup>

El SNP -592 C/A ha sido relacionado con un incremento en la severidad de algunas enfermedades autoinmunes que incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria del intestino,<sup>173,178-181</sup> y ha sido asociado con cambios en la tumorigénesis y tolerancia al trasplante<sup>182</sup> y a la progresión rápida a SIDA en individuos infectados con VIH.<sup>183</sup> Sin embargo, a la fecha hay pocos estudios del papel de este SNP en LEI y CaCU. El presente estudio demostró tras el análisis de asociación de los polimorfismos en la región promotora de IL-10 en pacientes con LEI y CaCU, que individuos que portaron al menos una copia del alelo de riesgo A del SNP -592, presentaron una RM de 2.02 (IC95% 1.26-3.25 p<0.003) para LEI y una RM de 1.70 (IC95% 1.06-2.71 p<0.02) para CaCU. De tal manera, que una copia del alelo de riesgo A es suficiente para incrementar el riesgo de tener LEI y CaCU y el ser portador de dos copias de este alelo modifica en igual magnitud este riesgo. Un estudio de casos y controles realizado en 311 casos de neoplasia intraepitelial cervical, 695 casos de CaCU, 115 controles basados en familias y 586 controles no relacionados, en población caucásica, reveló la misma asociación, un riesgo incrementado para NIC II y III (OR 1.44 [1.06–1.97]) y carcinoma celular escamoso de cérvix (OR 1.35 [1.04–1.75]) en individuos heterocigotos para este SNP.<sup>184</sup>

## **Polimorfismo -819 C/T y su asociación con LEI y CaCU**

Este SNP está localizado en una secuencia consenso (AGGTCAnnnTGACCT) a la cual se une un elemento de respuesta a estrógenos (EREs) en el promotor del gen de IL-10.<sup>172,173,185</sup> Algunos estudios han demostrado que los estrógenos regulan la expresión génica de citocinas en diferentes tipos de células, vía ER, directamente a través de EREs o indirectamente a través de la interacción de ER con otros factores de transcripción que incluyen NF-kB y AP-1.<sup>186,187</sup> En contraste con el análisis en LEI, el SNP -819 C/T resultó asociado significativamente con CaCU. Individuos que portaron al menos una copia del alelo de riesgo T, presentaron una RM de 3.44 (IC95% 1.35-8.73  $p < 0.001$ ), de tal forma, que una copia del alelo de riesgo T es suficiente para incrementar el riesgo de tener CaCU.

Con respecto a la asociación de este SNP con el uso de anticonceptivos hormonales, cabe destacar que el grupo de LEIAG, fue el grupo que reportó en mayor proporción el consumo de anticonceptivos hormonales por periodos de 6 meses a 5 años. No fue posible establecer asociación de este SNP con el uso de anticonceptivos hormonales en el grupo de mujeres con CaCU, dado que en la mayoría de casos no se refirió el uso de algún anticonceptivo hormonal. En estudios previos reportados en literatura sobre asociación de este polimorfismo con enfermedades infecciosas, cáncer o enfermedades autoinmunes en las cuales esta citocina está involucrada, se ha reportado asociación de este SNP con tres entidades de tipo infeccioso: sepsis,<sup>188</sup> lepra<sup>189</sup> y leishmaniasis.<sup>190</sup>

Este SNP está localizado en un área de regulación transcripcional positiva, de tal manera que este polimorfismo bloquea esta función regulatoria positiva para ejercer un efecto de regulación negativa, al alterar la afinidad de unión de factores de transcripción nucleares. Estudios realizados en lepra han reportado que individuos portadores del genotipo C/C son productores altos de IL-10 tras el estímulo con ocho bacilos por ml, más que los portadores del alelo T (C/T y T/T). Por el contrario, los niveles de IL-10 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con lipopolisacárido y fitohemaglutinina no varían para ninguno de los genotipos.<sup>191</sup> Este SNP se ha asociado con susceptibilidad a lepra con ORs de 1.29 (IC 95%, 1.12-1.49,  $p < 0.000$ ), 1.28 (IC 95%, 1.03-1.59,  $p < 0.023$ ), y 1.66 (IC 95%, 1.28-2.15,  $p < 0.000$ ), para el alelo T, portadores del alelo T y del genotipo TT, respectivamente.<sup>191,192</sup> Portadores del alelo T de este SNP, han sido asociados con bajos niveles de IL-10 y cuadros más agresivos de leishmaniasis.<sup>190</sup>

## **Polimorfismos -1082 A/G y -1352 A/G y su asociación con LEI y CaCU**

La secuencia contigua al polimorfismo -1082 de la región promotora de IL-10 contiene un motivo GGAA/G, el cual corresponde a una secuencia consenso común a la familia de factores de transcripción ETS. Los factores de transcripción de la familia Ets son reguladores clave de genes involucrados en la respuesta inmune y la proliferación celular.<sup>172</sup> Estudios previos han demostrado que los factores de transcripción PU.1 y Spi-B en células B y monocitos TPH1 se unen a la secuencia contigua al SNP -1082 en la región promotora de IL-10.<sup>193</sup> El alelo A confiere en monocitos THP1 una afinidad de unión óptima para el factor de transcripción PU.1 el cual inhibe la expresión génica. Por lo tanto, PU.1 actúa como un represor de la transcripción de IL-10 en células TPH1.<sup>169</sup> En contraste, en células B el cambio del nucleótido A por G resulta en la unión del factor de transcripción Sp1 a este sitio e incrementa la actividad promotora luego de la estimulación con lipopolisacáridos.<sup>194</sup>

En el presente estudio no encontramos evidencia de alguna asociación del polimorfismo -1082 con LEI y CaCU en población mexicana, al igual que los estudios realizados por Zoodsma y colaboradores en población caucásica,<sup>184</sup> y contrario a estudios previos realizados en la población étnica Shona<sup>195</sup> y población Koreana en casos de CaCU.<sup>196</sup> Los estudios reportados en la literatura sobre asociación de este SNP con la actividad transcripcional de IL-10 son conflictivos. Algunos grupos han encontrado una correlación entre el alelo A y la producción de IL-10 alta en ensayos de estimulación *in vitro*.<sup>170,197</sup> Rees y colaboradores, demostraron una asociación del alelo A con un incremento de dos veces más en la actividad transcripcional al compararlo con el alelo G, al usar transfecciones transientes en una línea celular de células B humanas transformadas con el virus Epstein-Barr.<sup>198</sup> Por el contrario, otros grupos han reportado asociación del alelo G del SNP -1082 más que el alelo A con niveles de proteína de IL-10 elevados.<sup>199</sup>

Con respecto al SNP -1352 A/G, no hay estudios previos de este polimorfismo con LEI y CaCU. Este polimorfismo está localizado adyacente a una secuencia consenso CCTCCT, que es reconocida por los factores de transcripción Sp1 y Sp3.<sup>117</sup> En este estudio el SNP -1352 A/G no fue asociado con LEI ni con CaCU y se encontró en desequilibrio de ligamiento con el SNP -1082 A/G. Los tres polimorfismos restantes que se analizaron, -657 A/G, -2025 A/G y -4168 G/C no fueron polimórficos en la población mexicana. Al realizar el análisis por haplotipos de los SNPs -1082/-819/-592 en LEI y CaCU, el haplotipo (ACC/ATA) fue el haplotipo más común seguido del heterocigoto (ACC/GTA) y el homocigoto (ATA/ATA); sin embargo, ninguno de los haplotipos fue asociado con

susceptibilidad a la enfermedad. Contrario a otros reportes en la literatura,<sup>184</sup> en este estudio no se encontró el haplotipo GCC. Reportes previos describen a este haplotipo asociado a niveles altos de IL-10 comparado con los haplotipos ACC y ATA en caucásicos.<sup>170,174</sup>

## **Análisis del nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y en cérvix y el nivel sérico de IL-10 en mujeres con LEI y CaCU versus sin LEI**

### **Expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico**

Los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel sistémico fueron progresivamente más altos a medida que aumentaba el grado de malignidad de la lesión. Sin embargo, niveles muy bajos casi indetectables se presentaron en algunos casos de LEI a diferencia del grupo de CaCU, donde los niveles de IL-10 a nivel sistémico fueron detectables totalmente. En estudios previos, tras la estimulación con mitógenos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lesiones precancerosas y cáncer invasivo, la producción de IL-1 $\alpha$ , IL-2 e INF- $\gamma$  está disminuida, en contraste con la elevada producción de IL-4 e IL-10.<sup>55,58,200</sup> Adicionalmente, ha sido reportado que ciertos tumores sólidos pueden inducir la producción de IL-10 por células mononucleares de sangre periférica.<sup>201,202</sup>

### **Nivel de proteína de IL-10 a nivel sérico**

Al evaluar los niveles de proteína de IL-10 en suero en mujeres con LEI estratificada por grado de lesión y CaCU se observaron diferencias significativas entre los grupos, siendo prácticamente indetectable la proteína a nivel sérico en mujeres sin LEI. En mujeres con infección por VPH han sido reportados porcentajes altos de linfocitos T IL-10 positivos a nivel sistémico más que en mujeres sanas y la progresión del CaCU ha sido asociada con niveles séricos de IL-10 aumentados.<sup>106</sup> El aumento de los niveles de IL-10 circulantes en pacientes con LEI pueden tener implicaciones importantes para investigaciones futuras, el monitoreo inmunológico y la intervención terapéutica en pacientes con LEI y CaCU.<sup>203</sup>

### **Expresión del ARNm de IL-10 a nivel local (cervix)**

Durante el desarrollo del CaCU, se ha demostrado la generación de un microambiente tumoral de inmunosupresión que contribuye a la progresión del CaCU.<sup>54</sup> La respuesta inmune celular es la responsable de la eliminación de células tumorales e infectadas por virus. En pacientes con CaCU, existe una marcada deficiencia en la respuesta inmune celular local, manifestada por la disminución de la presencia de citocinas que inducen actividad antitumoral (Th1) y la reducción o pérdida de moléculas del CMH clase I lo cual provoca una deficiente presentación de antígenos a los linfocitos T citotóxicos. De la misma manera, se expresan y se reprimen diversos genes que son importantes para la célula tumoral y para la respuesta inmune. Así, la progresión del tumor está asociada a la presencia de citocinas inmunosupresoras como IL-10. Los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel de cervix fueron más bajos que a nivel sistémico tanto en mujeres con LEI como en mujeres sin LEI, siendo esta diferencia más marcada en el grupo sin LEI. Por el contrario, los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con HPRT1 a nivel de cervix fueron más altos que a nivel sistémico en las mujeres con CaCU. Adicionalmente, los niveles de ARNm de IL-10 fueron indetectables en la mayoría de mujeres sin LEI y en algunos casos de LEI, a diferencia del grupo de CaCU, donde los niveles de IL-10 a nivel de cervix fueron detectables en su totalidad.

El hecho de que en un cervix normal, IL-10 sea indetectable, sugiere que el epitelio cervical normal no tiene suficientes células productoras de IL-10 como monocitos, linfocitos B, linfocitos T Th2 para alcanzar el nivel de detección. En una LEI el aumento del nivel de esta citocina inmunomoduladora se localiza en la zona de transformación.<sup>204</sup> La expresión preferencial de IL-10 en la zona de transformación en algunos pacientes, puede contribuir a la iniciación de una LEI al permitir al VPH evadir los mecanismos de vigilancia inmunológica innata.<sup>34</sup> En contraste, otros estudios han reportado que las células productoras de IL-10 están localizadas en la zona subepitelial. En una LEIAG, el ARNm de IL-10 estromal es probable que provenga de linfocitos T o macrófagos más que de linfocitos B, los cuales se encuentran en un cervix normal en una pequeña proporción.<sup>54,155</sup> De Gruijl y colaboradores, sugieren que el ARNm de IL-10 detectado en biopsias de cervix es producido principalmente por células T.<sup>59</sup> Sin embargo, al-Saleh y colaboradores reportaron un incremento en el número de macrófagos en LEI y sugirieron a estas células como una fuente potencial de IL-10 en este tipo de lesiones.<sup>205</sup> La producción anormal de IL-10 a nivel local ha sido previamente descrita en pacientes con lesiones pre-cancerosas y cáncer invasivo.<sup>206,207</sup>

Ming-Y y colaboradores, evaluaron la presencia de citocinas en lavados cérvico vaginales de voluntarias sanas (n=22), pacientes con neoplasia intraepitelial cervical NIC (n=63) y pacientes con CaCU (n=33). Los niveles de IL-12p40, IL-10, TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  fueron significativamente más altos en pacientes con CaCU con respecto a controles y pacientes con LEI y el nivel de ciclooxigenasa (CoX-2) expresada altamente en CaCU sugirió ser la causa del desbalance de las citocinas in vivo que resultan en una sobreexpresión de IL-10 e inhibición de IL-12.<sup>208</sup> Azar y colaboradores, analizaron los niveles de TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-6 e IL-10 en 120 mujeres japonesas citológicamente normales y 91 anormales. Los niveles de IL-10 y TNF $\alpha$  fueron estadísticamente más altos en LEIBG y LEIAG, respectivamente. Los niveles de INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  se correlacionaron negativamente con IL-6 e IL-10 en sujetos VPH positivos normales y sujetos con LEIBG, mientras que esta correlación no fue observada para LEIAG.<sup>209</sup>

En CaCU, nuestro grupo de investigación reportó en un estudio previo, una correlación alta entre la inmunotinción de IL-10 y el nivel de expresión del ARNm de IL-10 en biopsias de cérvix, donde es característico un estado de inmunosupresión local in vivo, caracterizado por una disminución de citocinas Th1, y por la presencia de citocinas tipo Th2: IL-10, y TGF- $\beta$ 1, producidas por células tumorales,<sup>57</sup> e inducidas por proteínas del VPH,<sup>150</sup> que sugieren que la infección por VPH induce la transcripción de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$  como un mecanismo para evadir la respuesta inmune.<sup>79</sup> De igual manera, se observó una elevada expresión de IL-4, producidas por células infiltrantes del tumor, macrófagos y linfocitos T.<sup>57</sup>

Esta inmunosupresión produce disminución de la activación de los linfocitos T CD8+, células que participan en la eliminación del tumor. Una de las causas de ésta disminución, es la nula expresión de moléculas involucradas en la transducción de señales de la activación de los linfocitos T.<sup>58</sup> Se ha identificado igualmente, que proteínas del VPH inducen la expresión de TGF- $\beta$ 1<sup>177</sup> e IL-10.<sup>150</sup> Por lo tanto, el gran reto ahora es revertir el estado de inmunosupresión local y activar a la respuesta inmune anti-tumoral para garantizar la eliminación de los tumores, mediante la aplicación de inmunoterapia con citocinas activadoras de la respuesta inmune anti-tumoral.<sup>210</sup>

### **Análisis de interacción entre las frecuencias genotípicas de los polimorfismos -592, -819, -1082 y -1352 con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en pacientes con LEI y CaCU**

Al evaluar la interacción entre cada uno de los SNPs con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en los casos de LEI y CaCU, no se encontró interacción estadística, es decir, no se modificó el efecto de cada uno de los genotipos evaluados sobre el evento (tener o no lesión). El único estudio previo que ha evaluado la asociación de polimorfismos de IL-10 con el nivel sistémico de IL-10 es el estudio realizado por Roh y colaboradores, un estudio de casos y controles en mujeres coreanas, donde no se encontró asociación de los polimorfismos -1082, -819 y -592 con CaCU invasivo en comparación con los controles y la concentración en suero de IL-10 no estuvo influenciada por ninguno de los genotipos.<sup>196</sup>

### **Análisis de interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en pacientes con LEI y CaCU**

Cuando se evaluó la interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en los casos de LEI y CaCU, no se encontró interacción estadística; de tal manera que, no se modificó el efecto de cada uno de los genotipos evaluados sobre el evento (nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico).

### **Análisis de asociación de la carga de alelos de riesgo de los SNP`s -592/-819/-1082/-1352 con con LEI y CaCU**

Para evaluar la asociación de la carga de alelos de riesgo de estos SNP`s con LEI y CaCU se realizó un análisis de sinergismo para estimar el efecto combinado de tener portar más de un alelo de riesgo con el riesgo de tener tanto LEI como CaCU. Para el caso de LEI, se observó una p de tendencia significativa y se encontró que que portar tres o más alelos de riesgo para los SNP`s -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10, es suficiente para incrementar el riesgo de tener LEI y CaCU.

### **XIII. Conclusiones**

Este trabajo de investigación se realizó con el objeto de determinar si los polimorfismos de la región promotora de IL-10 pueden asociarse con la susceptibilidad a desarrollar LEI y CaCU y si pueden influir en la expresión diferencial de IL-10 a nivel sistémico y a nivel local.

Las conclusiones de esta investigación son:

1. Se demostró tras el análisis de asociación de los polimorfismos en la región promotora de IL-10 en pacientes con LEI y CaCU, que individuos que portaron al menos una copia del alelo de riesgo A del SNP -592, presentaron una RM de 2.02 (IC95% 1.26-3.25  $p < 0.003$ ) para LEI y una RM de 1.70 (IC95% 1.06-2.71  $p < 0.02$ ) para CaCU. De tal manera, que una copia del alelo de riesgo A es suficiente para incrementar el riesgo de tener LEI y CaCU y el ser portador de dos copias de este alelo modifica en igual magnitud este riesgo.
2. En contraste con el análisis en LEI, el SNP -819 C/T resultó asociado significativamente con CaCU. Individuos que portaron al menos una copia del alelo de riesgo T, presentaron una RM de 3.44 (IC95% 1.35-8.73  $p < 0.001$ ), de tal forma, que una copia del alelo de riesgo T es suficiente para incrementar el riesgo de tener CaCU.
3. A pesar del poder estadístico calculado para cada uno de los SNP's, las asociaciones significativas encontradas para el SNP -592 con LEI y CaCU y para el SNP -819 con CaCU, demuestran que estos dos SNP's son candidatos potenciales para predecir el riesgo de tener LEI y CaCU. Lo que permitirá identificar poblaciones susceptibles de padecer esta enfermedad y así poder direccionar a estas poblaciones los programas de prevención temprana de la misma.
4. Al evaluar la interacción entre cada uno de los SNPs con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en los casos de LEI y CaCU, no se encontró interacción estadística, es decir, no se modificó el efecto de cada uno de los genotipos evaluados sobre el evento (tener o no lesión).
5. Cuando se evaluó la interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico en los casos de LEI y CaCU, no se encontró interacción estadística; de tal manera que, no se modificó el efecto

de cada uno de los genotipos evaluados sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico.

6. Al evaluar la asociación de la carga de alelos de riesgo de los -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10 con LEI y CaCU, se encontró que portar tres o más alelos de riesgo para estos SNP`s, es suficiente para incrementar el riesgo de tener LEI y CaCU.
7. Los polimorfismos -592 C/A y -819 C/T pueden ser SNP`s candidatos para la regulación de la producción de esta citocina tanto a nivel local como a nivel sistémico, al estar localizados en regiones de unión de factores de transcripción claves para la regulación de la expresión de IL-10 en la región promotora de este gen.
8. Se demostró una diferencia significativa en el nivel de expresión del ARNm de IL-10 tanto a nivel sistémico como a nivel de cérvix, así como en el nivel sérico de la proteína de IL-10 en mujeres con LEI y CaCU en comparación con mujeres sin LEI. Los niveles tanto del ARNm como de proteína de IL-10 fueron progresivamente más altos a medida que aumentaba el grado de malignidad de la lesión, por lo que la presencia de IL-10 puede considerarse como un factor importante para la persistencia viral y la progresión de la enfermedad.
9. La principal fortaleza de esta investigación es que fue un estudio que combinó el análisis de genotipos de IL-10 con el análisis de expresión génica. De tal manera, que puede contribuir al conocimiento del papel biológico de IL-10 en el desarrollo de LEI y CaCU.

#### **XIV. Bibliografía**

1. OMS. Integración de la atención sanitaria para la salud sexual y reproductiva y las enfermedades crónicas. Control integral del CaCU. Guía de prácticas esenciales. 2007: 281.
2. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Versión 1.0. IARC Cancer Base N.o 5. Lyon: IARC Press, 2001. Edición limitada en <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>.
3. Posso H. Carga de cánceres asociados con el VPH en América Latina. Newsletter on Human Papillomavirus. *VPH Today* 2007; 12:3.
4. Lewis MJ. Análisis de la situación del CaCU en América Latina y el Caribe. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), 2004: 40.
5. Secretaría de Salud de México. Estadísticas de mortalidad relacionadas con la salud reproductiva. *Salud pública de México* 2004; 46 (1). URL: <http://millenniumindicators.un.org/unsd/mispa/>.
6. Secretaría de Salud de México. Dirección General de Epidemiología. Compendio de Morbilidad y Mortalidad 2003 del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. 2007.
7. Arossi S, Sankaranarayanan R, Parkini D. Incidence & mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 2003; 45(Suppl. 3): S306-S314.
8. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P *et al.* Epidemiology of VPH infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001; 91: 412-420.
9. INEGI. Estadísticas vitales, 2007. Base de datos. CONAPO. Proyecciones de la población de México, 2005-2050.
10. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 510-560.
11. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7:11-22.
12. [Soh LT](#), [Heng D](#), [Lee IW](#), [Ho TH](#), [Hui KM](#). The relevance of oncogenes as prognostic markers in cervical cancer. [Int J Gynecol Cancer](#) 2002; 12 (5): 465-74.

13. [El-Ghobashy AA](#), [Shaaban AM](#), [Herod J](#), [Herrington CS](#). The pathology and management of endocervical glandular neoplasia. [Int J Gynecol Cancer](#) 2005; 15 (4): 583-592.
14. [Smith JH](#). Bethesda 2001. [Cytopathology](#) 2002, 13(1): 4-10.
15. [Kuyumcuoglu U](#), [Hocaoglu S](#), [Guzel AI](#), [Celik Y](#). The clinical significance of HPV screening in premalignant cervical lesions. [Eur J Gynaecol Oncol](#) 2010; 31(5): 596-597.
16. Nobbenhuis ME, Helmerhorst TJM, van den Brule AJC, Rozendaal L, Woorhorst FJ, Bezemer PD *et al*. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. [Lancet](#) 2001; 358: 1782-1783.
17. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. [J Clin Virol](#) 2000; 19: 1-5.
18. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV *et al*. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. [J Pathol](#) 1999; 189(1):12-19.
19. [Grubišić G](#), [Klarić P](#), [Jokanović L](#), [Soljacić Vranes H](#), [Grbavac I](#) *et al*. Diagnostic approach for precancerous and early invasive cancerous lesions of the uterine cervix. [Coll Antropol](#) 2009; 33 (4): 1431-1436.
20. Myers E, McCrory D, Nanda K, Bastian L, Matchar D. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. [Am J Epidemiology](#) 2000; 151(12): 1158-1171.
21. [Jit M](#), [Gay N](#), [Soldan K](#), [Hong Choi Y](#), [Edmunds WJ](#). Estimating progression rates for human papillomavirus infection from epidemiological data. [Med Decis Making](#) 2010; 30 (1) :84-98.
22. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence that human papilloma-virus infection as a necessary cause of cervical cancer. [J Nat Cancer Inst](#) 1999; 91(6): 506-511.
23. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. [J Clin Pathol](#) 2002; 55 (4): 244-265.
24. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. [Virology](#), 2010;401:70-79.
25. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. [Clin Microbiol Rev](#), 2003;1:1-17.

26. Cole ST, Streeck RE. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer. *J Virol*, 1986;58:991-995.
27. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Science* 2006; 110: 525-541.
28. Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V, Gariglio P. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochim Biophys Acta. Reviews on Cancer* 2010; 1805: 6-16.
29. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 362-372.
30. Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*, 2002;76:12162–12172.
31. Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol*, 2003;148:1445-1453.
32. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human Papillomaviruses. *Virus Genes* 2010; 40: 1–13.
33. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS* 2010; 118: 471-493.
34. Torres-Poveda KJ, Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales VH, Madrid-Marina V. Suppressive immune response in cervical cancer patients. *Clin & Develop Immunol* 2010. (Submitted).
35. Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, *et al.* Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003; 106 (3): 396-403.
36. [Muñoz N](#), [Hernández-Suárez G](#), [Méndez F](#), [Molano M](#), [Posso H](#), [Moreno V](#) *et al.* Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. [Br J Cancer](#) 2009; 100 (7): 1184-1190.
37. [Bodily J](#), [Laimins LA](#). Persistence of human papillomavirus infection: Keys to malignant progression. [Trends Microbiol](#) 2010. [Epub ahead of print]
38. [Shrestha S](#), [Sudenga SL](#), [Smith JS](#), [Bachmann LH](#), [Wilson CM](#), [Kempf MC](#). The impact of highly active antiretroviral therapy on prevalence and

- incidence of cervical human papillomavirus infections in HIV-positive adolescents. *BMC Infect Dis.* 2010; 14; 10: 295.
39. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C *et al.* Sexual behavior and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* 2000; 83 (11): 1565-1572.
  40. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine* 2008; 19; 26 Suppl 11: L16-36.
  41. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno NV, Herrero R, Smith JS *et al.* Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: The IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359 (9312): 1093–1101.
  42. Castellsague X, Munoz N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 20–28.
  43. Smith JS, Green J, Berrington DG, Appleby P, Peto J, Plummer M *et al.* Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: A systematic review. *Lancet* 2003; 361: 1159–1167.
  44. De Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 103: 705-708.
  45. Ho GY, Kadish AS, Burk RD, Basu J, Palan PR, Mikhail M *et al.* HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1998; 78 (3): 281-285.
  46. Torres-Poveda KJ, Burguete A, Bermúdez VH, Madrid-Marina V. La infección por el virus del Papiloma humano y cáncer cérvicouterino: una perspectiva de salud pública. *Revista de Investigación Clínica* 2008, 60 (5):414-420.
  47. Parikh S, Brennan P, Boffetta P. Meta-analysis of social inequality and the risk of cervical cancer. *Int J Cancer* 2003; 105 (5): 687-691.
  48. Kjaer SK, Van-den-Brule AJ, Paull G. Type specific persistence of high human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: Population based of prospective follow up study. *BMJ* 2002; 325: 572-578.

49. Clarke B, Chetty R. Postmodern cancer: The role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Molecular Pathol* 2002; 55 (1):19–24.
50. Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Chikte UM, Meyerov R, Lemmer J. HPV modulation of host immune responses. *SADJ* 2010; 65 (6): 266-268.
51. Riethmuller D, Seilles E. Immunity of the female genital tract mucosa and mechanisms of papillomavirus evasion. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2000; 29 (8):729-740.
52. Rincón OL, Pareja LR, Jaramillo S, Aristizabal BH. Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 2007; 58 (3): 202-212.
53. Santin AD, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type1 cytokine expressors and DR+ T cells compared with Lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001; 81(3): 424-432.
54. Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J *et al.* Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix : implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1998; 113 (2):183-189.
55. Clerici M, Gene MS, Clerici E. Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: Time to consider the Th1/Th2 Paradigm. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90(4): 261-263.
56. Bor-Ching S, Rong-Hwa L, Huang-Chung L, Hong-Nerng H, Su-Ming H, Su-Cheng H. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 2001; 167: 2972-2978.
57. Alcocer-González JM, Berumen J, Tamez-Guerra R, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R *et al.* In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cancer cells. *Viral Immunol* 2006; 19 (3): 481-491.
58. [Díaz-Benítez CE](#), [Navarro-Fuentes KR](#), [Flores-Sosa JA](#), [Juárez-Díaz J](#), [Uribe-Salas FJ](#), [Román-Basaure E](#) *et al.* CD3 $\zeta$  expression and T cell proliferation are inhibited by TGF- $\beta$ 1 and IL-10 in cervical cancer patients. *J Clin Immunol* 2009; 29: 532–544.
59. De-Gruijl TD, Bontkes HJ, Peccatori F, Gallee MP, Helmerhorst TJ, Verheijen RHH *et al.* Expression of CD3-zeta on T-cell in primary cervical

- carcinoma and in metastasis-positive and negative pelvic lymph nodes. *Br J Cancer* 1999; 79 (7-8): 1127-1132.
60. Wang SS, Hildesheim A, Gao X, Schiffman M, Herrero R, Bratti MC *et al.* Human leukocyte antigen class I alleles and cervical neoplasia no heterozygote advantage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11(4): 419-420.
  61. Hachisuga T, Fukuda K, Kawarabayashi T. Local immune response in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 52 (1): 3-8.
  62. Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Nakagawa S, Kawana K, Nozawa S *et al.* Balance of IgG subclasses toward human papillomatype 16 (HPV 16) L1-capside is a possible predictor for the regression of HPV16-positive cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 29: 258.
  63. Pedroza-Saavedra A, Cruz A, Esquivel F, De La Torre F, Berumen J, Gariglio P, Gutiérrez L. High prevalence of serum antibodies to Ras and type 16 E4 proteins of human papillomavirus in patients with precancerous lesions of the uterine cervix. *Arch Virol* 2000; 145 (3): 603-623.
  64. Plett-Torres T, González-Jaimes A, Maldonado-Gama M, Pedroza-Saavedra A, Cruz-Valdez A, Hernández-Nevarez P *et al.* Association between specific antibody profile against E4 protein from HPV16 and low-grade cervical lesions. *Clin Immunol* 2010 (Submitted).
  65. Baay MF, Duk JM, Groenier KH, Burger MP, de Bruijn HW, Hollema H *et al.* Relation between HPV-16 serology and clinico-pathological data in cervical carcinoma patients: Prognostic value of anti E6 and /or anti E7 antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 44 (4): 211-213.
  66. Eskdale, J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; 46: 120-128.
  67. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008; 226: 205-218.
  68. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095.
  69. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990; 248:1230-1234.

70. O'arra A, Vieira P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 425–428.
71. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:391–397.
72. Ryan JJ, Kashyap M, Bailey D, Kennedy S, Speiran K, Brenzovich J *et al.* Mast cell homeostasis: A fundamental aspect of allergic disease. *Crit Rev Immunol* 2007; 27:15–32.
73. Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation – a continuing puzzle. *Immunology* 2004; 113: 281–292.
74. Pisa P, Halapi E, Pisa EK, [Gerdin E](#), [Hising C](#), [Bucht A](#) *et al.* Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7708–7712.
75. Venetsanakos E, Beckman I, Bradley J, Skinner JM. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. *Br J Cancer* 1997; 75: 1826–1830.
76. Nakagomi H, Pisa P, Pisa EK, [Yamamoto Y](#), [Halapi E](#), [Backlin K](#) *et al.* Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 63: 366–371.
77. Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H *et al.* Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res* 1995; 55: 3847–3853.
78. Sheu BC, Chang WC, Lin HH, Chow SN, Huang SC. Immune concept of human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical neoplasia. *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33: 103–113.
79. [Bermúdez-Morales VH](#), [Gutiérrez LX](#), [Alcocer-Gonzalez JM](#), [Burquete A](#), [Madrid-Marina V](#). Correlation between IL-10 expression and Human Papillomavirus infection in cervical cancer. A Mechanism for Immune Response Escape. *Cancer Invest* 2008; 26: 1037–1043.
80. Kruger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C [Schmitt E](#), [Hüls C](#), [Blankenstein T](#) *et al.* Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer* 1994; 70: 1182–1185.
81. Chen Q, Daniel V, Maher DW, Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: Examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int J Cancer* 1994; 56: 755–760.

82. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10 mediated immune suppression. *Immunology* 2001; 103:131–136.
83. Cai G, Kastelein RA, Hunter CA. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2658–2665.
84. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Román JJ *et al.* Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 2000; 74: 4729–4737.
85. Rowbottom AW, Lepper MA, Garland RJ, Cox CV, Corley EG. Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. *Immunology* 1999; 98: 80–89.
86. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol* 1998; 160: 3188–3193.
87. Lauw FN, Pajkrt D, Hack CE, Kurimoto M, van Deventer SJ, van der PT. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *J Immunol* 2000; 165: 2783–2789.
88. Van-der Poll T, De-Waal-Malefyt R, Coyle SM, Lowry SF. Anti-inflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: Sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *J Infect Dis* 1997; 175: 118–122.
89. Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 557–69.
90. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 563–573.
91. Staples KJ, Smallie T, Williams LM, Foey A, Burke B, Foxwell BMJ *et al.* IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol* 2007; 178: 4779–4785.
92. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: Input and output integration. *J Immunol* 2007; 178: 2623–2629.
93. O’Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28: 477–487.

94. Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation – a continuing puzzle. *Immunology* 2004; 113: 281–292.
95. Ma W, Lim W, Gee K, Aucoin S, Nandan D, Kozlowski M *et al.* The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin- 10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem* 2001; 276: 13664–13674.
96. Steinke JW, Barekzi E, Hagman J, Borish L. Functional analysis of -571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by sp1. *J Immunol* 2004; 173: 3215–3222.
97. Ziegler-Heitbrock L, Lotzerich M, Schaefer A, Werner T, Frankenberger M, Benkhart E. IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. *J Immunol* 2003; 171: 285–290.
98. Unterberger C, Staples KJ, Smallie T, Williams L, Foxwell B, Schaefer A *et al.* Role of STAT3 in gluco-corticoid-induced expression of the human IL-10 gene. *Mol Immunol* 2008; 45: 3230–3237.
99. Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 2000; 165: 1612–1617.
100. VanDeusen JB, Shah MH, Becknell B, Blaser BW, Ferketich AK, Nuovo GH *et al.* STAT-1-mediated repression of monocyte interleukin-10 gene expression in vivo. *Eur J Immunol* 2006; 36: 623–630.
101. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA *et al.* Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007; 8: 1363–1371.
102. Samanta M, Iwakiri D, Takada K. Epstein–Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 2008; 27: 4150–4160.
103. Kremer KN, Kumar A, Hedin KE. Haplotype-independent costimulation of IL-10 secretion by SDF-1/CXCL12 proceeds via AP-1 binding to the human IL-10 promoter. *J Immunol* 2007; 178: 1581–1588.
104. Hu X, Paik PK, Chen J, Yarilina A, Lockeritz L, Lu TT *et al.* IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 2006; 24: 563–574.

105. Wang ZY, Sato H, Kusam S, Sehra S, Toney LM, Dent AL. Regulation of IL-10 gene expression in Th2 cells by Jun proteins. *J Immunol* 2005; 174: 2098–2105.
106. Rooney JW, Hodge MR, McCaffrey PG, Rao A, Glimcher LH. A common factor regulates both Th1-and Th2-specific cytokine gene expression. *EMBO J* 1994; 13: 625–633.
107. Jones EA, Flavell RA. Distal enhancer elements transcribe intergenic RNA in the IL-10 family gene cluster. *J Immunol* 2005; 175: 7437–7446.
108. Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prosch S. Cyclic adenosine mono-phosphateresponsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3098–3104.
109. Park PH, Huang H, McMullen MR, Bryan K, Nagy LE. Activation of cyclic-AMP response element binding protein contributes to adiponectin-stimulated interleukin-10 expression in raw 264.7 macrophages. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 1258–1266.
110. Cao S, Liu J, Song L, Ma X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol* 2005; 174: 3484–3492.
111. Ho IC, Lo D, Glimcher LH. c-Maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* 1998; 188: 1859–1866.
112. Kim JI, Ho IC, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 1999; 10: 745–751.
113. Bondeson J, Browne KA, Brennan FM, Fox-well BM, Feldmann M. Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent. *J Immunol* 1999; 162: 2939–2945.
114. Wessells J, Baer M, Young HA, Claudio E, Brown K, Siebenlist U *et al.* BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J Biol Chem* 2004; 279: 49995–50003.

115. Chung EY, Liu J, Homma Y, Zhang Y, Brendolan A, Maggese M *et al.* Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 2007; 27: 952–964.
116. Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SAJ, Waldmann H. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* 2000; 165: 286–291.
117. Chen CY, Shyu AB. AU-rich elements: Characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 465-470.
118. Pritchard C, Coil D, Hawley S, Hsu L, Nelson P. The contributions of normal variation and genetic background to mammalian gene expression. *Genome Biol* 2006; 7: R26.
119. Kruglyak L, Nickerson D. Variations is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27: 234-236.
120. Brookes AJ . The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177–186.
121. Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephensc JC. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutation Research* 2003; 526: 53-61.
122. Guttmahcer AE, Collins F. Genomic Medicine. *N England Med* 2002; 347: 1512-1520.
123. Clark A, Boerwinkle E, Hixson J, Sing CF. Determinants of the success of whole-genome association testing. *Genome Res* 2005; 15: 1463-1467.
124. Porta M. The genome sequence is a jazz score. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 29-31.
125. Caporaso NE. Why have we failed to find the low penetrance genetic constituents of common cancers? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1544-1549.
126. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 2005; 19 (4): 333-334.
127. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 91-99.

128. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002; 4: 45-61.
129. Clayton D, Chapman J, Cooper J. Use of unphased multilocus genotype data in indirect association studies. *Genet Epidemiol* 2004; 27: 415-428.
130. Cordell HJ, Clayton DG. A unified stepwise regression procedure for evaluating the relative effects of polymorphisms within a gene using case/control or family data: application to HLA in type 1 diabetes. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 124-141.
131. Chang HW, Cheng YH, Chuang LY, Yang CH. SNP-RFLPing 2: An updated and integrated PCR-RFLP tool for SNP genotyping. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:173.
132. Bartels C, Marchetti AL, Highsmith WE, Tsongalis GJ. Real Time PCR detection of the PI\*Z and PI\*S mutations associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Trans Res* 2009; 1 (4): 406-411.
133. Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi MP. Pyrosequencing: An accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 2002; 19: 479-485.
134. Hildesheim A, Wand SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: A review. *Virus Res* 2002; 89 (2): 229-240.
135. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet* 1994; 6 (2): 157-162.
136. Montoya L, Saiz I, Rey G, Vela F, Clerici-Larradet N. Cervical carcinoma human papillomavirus infection and HLA-associated risk factors in the Spanish population. *Eur J Immunogenet* 1998; 25 (5): 329-337.
137. Brady CS, Duggan-Keen MF, Davidson JA, Varley JM, Stern PL. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: Relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol* 1999; 80: 3233-3240.
138. Wang SS, Wheeler CM, Hildesheim A, Schiffman M, Herrero R, Bratti MC *et al.* Human leukocyte antigen class I and II alleles and risk of cervical neoplasia: Results from a population-based study in Costa Rica. *J Infect Dis* 2001; 184 (10): 1310-1314.

139. Hernández-Hernández DM, Cerda-Flores RM, Juárez-Cedillo T, Granados-Arriola J, Vargas-Alarcón G, Apresa-García T *et al.* Human leukocyte antigens I and II haplotypes associated with human papillomavirus 16-positive invasive cervical cancer in Mexican women. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19 (6): 1099-10106.
140. Madrid-Marina V, Estrada RA, Bahena M, Burguete AI, Torres-Poveda KJ, Berumen-Campos J *et al.* Increased frequency of HLADQ3 in Mexican women HPV-positive, H6-CIN and squamous cervical carcinoma. A new approach for gynecological cancer research, by Nova Publishers NY, 2010. (libro).
141. Perales-Ortiz G, Burguete A, Dimas J, Bahena M, Bermúdez-Morales VH, Moreno J *et al.* A polymorphism in AT-Hook motif of the transcriptional regulator AKNA is a risk factor for cervical cancer. *Biomarkers* 2010: 1-5.
142. Koushik A, Ghosh A, Duarte E, Forest P, Voyer H, Matlashewski G *et al.* The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Detect Prev* 2005; 29 (4): 307-316.
143. Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: A meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet* 2004; 85 (3): 301-308.
144. Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJ, Meijer JC, Pawade S, Glew S. TNF $\alpha$  polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 675-679.
145. Juárez-Cedillo T, Vallejo M, Fragoso JM, Hernández-Hernández DM, Rodríguez-Pérez JM, Sánchez-García S *et al.* The risk of developing cervical cancer in Mexican women is associated to CYP1A1 MspI polymorphism. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1590-1595.
146. Martin-Howell W, Rose-Zerilli MJ. Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Familial Cancer* 2006; 5: 143-149.
147. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on line databases. *Genes Immun* 1999; 1: 3-19.
148. Haukin N, Bidwell JL, Smith AJP, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on line databases. Supplement 2. *Genes Immun* 2002: 313-330.
149. Stanczuk GA, Tswana SA, Bergstrom S, Sibanda EN. Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1)

- gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Immunogenet* 2002; 29 (5): 417-421.
150. Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Alcocer-González JM, Moreno J, Madrid-Marina V. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Mol Med Report* 2011; 4: 369-375.
  151. Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, López-Toledo G, García-Carrancá A. Advantages and disadvantages of current prophylactic vaccines against HPV. *Arch Med Res* 2009; 40: 471-477.
  152. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 2005; 1(33): D501-4.
  153. Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 1998; 8:175-185.
  154. Ewing B, Green P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 1998; 8:186-194.
  155. El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN- $\gamma$  mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol* 2001; 195: 179–185.
  156. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: 1-12.
  157. Solé X, Guino E, Walla J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22: 1928–1929.
  158. González-Losa Mr, Laviada M, Terán MA, Puerto-Solís M, García-Carrancá A. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol* 2004; 29: 95–98.
  159. Tirado-Gómez LL, Mohar-Betancourt A, López-Cervantes M, García-Carrancá A, Franco-Marina F, Borges G. Factores de riesgo de cáncer cérvicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Publica Mex* 2005; 47: 342-350.
  160. Lizano M, De la Cruz-Hernández E, Carrillo-García A, García-Carrancá A, Ponce de León-Rosales S, Dueñas-González A *et al.* Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology,

- intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecol Oncol* 2006; 102: 230 – 235.
161. Salazar EL, Sojo-Aranda I, López R, Salcedo M. The evidence for an etiological relationship between oral contraceptive use and dysplastic change in cervical tissue. *Gynecol Endocrinol* 2001;15: 23–28.
  162. Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Kim E, Tadesse A *et al.* The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence. 2010 [Epub ahead of print]
  163. Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, Klock G. The upstream regulatory region of the human papilloma virus 16 contains an E2-protein independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* 1987; 6: 3735–3743.
  164. Mitrani-Rosenbaum S, Tsvieli R, Tur-Kaspa R. Estrogen but not glucocorticoids stimulate HPV-16 transcription in SIHA cells. Proceedings of the Seventh International Papillomavirus Workshop, Nice, France 1988; 82.
  165. Palacio-Mejía L, Rangel-Gómez G, Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce M. Cervical cancer, a disease of poverty: Mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Publica Mex* 2003; 45 (3): 315-325.
  166. Hutchinson IV, Turner DM, Sankaran D, Awad MR, Sinnott P. Influence of cytokine genotypes on allograft rejection. *Transpl Proc* 1998; 30: 862.
  167. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snledor H, Kemp PR, Metcalfe JC *et al.* Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta-1. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 93.
  168. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI *et al.* Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 170–173.
  169. Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors—a twin study. *Genes Immun* 2002; 3: 407–413.
  170. Eskdale J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun* 1999; 1: 151–155.

171. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1958-1962.
172. Kube D, Platzer C, von Knethen A, Straub H, Bohlen H, Hafner M *et al.* Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 1995; 7: 1-7.
173. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE *et al.* Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24: 2314-2317.
174. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.
175. Lloberas J, Soler C, Celada A. The key role of PU.1/Spi-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today* 1999; 20: 184-189.
176. Steinke JW, Barekzi E, Hagman J, Borish L. Functional Analysis of -571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by Sp1. *J Immunol* 2004; 173: 3215-3222.
177. Peralta-Zaragoza O, Recillas-Targa F, Alcocer-González JM, Bermudez-Morales VH, Madrid-Marina V. Human papillomavirus-16 E6 and E7 proteins induce activation of human TGF- $\beta$ 1 basal promoter in epithelial cells throughout a Sp1 recognition sequence. *Viral Immunol* 2006; 19 (3): 468-480.
178. MacDonald TT. Gastrointestinal inflammation: Inflammatory bowel disease in knockout mice. *Curr Biol* 1994; 4: 261-263.
179. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1997; 49:635-639.
180. Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P *et al.* IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998; 27: 142-145.
181. Mok CC, Lanchbury JS, Chan DW, Lau CS. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1090-1095.

182. Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, Proctor SG, Dickinson AM. 1998. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 1998; 92: 3943-3948.
183. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ *et al.* Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14467-14472.
184. Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, Oosterom E, van der Steege G, de Vries EG *et al.* Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 282–290.
185. Mason CE, Shu FJ, Wang C, [Session RM](#), [Kallen RG](#), [Sidell N](#) *et al.* Location analysis for the estrogen receptor- $\alpha$  reveals binding to diverse ERE sequences and widespread binding within repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research* 2010; 38: 2355–2368.
186. Cerillo G, Rees A, Manchanda N, [Reilly C](#), [Brogan I](#), [White A](#) *et al.* The oestrogen receptor regulates NFkappaB and AP-1 activity in a cell-specific manner. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 67: 79–88.
187. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: Interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine Reviews* 1999; 20: 435–459.
188. Wood KA, Kellum JA, Ferrell R, Arena VC, Delude RL, Angus DC. The IL-10 –819T polymorphism is associated with increased susceptibility to severe sepsis. *Critical Care* 2003; 7:43.
189. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V *et al.* IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet* 2005; 118: 295–300.
190. Salhi A, Rodrigues Jr V, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR *et al.* Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 2008; 180: 6139–6148.
191. Pereira AC, Brito de Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IMF, Parelli FPC, Venturini J *et al.* Genetic epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms

- suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Gen Immun* 2009; 10: 174-180.
192. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Nery JA, Santos AR *et al.* Interleukin-10 promoter singlenucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 2004; 5: 592–595.
  193. Larsson L, Johansson P, Jansson A, Donati M, Rymo L, Berglundh T. The Sp1 transcription factor binds to the G-allele of the –1087 IL-10 gene polymorphism and enhances transcriptional activation. *Genes Immun* 2009; 10: 280–284.
  194. Larsson L, Rymo L, Berglundh T. Sp1 binds to the G allele of the –1087 polymorphism in the IL-10 promoter and promotes IL-10 mRNA transcription and protein production. *Genes Immun* 2010; 11: 181-187.
  195. Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, Pravica V, Hutchinson IV *et al.* Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer* 2001; 94: 792–794.
  196. Roh JW, Kim MH, Seo SS, Kim SH, Kim JW, Park NH *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. *Cancer Lett* 2002; 184: 57–63.
  197. Mormann M, Rieth H, Hua TD, Assouhou C, Roupelieva M, Hu SL *et al.* Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Gen Immun* 2004; 5: 246-255.
  198. Rees LE, Wood NA, Gillespie KM, Lai KN, Gaston K, Mathieson PW. The interleukin-10-1082 G/A polymorphism: Allele frequency in different populations and functional significance. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 560–569.
  199. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin 10 5` flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1101–1108.
  200. Elsässer-Beile U, Von-Kleist S, Sauter W, Gallati H, Schulte-Mönting J. Impaired cytokine production in whole blood cell cultures of

- patients with gynecological carcinomas in different clinical stages. *Br J Cancer* 1993; 68: 32-36.
201. Fortis C, Foppolub M, Gianottic L, Gallid L, Citteriob G, Consognoa G *et al.* Increased interleukin- 10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett* 1996; 104: 1-5.
  202. Kucharzik T, Lugerling N, Winde G, Domschke W, Stoll R. Colon carcinoma cell lines stimulate monocytes and lamina propria mononuclear cells to produce IL-10. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 296–302.
  203. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest* 1998; 16: 152–159.
  204. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B *et al.* Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89 (3): 245-250.
  205. al-Saleh W, Delvenne P, Arrese JE, Nikkels AF, Piérard GE, Boniver J. Inverse modulation of intraepithelial Langerhans' cells and stromal macrophage/dendrocyte populations in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Virchows Arch* 1995; 427: 41–48.
  206. Gravitt PE, Hildesheim A, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Bratti C *et al.* Correlates of IL-10 and IL-12 concentrations in cervical secretions. *J Clin Immunol* 2003; 23: 175-183.
  207. Jacobs N, Giannini SL, Doyen J, Baptista A, Moutschen M, Boniver J *et al.* Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 219–224.
  208. Ming-Y Tjiong, Nine-van-der Vange, Jan-S ter Schegget, Matthe´P-M Burger, Fiebo-W-J ten Kate, Theo-A Out. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine* 2001; 14 (6):357-360.
  209. Azar K, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M, Sasagawa T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* 2004; 35: 1376-1384.

210. Bermúdez VH, Peralta O, Madrid V. Gene therapy with cytokines against cervical cancer. *Salud Publica Mex* 2005; 47(6):458-468.

## Índice de cuadros

**Cuadro 1.** Cálculo del poder estadístico en la población de estudio con lesiones escamosas intraepiteliales en cuello uterino y con cáncer cervicouterino; pág 50.

**Cuadro 2.** Condiciones de PCR para los oligonucleótidos GAPDH, L1C1, MY09 y GP5; pág 58.

**Cuadro 3.** Concentraciones de reactivos para la reacción de PCR para los oligonucleótidos GAPDH, L1C1, MY09 y GP5; pág 58.

**Cuadro 4.** SNPs encontrados tras el análisis por secuenciación de 2439pb corriente arriba de la región promotora del gen de IL-10; pág 62.

**Cuadro 5.** Análisis del elemento regulador de E2 de VPH en la región promotora de IL-10 en mujeres con LEI y sin lesión; pág 63.

**Cuadro 6.** Características generales de la población de estudio en LEI versus no LEI; pág 65.

**Cuadro 7.** Análisis de asociación de los SNPs (-592, -819, -1082, -1352) de la región promotora del gen de Interleucina 10 con lesiones intraepiteliales de cuello uterino; pág 68.

**Cuadro 8.** Características generales de la población de estudio en CaCU versus no LEI; pág 70.

**Cuadro 9.** Análisis de asociación de los SNPs (-592, -819, -1082, -1352) de la región promotora del gen de Interleucina 10 con CaCU; pág 72.

**Cuadro 10.** Análisis de asociación de la expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y a nivel local en lesiones intraepiteliales de cuello uterino (LEI); pág 73.

**Cuadro 11.** Análisis de asociación de la expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico y a nivel local en cáncer cervicouterino (CaCU); pág 75.

**Cuadro 12.** Análisis de asociación del nivel sérico de proteína de IL-10 con lesiones intraepiteliales de cuello uterino (LEI); pág 78.

**Cuadro 13.** Análisis de asociación del nivel sérico de proteína de IL-10 con cáncer cervicouterino (CaCU); pág 79.

**Cuadro 14.** Carga de los alelos de riesgo de los SNPs -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10 en LEI; pág 80.

**Cuadro 15.** Carga de los alelos de riesgo de los SNPs -592/-819/-1082/-1352 de la región promotora de IL-10 en CaCU; pág 80.

## Índice de figuras

- Figura 1.** Incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino en América Latina; pág 9.
- Figura 2.** Historia natural del cáncer cervicouterino; pág 10.
- Figura 3.** Organización del genoma del VPH; pág 14.
- Figura 4.** Cambios en los patrones de expresión de oncoproteínas del VPH que acompañan la progresión a CaCU; pág 16.
- Figura 5.** Factores determinantes del desarrollo de CaCU; pág 17.
- Figura 6.** Respuesta inmune en la infección por el VPH; pág 19.
- Figura 7.** Efectos inmunoreguladores y estimulatorios de IL-10; pág 24.
- Figura 8.** Receptor de IL-10 y una versión simplificada de la señalización de este receptor; pág 25.
- Figura 9.** Elementos reguladores de la transcripción en el promotor de IL-10 humana; pág 27.
- Figura 10.** Mapa conceptual de la investigación; pág 45.
- Figura 11.** Poder estadístico en la población de estudio con lesiones escamosas intraepiteliales en cuello uterino; pág 50.
- Figura 12.** Poder estadístico en la población de estudio con cáncer cervicouterino; pág 51.
- Figura 13.** Estrategia secuenciación de la región reguladora de IL-10; pág 53.
- Figura 14.** Resultados de amplificación por PCR de cada uno de los seis fragmentos analizados de la región reguladora del gen de IL-10; pág 61.
- Figura 15.** Electroferogramas de la secuencia donde está ubicado el elemento regulador de E2 de VPH en la región promotora de IL-10; pág 64.
- Figura 16.** Mapa del gen de IL-10 sobre el cromosoma 1q21-32; pág 67.
- Figura 17.** Desequilibrio de ligamiento en LEI versus sin LEI; pág 69.
- Figura 18.** Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel sistémico en mujeres con LEI versus sin LEI; pág 73.
- Figura 19.** Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel de cérvix en mujeres con LEI versus sin LEI; pág 74.
- Figura 20.** Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel sistémico en mujeres con CaCU versus sin LEI; pág 75.
- Figura 21.** Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel de cérvix en mujeres con CaCU versus sin LEI; pág 76.
- Figura 22.** Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel sistémico en mujeres con LEI estratificado por grado de lesión y CaCU versus sin LEI; pág 76.
- Figura 23.** Unidades relativas de expresión IL10/HPRT1 a nivel de cérvix en mujeres con LEI estratificada por grado de lesión y CaCU versus sin LEI; pág 77.
- Figura 24.** Niveles de proteína de IL-10 a nivel sérico en mujeres con LEI versus sin LEI; pág 77.
- Figura 25.** Niveles de proteína de IL-10 a nivel sérico en mujeres con CaCU versus sin LEI; pág 78.
- Figura 26.** Niveles promedio de IL-10 en suero en mujeres con LEI estratificada por grado de lesión y CaCU versus sin LEI; pág 79.



Servicio de Consulta Externa del Instituto Nacional de Cancerología en el consultorio del Centro de Atención para la Salud de la Mujer del Estado de Morelos, así como la aplicación del cuestionario.

- c) Permitir la toma de muestra de biopsia de cérvix por el ginecólogo colposcopista en un tiempo aproximado de 10 minutos. En este procedimiento le tomarán muestra de tejido de la lesión en cérvix y la colocarán en un tubo con medio de conservación para realizar posteriormente la prueba de detección del Virus del Papiloma Humano por PCR y la extracción de ARN para el análisis de expresión de IL-10 en cérvix. El diagnóstico colposcópico e histopatológico se realizará en el Instituto Nacional de Cancerología.

#### **RIESGOS Y MOLESTIAS POTENCIALES:**

La toma de muestra de biopsia de cérvix es algo incómodo, pero el doctor(a) que realiza este procedimiento, lo hace muy rápido, limitándole las posibles molestias, en beneficio de su salud.

La toma de muestra de sangre puede ser un poco dolorosa y en ocasiones puede dejar un moretón alrededor del sitio de la toma. Sin embargo, la persona encargada de tomarle la muestra es un profesional con experiencia y tratará de que esto no suceda.

En caso de cualquier problema relacionado con la toma de las muestras, personal del Servicio de Consulta Externa del Instituto Nacional de Cancerología del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos, le atenderá sin costo alguno.

#### **BENEFICIOS POTENCIALES:**

Los resultados de este estudio permitirán conocer el genotipo de virus de papiloma humano que dio origen a la lesión en cuello uterino o neoplasia que a usted se le ha diagnosticado, y el perfil de expresión de una molécula (Interleucina 10), importante para su respuesta inmune.

El personal médico especializado del Servicio de Consulta Externa del Instituto Nacional de Cancerología Centro de Atención para la Salud de la Mujer donde usted es atendida, la orientará y le brindará el mejor esquema para su tratamiento.

#### **PARTICIPACIÓN:**

Su participación es VOLUNTARIA y por lo tanto, puede dejar de contestar alguna pregunta, suspender la entrevista o retirarse del estudio en cualquier momento. Las muestras de sangre y de biopsia de cérvix que usted está donando serán procesadas para obtener ADN, ARN y suero. Cada una de las muestras será etiquetada con un código cuya identidad es confidencial y serán almacenadas en los bancos del laboratorio 4 planta baja del Centro de investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública. En caso de que usted decida retirarse del estudio, esto no afectará de ninguna manera la calidad y cantidad de atención médica que recibe de parte del Servicio de Consulta Externa del Instituto Nacional de Cancerología Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos. No es posible en caso de retiro del estudio, devolver la muestra que usted donó, dado que la muestra ya pudo haber sido procesada, sólo que no se incluirá en el estudio sin su autorización.

Todos los gastos que se generen en la presente investigación serán cubiertos por el Instituto Nacional de Salud Pública y los Servicios de Salud de Morelos y se le garantiza confidencialidad de la información que usted muy amablemente nos brinde.

Para cualquier aclaración o duda respecto a este estudio favor de llamar por cobrar al teléfono (777) 3293056 con el Dr. Vicente Madrid, responsable de la investigación en el Instituto Nacional de Salud Pública en la ciudad de Cuernavaca.

Para cualquier duda derivada de la toma de muestra, favor de llamar por cobrar al teléfono (0155) 56280433 con el Dr. Alejandro Carrancá, responsable de la investigación en el Instituto Nacional de cancerología (777) 3101438 con el Dr. Javier Salgado, responsable de la investigación en el Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos en la ciudad de Cuernavaca.

Para cualquier aclaración o duda sobre sus derechos como participante en este estudio de investigación, puede comunicarse con la Dra. Julieta Ivone Castro, Presidenta de la Comisión de Ética del Instituto Nacional de Salud Pública al teléfono (777) 329-30-00 Extensión 7424, de lunes a viernes de 9:00 a 17:00 hrs.

#### **AUTORIZACIÓN**

Leído lo anterior, acepto participar en el estudio descrito ya que los propósitos de este han sido explicados a mi satisfacción. Queda copia de esta forma de consentimiento, registrada en la Historia Clínica de la paciente del Servicio de Consulta Externa del Instituto Nacional de Cancerología Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos.

Nombre: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Testigo 1 \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Parentesco con el paciente: \_\_\_\_\_

Testigo 2 \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

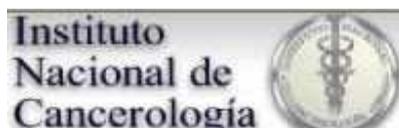
Parentesco con el paciente: \_\_\_\_\_

Además, autorizo que mi muestra de sangre sea guardada en un banco de muestras en el Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la responsabilidad del Investigador Responsable del proyecto, el Dr. Vicente Madrid Marina y sea utilizada en otros proyectos de investigación diferentes a este".

Sí acepto

No acepto

## Anexo 2. Cuestionario



### Estudio "Polimorfismos de la región reguladora del gen de Interleucina-10 y su asociación con la infección del virus del papiloma humano y el cáncer cervicouterino"

#### NOMBRE CENTRO DE ATENCIÓN:

CAPASAM

Servicio de Ginecología. Instituto Nacional de Cancerología

No. HISTORIA CLÍNICA: \_\_\_\_\_

FECHA TOMA MTRA: \_\_\_\_\_

FECHA RECEPCION MTRA EN LAB: \_\_\_\_\_

CÓD. LAB: \_\_\_\_\_

#### DATOS PERSONALES:

NOMBRE: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_

FECHA NACIMIENTO: \_\_\_\_\_

TELEFONO CONTACTO: \_\_\_\_\_

DIRECCIÓN DOMICILIO: \_\_\_\_\_

ESTADO CIVIL: \_\_\_\_\_

#### CUESTIONARIO:

GRUPO ÉTNICO: Blanco  Indígena  Otro

NIVEL SOCIOECONÓMICO: Bajo  Medio Bajo  Medio  Medio Alto

ANTECEDENTES DT2: Si  No

ANTECEDENTES HAS: Si  No

ANTECEDENTES CANCER: Si  No

TIPO DE CANCER: \_\_\_\_\_

NIVEL DE CONSANGUINIDAD: \_\_\_\_\_

ANTECEDENTES OBESIDAD: Si  No

ANTECEDENTES CARDIOVASCULARES: Si  No

ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES PARASITARIAS: Si  No

ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES REUMÁTICAS O AUTOINMUNES: Si   
No

ANTECEDENTES ETS: Si  No  ¿Cuál o (es)? \_\_\_\_\_

**DISPAREUNIA:** Si  No

**DISURIA:** Si  No

**PRURITO:** Si  No

**RESEQUEDAD VAGINAL:** Si  No

**LEUCORREA:** Si  No

**LAVADO DE GENITALES DESPUÉS DE RELACIONES SEXUALES:** Si  No

**OTROS SINTOMAS:** Si  No  ¿Cuál o (es)? \_\_\_\_\_

**EMBARAZO ACTUAL TOMA MX:** Si  No

**PROCEDENCIA-NACIONALIDAD:** \_\_\_\_\_

**PROCEDENCIA-NACIONALIDAD PADRES PTE:** \_\_\_\_\_

**PROCEDENCIA-NACIONALIDAD ABUELOS:** \_\_\_\_\_

**GRUPO SANGUÍNEO:** \_\_\_\_\_

**OCUPACION:** \_\_\_\_\_

**NIVEL EDUCATIVO:** \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES DE TABAQUISMO:** Si  No. de cigarrillos \_\_\_\_\_ No

**TABAQUISMO ACTUAL:** Si  No. de cigarrillos \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES DE CONSUMO DE ALCOHOL:** Si  No

**CONSUMO ALCOHOL ACTUAL:** Si  No

**EDAD MENARCA:** \_\_\_\_\_

**EDAD INICIO VSA:** \_\_\_\_\_

**No. PAREJAS SEXUALES:** \_\_\_\_\_

**No. GESTACIONES:** \_\_\_\_\_

**EDAD PRIMER PARTO:** \_\_\_\_\_

**MÉTODO PLANIF FLIAR:** \_\_\_\_\_

**IMC:** \_\_\_\_\_

**FECHA ÚLTIMA CITOLOGÍA:** \_\_\_\_\_

**DX COLPOSCÓPICO:**

---

---

---

---

---

---

---

---

**EXPLORACIÓN FÍSICA GINECOLÓGICA- opcional:**

---

---

---

---

**ANTECEDENTES PCR HPV:**

**RESULTADO DE CAPTURA DE HIBRIDOS-opcional:**

---

---

**RESULTADO DE CITOLOGÍA:**

---

---

---

**RESULTADO DE BIOPSIA:**

---

---

---

**FECHA TIPIFICACION VPH PREVIO:** \_\_\_\_\_  
**ANTECEDENTES TTO GINECOLÓGICO:**

---

---

---

---

**OCUPACION PAREJA:**

---

**EDAD PAREJA:** \_\_\_\_\_  
**ESTADO DE SALUD PAREJA:** \_\_\_\_\_  
**RESULTADO PCR HPV PROYECTO:** \_\_\_\_\_  
**FECHA ENTREGA DE RESULTADO:** \_\_\_\_\_  
**NOMBRE DE ENTREVISTADOR:** \_\_\_\_\_

### **Anexo 3. Aspectos éticos y de bioseguridad**

El protocolo de la presente investigación fue registrado y aprobado por los Comités de Ética, Investigación y Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública y Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cancerología.

Se garantizó la confidencialidad de la información que las mujeres participantes de esta investigación brindaron, considerando los principios de respeto a las personas (artículo 13, párrafo primero, del reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud) y confidencialidad (artículo 16 del reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud). Se siguieron las recomendaciones de la Asociación Médica Mundial (conforme a la declaración de Helsinki 1964, así como las actualizaciones de Edimburgo 2000, Washington 2002 y la última modificación de Tokio 2004) y en apego a la Ley General de Salud.

El manejo y disposición de los materiales biológico-infecciosos, corrosivos, reactivos, tóxicos y solventes se manejaron de acuerdo a la Guía para el Manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNT-SSA1-2002. Los Investigadores que participaron en esta investigación están acreditados por la Comisión de Bioseguridad del INSP.

**Anexo 4. Análisis de interacción de los genotipos codominantes de los SNPs (-592, -819, -1082 y -1352) con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico (LSP) en mujeres con LEI**

Genotipo		n(%)Con LEI/(%)Sin LEI (n=204/166)	RMa (IC95%)	Valor p*	NIVEL SISTÉMICO
					Valor p interacción**
(-592 C/A)	C/C	50(24.5)/66(40)	1		
	C/A	105(52)/70(42)	<b>2.0(1.21-3.32)</b>	<b>0.007</b>	0.10
	A/A	49(24)/30(18)	<b>2.07(1.10-3.89)</b>	<b>0.02</b>	0.62
(-819 C/T)	C/C	64(31.4)/57(34.3)	1		
	C/T	94(46)/75(45.2)	1.16(0.71-1.92)	0.53	0.30
	T/T	46(22.6)/34(20.5)	1.15(0.62-2.12)	0.64	0.19
(-1082 A/G)	A/A	125(61.3)/92(55.4)	1		
	A/G	66(32.3)/62(37.3)	0.95(0.59-1.52)	0.84	0.14
	G/G	13(6.4)/12(7.3)	1.02(0.42-2.44)	0.96	0.72
(-1352 G/A)	G/G	130(63.72)/102(61.44)	1		
	G/A	64(31.37)/53(31.94)	1.28(0.78-2.07)	0.31	0.53
	A/A	10(4.9)/11(6.62)	0.85(0.33-2.22)	0.75	0.92

a. Razones de Momios ajustadas por edad y genotipo de VPH

\*p<0.05

\*\* p de interacción

**Anexo 5. Análisis de interacción de los genotipos codominantes de los SNPs (-592, -819, -1082 y -1352) con el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico (LSP) en mujeres con CaCU**

Genotipo		n(%)Con CaCU/(%)Sin LEI (n=80/166)	RMa (IC95%)	Valor p*	NIVEL SISTÉMICO
					Valor p interacción**
(-592 C/A)	C/C	5(6.25)/66(40)	1		
	C/A	50(62.5)/70(42)	<b>8.10(2.67-24.56)</b>	<b>0.001</b>	0.82
	A/A	25(31.25)/30(18)	<b>7.27(2.17-24.36)</b>	<b>0.001</b>	0.90
(-819 C/T)	C/C	8(10)/57(34.3)	1		
	C/T	45(56.25)/75(45.2)	<b>3.08(1.16-8.12)</b>	<b>0.02</b>	0.64
	T/T	27(33.75)/34(20.5)	<b>4.26(1.47-12.31)</b>	<b>0.001</b>	0.90
(-1082 A/G)	A/A	56(70)/92(55.4)	1		
	A/G	20(25)/62(37.3)	0.56(0.26-1.19)	0.13	0.86
	G/G	4(5)/12(7.3)	0.74(0.18-3.01)	0.68	0.83
(-1352 G/A)	G/G	60(75)/102(61.44)	1		
	G/A	17(21.25)/53(31.94)	0.54(0.24-1.18)	0.12	0.46
	A/A	3(3.75)/11(6.62)	1.03(0.22-4.65)	0.96	0.57

a. Razones de Momios ajustadas por edad

\*p<0.05

\*\* p de interacción

**Anexo 6. Análisis de interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico (LSP) en mujeres con LEI**

		(-592 C/A)		(-819 C/T)		(-1082 A/G)		(-1352 G/A)	
		C/A	A/A	C/T	T/T	A/G	G/G	G/A	A/A
(-592 C/A)	C/A	-	-	0.61**	0.60**	0.30**	0.48**	0.90**	0.45**
	A/A	-	-	0.40*	0.26**	0.51**	0.54**	0.86**	0.44**
(-819 C/T)	C/T	0.61**	0.60**	-	-	0.24**	0.80**	0.19**	0.65**
	T/T	0.40*	0.26**	-	-	0.55**	0.34**	0.82**	0.78**
(-1082 A/G)	A/G	0.30**	0.48**	0.24**	0.80**	-	-	0.50**	0.24**
	G/G	0.51**	0.54**	0.55**	0.34**	-	-	0.86**	0.14**
(-1352 G/A)	G/A	0.90**	0.45**	0.19**	0.65**	0.50**	0.24**	-	-
	A/A	0.86**	0.44**	0.82**	0.78**	0.86**	0.14**	-	-

\*\* p de interacción

**Anexo 7. Análisis de interacción SNP-SNP sobre el nivel de expresión del ARNm de IL-10 a nivel sistémico (LSP) en mujeres con CaCU**

		(-592 C/A)		(-819 C/T)		(-1082 A/G)		(-1352 G/A)	
		C/A	A/A	C/T	T/T	A/G	G/G	G/A	A/A
(-592 C/A)	C/A	-	-	0.20**	0.91**	0.20**	0.37**	0.40**	0.13**
	A/A	-	-	0.57**	0.70**	0.55**	0.85**	0.61**	0.10**
(-819 C/T)	C/T	0.20**	0.91**	-	-	0.50**	0.41**	0.10**	0.34**
	T/T	0.57**	0.70**	-	-	0.73**	0.89**	0.85**	0.54**
(-1082 A/G)	A/G	0.20**	0.37**	0.50**	0.41**	-	-	0.30**	0.26**
	G/G	0.55**	0.85**	0.73**	0.89**	-	-	0.35**	0.10**
(-1352 G/A)	G/A	0.10**	0.13**	0.10**	0.34**	0.10**	0.26**	-	-
	A/A	0.61**	0.10**	0.85**	0.54**	0.35**	0.10**	-	-

\*\* p de interacción

## Abreviaturas

LEI: lesión escamosa intraepitelial de cuello uterino  
CaCU: cáncer cervicouterino  
LEIBG: LEI de bajo grado  
LEIAG: LEI de alto grado  
SNP: polimorfismo de un solo nucleótido  
URE: unidades relativas de expresión  
VPH: virus del papiloma humano  
VPH-AR: VPH de alto riesgo  
NIC: neoplasia intraepitelial cervical  
ETS: enfermedades de transmisión sexual  
IL: interleucina  
TGF- $\beta$ 1: factor de crecimiento transformante beta1  
INF $\gamma$ : interferón gamma  
TNF: factor de necrosis tumoral  
LSP: linfocitos de sangre periférica  
LIT: linfocitos infiltrantes de tumor  
NK: células asesinas naturales  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad  
CD: células dendríticas  
IL-10R: Receptor IL-10  
EREs: elemento de respuesta a estrógenos

## Publicaciones originales generadas de la investigación

1. **Torres-Poveda KJ**, Burguete-García AI, Moreno J, Cruz M, Martínez-Nava, G, Bahena-Román M, Ortíz-Flores E, Ramírez A and Madrid-Marina V. Association of Interleukin-10 gene promoter polymorphisms and IL-10 gene expression in human papillomavirus cervical lesions. **Gen Immun** 2010. (Enviado Febrero 2011).
2. **Kirvis Torres-Poveda**, Margarita Bahena-Román, Claudia Madrid-González, Oscar Peralta-Zaragoza, Víctor Bermúdez-Morales & Vicente Madrid-Marina. Suppressive Immune Response in cervical cancer. Review. Focus Issue on Tumor Immunology. **Clin Develop Immun** 2010. (Enviado 2010).

## Publicaciones relacionadas con el tema de tesis generadas durante la formación académica del Doctorado

1. **Kirvis Janneth Torres-Poveda**, Silvia Magali Cuadra-Hernández, Julieta Ivonne Castro-Romero, Vicente Madrid-Marina. **La política focalizada en el programa de vacunación contra el Virus del Papiloma Humano en México: aspectos éticos.** *Acta Bioethica*. (Aceptado 2010).
2. Madrid-Marina V, **Torres-Poveda K**, López-Toledo G, García-Carrancá A. **Advantages and disadvantages of current prophylactic vaccines against HPV.** *Archives of Medical Research* 2009;40:471-77.
3. **Torres-Poveda KJ**, Arredondo López AA, Duarte Gómez MB, Madrid-Marina V. **La mujer indígena, vulnerable a cáncer cervicouterino: perspectiva desde modelos conceptuales de salud pública.** *Revista Salud en Tabasco*. Redalyc.14(3): 807-815. Versión completa disponible en [http://www.saludtab.gob.mx/revista/revista\\_14\\_3.php](http://www.saludtab.gob.mx/revista/revista_14_3.php).
4. **Torres KJ**, Burguete A, Bermúdez VH, Madrid-Marina V. " **La infección por el virus del Papiloma humano y cáncer cérvicouterino: una perspectiva de salud pública**". *Revista de Investigación Clínica* 2008, 60 (5): 414-420. Nivel 3. Versión completa disponible en [www.imbiomed.com.mx/](http://www.imbiomed.com.mx/).

## Publicaciones originales en preparación

1. **Torres-Poveda KJ**, Bermúdez-Morales VH, Bahena-Román M, Ortíz-Flores E, Ramírez A López-Estrada G, Delgado-Romero K and Madrid-Marina V. Analysis of IL-10 promoter polymorphisms in the HPV E2 recognition site in patients with human papillomavirus cervical lesions. **Journal of Clinical Virology** 2011. (En preparación).
2. **Torres-Poveda KJ**, Bahena-Román M, Ortíz-Flores E, Ramírez A, López-Estrada G, Delgado-Romero K, Cantú D, García-Carrancá A and Madrid-Marina V. Interleukin-10 gene expression in human papillomavirus cervical lesions and cervical cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention** 2011. (En preparación).
3. **Torres-Poveda KJ**, Bahena-Román M, Ortíz-Flores E, Ramírez A, López-Estrada G, Delgado-Romero K and Madrid-Marina V. A prospective study of persistent high risk HPV infection in Mexican Women with Intraepithelial Lesions and Cervical Cancer. **International Journal of Cancer** 2011. (En preparación).