Instituto Nacional de Salud Pública

Doctorado en Ciencias en Salud Pública

Enfermedades Infecciosas

CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN AKNA ASOCIADA A CÁNCER CERVICOUTERINO

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Salud con área de concentración en Enfermedades Infecciosas.

P r e s e n t a:

M en C. Gabriela Angélica Martínez Nava

Comité de Tesis:

Directora de Tesis: Dra. Ana I. Burguete García

Asesor: Dr. Vicente Madrid Marina

Asesora: Dra. Kirvis J. Torres Poveda

Cuernavaca, Morelos Agosto de 2014

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra. Ana I. Burguete García en el Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, en Cuernavaca, Morelos, México. Para la elaboración de este trabajo se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE-2011-01-161710)

Durante la realización del mismo, se contó con el apoyo económico del programa para posgrados del CONACyT (número de becario: 222840).

Jurado de Examen de Grado:

Presidente: Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Secretaria: Dra. Ana I. Burguete García

Primer sinodal: Dr. Jesús Martínez Barnetche

Segundo sinodal: Dr. Miguel Cruz López

Tercer sinodal: Dr. José Moreno Rodríguez

DEDICATORIA

Este trabajo, así como todo lo realizado en el camino a su terminación, está dedicado a las personas que construyeron los cimientos que sostienen mi existir, mis padres. Gracias por enseñarme la rectitud, el respecto, la compasión y la alegría con la que enfrento la vida. Es un honor ser su hija.

AGRADECIMIENTOS

La presentación de este trabajo de tesis no sólo materializa el término de mi doctorado, también representa todo el arduo trabajo que durante estos últimos cuatro años he llevado acabo. Nada de esto podría haber sido posible sin el apoyo de diversas personas que quisiera agradecer.

A mi madre le agradezco el apoyo incondicional que siempre me ha brindado, y la valentía, entereza y ganas de salir adelante que ha tenido en los momentos más difíciles de nuestras vidas. Espero algún día ser tan valiente como ella.

A mi padre le agradezco los sabios consejos que me ayudaron a encontrar la serenidad en los momentos difíciles. Así como el apoyo que siempre me ha dado en todos los ámbitos de mi vida.

A mi hermana le doy las gracias por toda su ayuda en la preparación de mis escritos y por siempre estar dispuesta a resolver mis dudas en lingüística. Te quiero mucho onechan.

A mi Pe, por enseñarme que siempre todo es mejor y más llevadero con una sonrisa y actitud positiva, le agradezco. Eres mi segunda madre, gracias por estar siempre a mi lado y por ser mi confidente.

A mi tía Adheli y a mi abuela Licha les agradezco el gran apoyo que nos han brindado a toda la familia y su cariño. Gracias por estar siempre disponible para mi madre y para todos nosotros.

A mi familia adoptiva, los Motta. Cony y Ale, muchas gracias por todo su apoyo y cariño, es un honor ser miembro de su familia.

A mi directora de tesis, por haber compartido conmigo su experiencia y conocimientos, le agradezco. También le doy gracias por la guía y consejos que desde la licenciatura me ha brindado desinteresadamente e incondicionalmente.

A mis asesores, el Dr. Vicente Madrid y la Dra. Kirvis Torres Poveda, les agradezco sus sugerencias, correcciones y aportaciones al desarrollo de este trabajo.

A mi tutor, el Dr. Carlos Conde Gonzales le doy las gracias por sus consejos, apoyo y disponibilidad para escucharme.

A mi comité jurado le agradezco sus valiosas aportaciones y sugerencias para fortalecer este trabajo.

A Laurita, Citlalli, Claudia, Ceci, Bárbara, Arianna y Angie les agradezco su compresión, ayuda, consejos y complicidad en mis travesuras. Gracias por compartir conmigo tristezas, enojos y alegrías. Es un placer ser su compañera y amiga.

A todos los integrantes del Laboratorio 4 Planta Baja del CISEI. Alfredo Lagunas Martínez, Margarita Bahena Román, Carla Contreras Ochoa, Esmeralda Ortiz Flores, Alejandro Zurita Díaz, gracias por siempre estar dispuestos a compartirme sus conocimientos y a auxiliarme en todos los problemas que llegué a tener en el laboratorio y fuera de él también.

A mis profesores del doctorado, que con sus enseñanzas me dieron las herramientas necesarias para seguir el camino de la ciencia, les doy las gracias. Con especial afecto le agradezco al Dr. José Ramos Castañeda, al Dr. José Moreno Rodríguez y al Dr. Jesús Martínez Barnetche.

Al personal administrativo que me ayudó en todos los trámites necesarios para realizar y concluir este doctorado le agradezco. En particular quisiera agradecer a Lolita, Elsa, Semei y Salvador por todo su apoyo y disponibilidad.

Pero sobre todo, quisiera agradecer a Santiago, que sin su apoyo y amor no hubiera sido capaz de lograr esta meta. Su comprensión, sabios consejos y ánimos me han llevado a ser en gran parte la persona que hoy soy. Eres el pilar de mi vida, gracias por siempre promover en mi ese pensamiento crítico que me ha hecho crecer tanto personal como académicamente. Te amo.

"*Croyez ceux qui cherchent la vérité, doutez de ceux qui la trouvent*."

(Cree en aquellos que buscan la verdad, duda de los que la encuentran)

~André Gide

RESUMEN

A pesar de que el cáncer cervicouterino (CaCU) es una de las neoplasias con mayor potencial para su prevención, continúa cobrando más de doscientas mil vidas cada año en todo el mundo. Se ha reportado que el locus 9q32 se encuentra altamente ligado a esta neoplasia, y es en este locus donde se encuentra el gen AKNA. Recientemente, se describió un SNP en este mismo gen asociado a un riesgo mayor de desarrollar CaCU. Algunas variantes genéticas en AKNA podrían servir como indicadores de susceptibilidad y/o pronóstico; sin embargo, se necesita conocer mejor la función de AKNA y el papel de sus variantes genéticas dentro de la historia natural de la enfermedad. Por ello nuestro objetivo fue evaluar la asociación de SNP de la región promotora de AKNA con CaCU y su efecto funcional sobre los niveles de expresión de AKNA a nivel sistémico y de cérvix.

Este fue un estudio transversal que parte de un banco de biológicos previamente conformado. La genotipificación, los ensayos de expresión génica y de desbalance alélico se realizaron con sondas TaqMan en un equipo de PCR en tiempo real.

Se encontró una asociación negativa con dos SNP y CaCU. Las mujeres homocigotas para los alelos menos frecuentes del -392C>T (rs10122672) y -1372C>A (rs10817595) tuvieron tres veces menos posibilidades de tener CaCU, para ambos SNP de forma independiente. Por otro lado, hubo una asociación de magnitud elevada con niveles altos de expresión de AKNA con CaCU así como con lesión escamosa intraepitelial (LEI); sin embargo, la dirección de la asociación fue dependiente del estadio de la enfermedad. Las mujeres con CaCU exhibieron niveles de expresión de AKNA menores que las mujeres sin lesión VPH+, mientras que las mujeres con LEI tuvieron niveles de expresión de AKNA mayores. Los niveles de expresión de AKNA vistos en las pacientes con CaCU fueron dependientes de los genotipos de los SNP de interés. Se encontró un desbalance alélico en la expresión de AKNA, puesto que, independientemente del diagnóstico, observamos dos veces más transcritos procedentes del alelo menos frecuente del SNP -1372C>A que del alelo ancestral de dicho polimorfismo.

Las asociaciones significativas encontradas entre los SNP reguladores de AKNA, sus niveles de expresión en PBMC y CaCU, así como las encontradas con LEI, sugieren que la regulación transcripcional de este gen tiene un papel en la progresión de esta enfermedad. Sin embargo, su efecto es dependiente del estadio de la enfermedad. Dada la presencia del desbalance alélico entre ambos alelos del SNP rs10817595 de AKNA, se piensa que la asociación entre este SNP, y entre los niveles altos de expresión de AKNA con CaCU es debido al efecto del alelo menos frecuente sobre la regulación transcripcional de éste.

ÍNDICE

Capítulo I. Introducción……..10

1.1 Introducción.

1.2 Justificación y Pregunta de Investigación.

Capítulo II. Marco Teórico……..13

2.1 Cáncer Cervicouterino.

2.1.1 Epidemiología del Cáncer Cervicouterino.

2.1.2 Factores de riesgo para el Cáncer Cervicouterino.

2.2 Virus del Papiloma Humano.

2.2.1 Ciclo Viral del VPH.

2.2.2 VPH y Cáncer Cervicouterino.

2.3 Factor de Transcripción AT-Hook: AKNA.

2.3.1 Estructura Genética.

2.3.2 Estructura Proteica y Función.

2.3.3 AKNA y Cáncer Cervicouterino.

Capitulo III. Hipótesis y Objetivos……28

3.1 Hipótesis de Trabajo.

3.2 Hipótesis Conceptual.

3.3 Objetivos.

3.3.1 Objetivo General.

3.3.2 Objetivos Particulares.

Capítulo IV. Material y Métodos……30

4.1 Población de Estudio.

4.2 Selección de SNP.

4.3 Genotipificación y Análisis de Expresión Génica.

4.4 Cuantificación de ARNm Específico.

4.5 Análisis Estadístico.

4.7 Consideraciones Éticas y de Bioseguridad.

Capítulo V. Resultados……..……38

5.1 Análisis Bioinformático y Selección de SNP.

5.2 Análisis Descriptivo de la Población de Estudio.

5.3 Asociación de SNP con CaCU.

5.4 Análisis de los Niveles de Expresión de AKNA.

5.5 Efecto de los SNP sobre los Niveles de Expresión de AKNA en CaCU.

Capítulo VI. Discusión……..…52

6.1 Factores de Riesgo ya Conocidos para Lesión Escamosa Intraepitelial y Cáncer Cervicouterino en Nuestra Población de Estudio.

6.2 SNP no codificantes en AKNA como Factores de Susceptibilidad a Cáncer Cervicouterino.

6.3 Niveles de Expresión de AKNA a Nivel Sistémico y en Cérvix en Mujeres con Lesión Escamosa Intraepitelial y Cáncer Cervicouterino.

6.4 Desbalance Alélico en la Expresión de AKNA.

6.5 Limitaciones del Estudio.

Capítulo VII. Conclusiones y Perspectivas……..……62

Publicaciones……64

Referencias…….65

Anexos……78

Capítulo I

1.1 Introducción.

En los países en desarrollo los tipos de cáncer más frecuentes en mujeres, en orden de incidencia, son el cáncer de mama, el cáncer cervicouterino (CaCU), el cáncer gástrico, el cáncer de pulmón y el cáncer colorectal. Dentro de éstos, el CaCU es el que cuenta con el mayor número de muertes [1]. A pesar de que es uno de los pocos tipos de cáncer que cuentan con prevención primaria, hoy en día el CaCU continúa siendo una causa de mortalidad importante entre las mujeres, sobre todo en países en desarrollo [2].

Esto ha llevado a buscar nuevas alternativas de prevención primaria o secundaria complementarias a los programas ya existentes. En torno a esto, los esfuerzos se han concentrado principalmente en la búsqueda de factores genéticos de susceptibilidad, mediante los cuales, se logre la identificación temprana de las mujeres con riesgo de desarrollar CaCU y con los que se logre generar evidencia que permita identificar a quienes dirigir los programas de prevención y así lograr un mayor impacto en la disminución de la mortalidad por CaCU.

La presente investigación evalúa la problemática del CaCU en nuestro país desde un abordaje de epidemiología genética, en el cual, se examina la posible contribución del gen AKNA en el riesgo de desarrollar CaCU. En este estudio se analizaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la región promotora de dicho gen y se evaluó, por primera vez, su asociación con el riesgo de desarrollar CaCU en mujeres mexicanas. Además, con el objeto de caracterizar el posible papel de dichas variantes genéticas en la oncogénesis, se analizó la distribución de los niveles de expresión de AKNA estratificando por los genotipos de los SNP de AKNA asociados a CaCU y se realizaron ensayos de desbalance alélico en la expresión de AKNA. Todo esto se llevó a cabo bajo la hipótesis de que dichos polimorfismos predisponen, a las mujeres portadoras, a expresar AKNA en menores niveles, lo que pudiera favorecer el desarrollo del CaCU.

1.2 Justificación y Preguntas de Investigación.

Se estima que, de los 528,000 casos nuevos de CaCU y de las 226,000 muertes causadas por esta enfermedad, ocurridas durante el año 2000 en todo el continente americano, 83.9% de los casos y 81.2% de las muertes ocurrieron en la región de Latinoamérica y el Caribe. Se prevé que sin la mejora de los programas de prevención en estas regiones, los casos nuevos de CaCU aumentarán a 126 mil para el año 2025, a causa del crecimiento y envejecimiento de la población [2, 3].

México tiene una población de 37.45 millones de mujeres mayores de 15 años que se encuentran en riesgo de desarrollar CaCU [4]. Se estima que cada año 10,186 mujeres son diagnosticadas con CaCU y 5,061 mueren por esta causa en nuestro país [4, 5]. Aunque en México menos de 13% de los casos potencialmente prevenibles son detectados, la tasa de mortalidad del CaCU ha mantenido una tendencia decreciente en los últimos 15 años, con una tasa de 13.5 muertes por cada 100 000 mujeres durante el 2000 y con una tasa de 8.6 en el 2008. Esto representa una disminución de más de 30% desde el 2000 al 2008; sin embargo, esta disminución no es comparable a la disminución abrupta vista en los países desarrollados. Además, la tendencia decreciente no ha sido uniforme a lo largo de todo el país, de manera similar al comportamiento global, ya que en los estados con menor índice de desarrollo se concentra una mayor mortalidad [6,7, 8].

En México, a pesar de contar con un programa de detección oportuna desde 1974, éste tiene un bajo impacto en la incidencia y mortalidad del CaCU [9]. Es clara la necesidad que existe de contar con factores de susceptibilidad que permitan identificar a la población con mayor riesgo de desarrollar CaCU, donde, un tamizaje más riguroso o un programa de detección temprana más robusto tendrían un mayor impacto en la disminución de la mortalidad por esta neoplasia. Ya que, lograr identificar en etapas tempranas aquellas que forman parte del pequeño porcentaje de mujeres infectadas con VPH de alto riesgo que desarrollaran CaCU, serviría para focalizar los recursos operacionales y económicos de manera más eficiente y costo efectiva.

A pesar de que se han identificado diversos factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, principalmente factores intrínsecos (genéticos) y factores extrínsecos

(propios del virus), los factores genéticos muestran un gran potencial para su utilización como factores de susceptibilidad o pronóstico. En el 2000 Magnusson P. *et al* reportaron que los genes compartidos entre familiares con CaCU explicaban el 27% (IC 95% 26%-29%) de la variación total del riesgo de desarrollar la enfermedad (heredabilidad) en familias Suecas [10]. Esto sugiere que el componente genético del CaCU es importante e incluso mayor que en otros tipos de cáncer como el colorectal y el de pulmón [Magnusson PK, Lichtenstein P, Gyllensten UB. Heritability of cervical tumours. Int. J. Cancer 2000, 88 (5): 698–701.]. Dentro de la gama de factores genéticos los SNP han sido de gran interés; no obstante, pocos de los polimorfismos estudiados en esta neoplasia han mostrado asociaciones consistentes, y en gran medida, la magnitud de la asociación es leve [11].

En el primer estudio de escaneo de genoma completo realizado en CaCU se observaron tres *loci* ligados a esta enfermedad, dentro de los cuales, el locus 9q32 fue el de mayor puntaje LOD [12]. Entre otros genes, en este locus se encuentra el gen AKNA, el cual, codifica un factor de transcripción que regula la expresión de moléculas coestimuladoras de la respuesta inmune y que se ha visto involucrado en la regulación de procesos inflamatorios. Sumado a esto, se ha descrito que un SNP funcional en el gen AKNA se asocia a un mayor riesgo de desarrollar CaCU [13]. Todo esto, y la relevancia potencial de este gen por su función, nos sugieren que AKNA podría tiene un papel importante en el desarrollo del CaCU.

Algunas variantes genéticas de AKNA podrían ser indicadores de susceptibilidad y/o pronóstico; sin embargo, para poder proponer SNP de AKNA como factores de susceptibilidad al CaCU, es de suma importancia conocer mejor la función de AKNA, su regulación, y el papel de sus variantes genéticas en el desarrollo de CaCU. Es por esto que nos planteamos responder las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Los polimorfismos de la región promotora del gen AKNA se asocian con cáncer cervicouterino?
- ¿Los polimorfismos de la región promotora del gen AKNA tienen un efecto en los niveles de expresión de AKNA?

Capítulo II

2. Marco Conceptual.

2.1 Cáncer Cervicouterino.

El CaCU se define como una alteración celular maligna que se origina en las células epiteliales del cérvix del útero. Un aspecto muy particular de esta neoplasia es que presenta una fase de premalignidad que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, las cuales, pueden evolucionar a cáncer *in situ* y a su vez evolucionar a cáncer invasor [14, 15].

Estas lesiones se catalogan, según la proporción del espesor epitelial que presentan células maduras y diferenciadas, en lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) de bajo o alto grado, o bien en neoplasia intraepitelial cervical (NIC) grado 1, 2 o 3 [16]. Se estima que, si las pacientes con NIC1 no reciben tratamiento, aproximadamente 20% de estas progresarán a NIC2 y 30% de éstas a su vez progresarán a NIC3 [17]. La evidencia actual indica que más de 40% de las NIC3 progresan a cáncer invasor si no reciben tratamiento [18].

Las lesiones son potencialmente detectables mediante citología cervical utilizando una técnica de tinción conocida como Papanicolaou, la cual, permite el examen microscópico directo de las características de las células del epitelio del cérvix y del canal endocervical [19]. La ventana de detección de estas lesiones es bastante amplia, ya que para el desarrollo de CaCU se requiere de 20 años aproximadamente.

Programas de tamizaje basados en la realización regular de pruebas de Papanicolau, han logrado una disminución significativa en la incidencia y mortalidad de esta neoplasia en los países desarrollados [17]. Sin embargo, en países en desarrollo con programas de tamizaje deficientes o inexistentes, del 60 al 80% de las pacientes son detectadas en estadios avanzados de la enfermedad, cuando la probabilidad de supervivencia es muy baja [20].

2.1.1. Epidemiología del Cáncer Cervicouterino.

A pesar de que se trata de una enfermedad de larga evolución y curable a través de la modificación de los factores de riesgo, la detección temprana y el tratamiento oportuno, el CaCU continúa siendo un grave problema de salud pública. Cada año se originan cerca de medio millón de casos nuevos y se registran 231 mil muertes por esta causa [17,21]. Cerca de 86% de los casos a nivel mundial se presentan en los países en desarrollo, siendo América Latina una de las regiones con mayor tasa de incidencia en el mundo, superada únicamente por las regiones de África y de Melanesia [2,17]. Se estima que 13% de todos los casos y 12% del total de muertes por CaCU se centran en la región de América Latina [2]. Además, es la causa más importante de años de vida saludable perdidos (por cáncer) entre las mujeres de América Latina y el Caribe [3]. De acuerdo con la OMS, en los últimos 40 años, la mortalidad y la tasa de incidencia del CaCU en Latino América y el Caribe no han registrado un descenso significativo, como ha pasado en el Norte del continente [2].

En México, el CaCU ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad por neoplasia maligna en mujeres. Para México, en el 2008, se reportó una tasa de incidencia ajustada por edad de 19.2 por cada 100,000 mujeres y una tasa de mortalidad ajustada por edad de 8.6 por cada 100,000 mujeres [4,8]. La distribución en nuestro país de la incidencia y mortalidad de esta neoplasia tiene justo el comportamiento contrario al del cáncer de mama, teniendo la mayor incidencia y mortalidad en los estados del sur y sureste (Figura 2.1) [19,21].

Figura 2.1. Tasa de mortalidad por CaCU ajustada por edad en los estados de México, 2008. Adaptado de datos tomados de la Dirección General de Información en Salud de la Secretaría de Salud de México. Disponible en http://www.sinais.salud.gob.mx/descargas/xls/m_016.xls. Consultado el 1° de abril del 2012. [7].

3.1.2 Factores de Riesgo para el Cáncer Cervicouterino.

Estudios epidemiológicos han mostrado que el Virus del Papiloma Humano (VPH) se encuentra en 99.7% de todos los casos, lo que ha demostrado el origen viral del CaCU [22,23]. Sin embargo, esta patología está matizada por múltiples factores que, a falta de la posibilidad de comprobar una relación causal con el desarrollo de cáncer, sí han probado su asociación significativa y su influencia determinante para el desarrollo de la enfermedad. El análisis de estos factores de riesgo evidencia que, si bien existen factores inherentes al comportamiento sexual de la mujer, influenciados por su entorno socioeconómico y cultural, el resto de ellos están vinculados a características intrínsecas de la mujer, como la susceptibilidad genética o su estado de inmunosupresión [24]. (Figura 2.2)

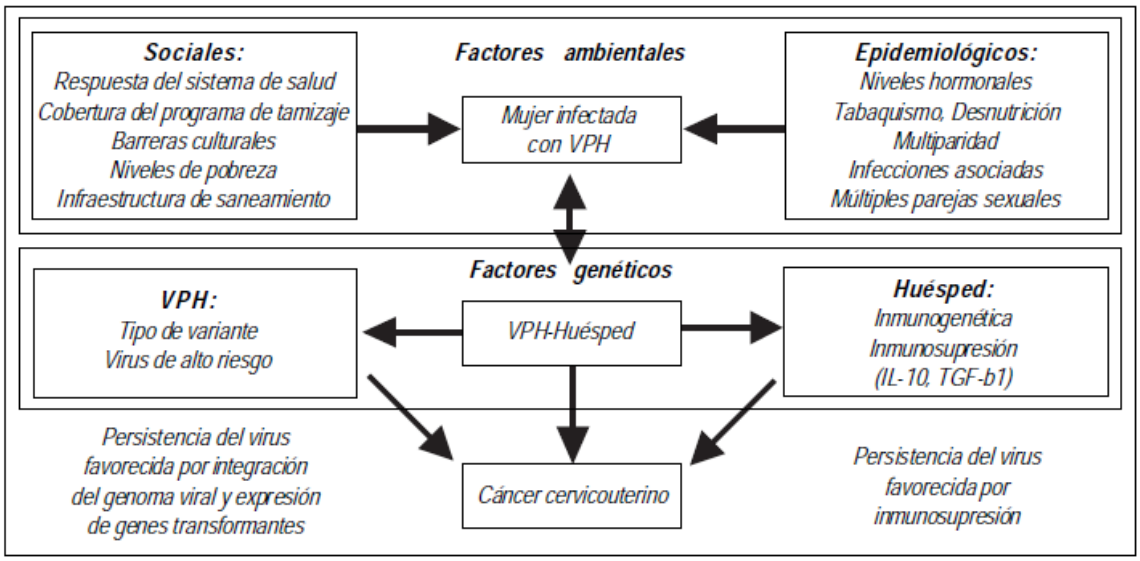

Figura 2.2. Factores de riesgo para el desarrollo de CaCU. Tomado de Torres-Poveda K *et al* [24].

El perfil de riesgo aceptado actualmente para desarrollar CaCU incluye los siguientes factores: edad entre los 25-64 años, primer coito antes de los 18 años, falta de detección citológica, uso continuo de anticonceptivos orales por más de cinco años, cuadros frecuentes de infecciones de transmisión sexual, paridad mayor a cinco, edad al primer embarazo menor de 15 años, inflamación cervical crónica resistente a tratamiento médico convencional, estatus socioeconómico bajo, escolaridad menor a cuatro años, tener de cinco a seis parejas sexuales o más, deficiencia de ácido fólico, infección con VIH y el tabaquismo crónico [23].

2.2 Virus de Papiloma Humano.

Los VPH son un grupo diverso de virus de ADN, pertenecientes a la familia de los Papillomaviridae. Como todos los virus de esta familia, los VPH sólo establecen infecciones productivas en el epitelio estratificado de la piel y mucosas de humanos, así como de una variedad de animales [25]. Este virus tiene un genoma formado por una molécula de ADN circular de doble cadena que contiene seis genes de expresión temprana (denominados E1, E2, E3, E4, E5 y E6) y dos genes de expresión tardía (denominados L1 y L2). La secuencia que codifica las diferentes proteínas se solapa en algunos casos, lo que permite utilizar de forma eficiente su pequeño genoma [26].

Se conocen cerca de 100 tipos de VPH y se han reportado más de 40 tipos capaces de infectar el tracto genital humano [19]. Los tipos de VPH genital se han subdividido en dos grupos según su potencial oncogénico: los tipos de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108), los cuales se encuentran principalmente en las verrugas genitales, y los tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), que son los considerados como factores etiológicos del CaCU. Hasta el momento se han identificado 15 tipos de VHP de alto riesgo [27].

El periodo de incubación del virus varía de ocho semanas a ocho meses, durante los cuales, se colonizan grandes extensiones de epitelio genital hasta que alcanza un periodo de infección estable que puede permanecer latente hasta por dos años [19]. La mayor parte de las infecciones con VPH en mujeres jóvenes son temporales. El 70% de las infecciones desaparecen en un año y 90% en dos años [28]. No obstante, cuando la infección persiste (entre el 5 y 10% de las mujeres infectadas), existe el riesgo de desarrollar lesiones precancerosas en el cuello del útero, que puede progresar hasta cáncer cervical invasivo. Este proceso normalmente lleva entre 15 y 20 años, lo que da una ventana amplia para la detección y tratamiento de las lesiones precancerosas, a menudo, con tasas altas de curación (Figura 2.3) [19].

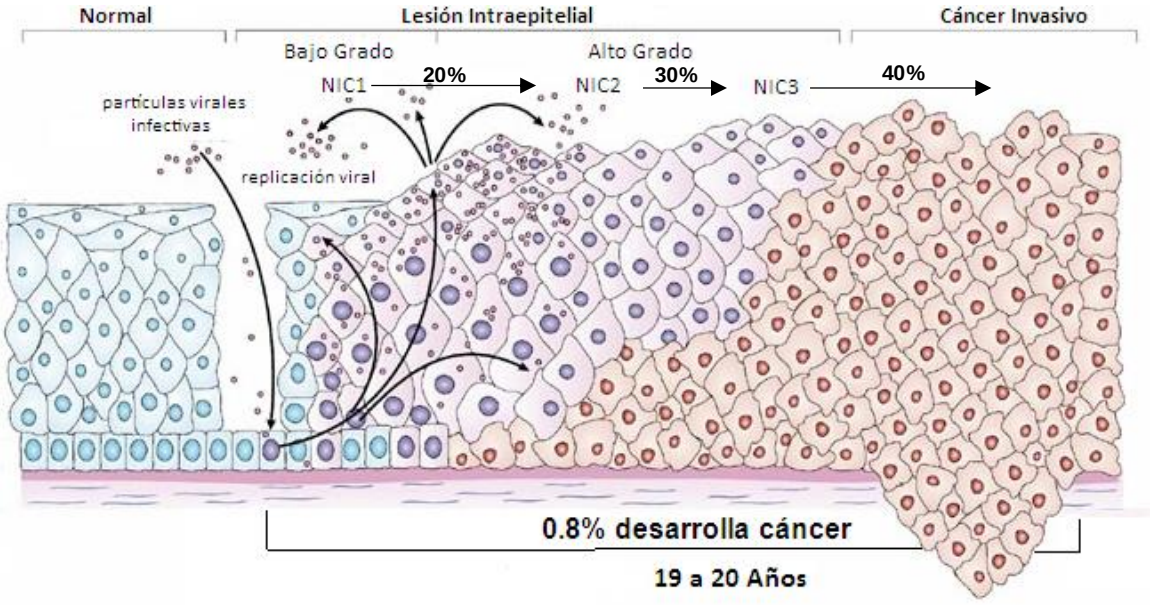

Figura 2.3. Historia natural del CaCU. Modificado de Woodman *et al* [15].

2.2.1 Ciclo Viral del VPH.

El ciclo de vida del VPH sigue estrictamente el programa de diferenciación de la célula hospedera, el queratinocito. La inoculación del virus ocurre por microtraumatismo de los epitelios genitales, masculinos o femeninos, durante el coito con una persona infectada. En el caso del cérvix uterino, el virus penetra a las células de la capa germinal del epitelio cervical, donde los viriones entran por endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina y/o caveolina, dependiendo del tipo de VPH [27].

Una vez en el interior celular, el genoma viral es transportado al núcleo, donde se mantiene como un minicromosoma circular libre (forma episomal). Entonces, se transcriben los genes tempranos (E), lo que permite al VPH realizar una replicación inicial de su ADN que resulta en un número de copias de entre 50-100 genomas virales por célula. A partir de este momento, el genoma viral se replica en promedio una vez por ciclo celular, cuando las células basales se dividen. Así, los genomas virales quedan repartidos en partes iguales entre las células hijas [27].

Cuando las células basales entran en el proceso de diferenciación que las convertirá en queratinocitos, a medida que migran hacia las capas superiores del epitelio, tiene lugar un aumento en la replicación del ADN viral, conocida como replicación vegetativa.

Además, en las capas superiores del epitelio del huésped se desencadena un complejo mecanismo de transcripción en cascada y se expresan los genes tardíos L1 y L2, que son las proteínas estructurales que encapsulan los genomas virales amplificados. El ensamblaje de los viriones progenie tiene lugar en el núcleo, liberándose cuando se descaman las células muertas del epitelio del huésped, de manera tal, que el ciclo viral continua [27].

2.2.2 VPH y Cáncer Cervicouterino.

Existen dos fenómenos bien definidos, más no independientes, para el desarrollo de esta neoplasia. El primero es que exista una alteración en la respuesta inmune celular que permita la no eliminación del VPH, y consecuentemente se dé la persistencia del virus por muchos años (persistencia viral); y el segundo son los fenómenos de transformación en las células epiteliales producidos por la presencia del virus.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por VPH es altamente prevalente en mujeres jóvenes activas sexualmente; sin embargo, la gran mayoría de las infecciones por VPH se resuelven naturalmente [28]. Aunque los anticuerpos neutralizantes pueden ser una manera efectiva de prevenir la infección y de controlar la propagación del VPH, los linfocitos T son de gran importancia en el control de las infecciones por VPH, al igual que en los tumores inducidos por VPH [29]. Esta aseveración surge de estudios realizados en regresiones espontáneas de NIC a epitelio normal [30], donde observan un gran infiltrado de linfocitos T y macrófagos en el estroma y epitelio de las lesiones [31]. Asimismo, el aumento de la incidencia y progresión de las infecciones por VPH en individuos inmunosuprimidos, ilustra la importancia crítica de la respuesta inmune mediada por células en la resolución y control de las infecciones por VPH [28].

Existen varias razones por las cuales el sistema inmune ignora o falla en detectar la infección por VPH. El VPH ha desarrollado múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero, dentro de los que se han propuesto: la modulación de la presentación de antígenos, la interferencia con la cascada del IFN tipo I, la expresión de citocinas inmunosupresoras (IL-10 y TGF-β1), la prevención de apoptosis, entre otros [29,32-37]. A pesar de la habilidad que ha desarrollado el VPH para evadir la

respuesta inmune, existen factores intrínsecos del hospedero que alteran la correcta respuesta inmune, y por lo tanto, propician la persistencia viral [38-41].

Pero, ¿cómo la persistencia viral influye en el desarrollo de CaCU? Conforme las células infectadas se dividen, los genomas virales son particionados a las células hijas. Una de las células hijas migra a las capas suprabasales y se somete a la diferenciación, mientras que la otra célula hija continua dividiéndose, siendo el reservorio para la replicación viral ininterrumpida. En células no infectadas, la diferenciación conllevaría a la salida del ciclo celular, pero al estar infectadas por el VPH, su ciclo celular permanece activo debido a la acción de las oncoproteínas virales (E5, E6 y E7) [29].

Durante la fase inicial de la infección, el VPH se encuentra presente de forma episomal, pero conforme la persistencia viral se mantiene en el tiempo, aumenta la probabilidad de que el genoma del VPH se integre al genoma de la célula hospedera [29]. Se ha identificado que el sitio preferente de integración en el genoma viral es el marco de lectura abierto (ORF) del gen E2, el cual, regula negativamente la expresión de los genes E6 y E7. Por lo tanto, la integración del genoma viral al genoma del hospedero resulta en un aumento y descontrol de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, lo que propicia una proliferación celular descontrolada y por ende, la progresión a CaCU [42]. Esto, debido a que E6 es capaz de degradar a p53 y a Bak [43-45], teniendo un efecto anti apoptótico, y a que E7 es capaz de degradar a pRb, lo que genera un efecto proliferativo [46,47]. Existe evidencia que apoya la noción de que E6 y E7 son necesarias pero no suficientes, ni por si solos ni con su acción conjunta, para convertir células normales a células inmortalizadas o malignas ni para el mantenimiento del fenotipo maligno en células cancerosas [47]. Además de la presencia de E6 y E7, se ha visto que existen otros factores determinantes en la progresión a CaCU. Entre ellos se encuentran la expresión de proto-oncogenes (c-myc y ras) [48], la supresión de genes supresores de tumor y la alteración en la respuesta inmune del paciente [38,39, 49].

En este último sentido, ante la persistencia viral, y por consiguiente la expresión constitutiva de E6 y E7, se genera una estimulación crónica de los linfocitos T efectores, la cual, sin una coestimulación inmune apropiada puede conllevar a la

anergia de dichos linfocitos T [50]. Se ha propuesto que otra consecuencia de la estimulación crónica de los linfocitos efectores es la generación de linfocitos T reguladores (Treg). Estas células forman parte de los sistemas naturales de control integrados en la respuesta inmune, y su función es limitar y reducir los niveles de inmunidad celular virus específico cuando el peligro ha pasado [50]. Estos efectores pueden suprimir la actividad de los linfocitos T citotóxicos (LTC) ya sea directamente o por la producción de citocinas como IL-10 y TGF-β1 [49,50]. Como se mencionó anteriormente, la producción de IL-10 es un mecanismo de escape del VPH a la respuesta inmune celular, y se ha visto que la expresión de IL-10 y TGF-β1 se inicia desde el momento de la infección y aumenta de acuerdo al avance de la enfermedad [51]. Recientemente nuestro grupo de investigación, demostró que conforme avanza la enfermedad, la expresión de la cadena Z (CD3ζ) del receptor de los linfocitos T (TCR), componente vital para la activación de éstos, se ve disminuida en la presencia de estas dos citocinas [49]. Lo que sugiere que la persistencia viral puede favorecer este escenario mediante la inducción de la expresión de IL-10 y TGF-β1 por E6 y E7 [33,34,52,53].

Por otro lado, se ha demostrado que las células de CaCU son capaces de perder la expresión de las moléculas presentadoras de antígenos HLA clase I y II [40,41,50]. Lo que les da a estas células una ventaja para evitar su eliminación por la respuesta inmune, ya que éstas carecen de complejos proteicos HLA-VPH en la superficie celular necesarios para que el receptor de los linfocitos T (TCR) lo reconozca [50]. Uno de los efectos de este fenotipo es la falta de expresión de moléculas involucradas en la transducción de señales.

Para concluir este razonamiento, uno de los factores determinantes en el proceso neoplásico del CaCU es la alteración de la respuesta inmune, la cual, se caracteriza por la falta de expresión de moléculas coestimuladoras de los linfocitos T, la disminución de su activación y la ausencia de moléculas HLA clase I y II. Por ende, no hay presentación antigénica por parte del tumor y no hay reconocimiento antigénico por parte de los LTC. Por consiguiente la respuesta inmune no es capaz de eliminar las células tumorales [54].

2.3 Factor de Trascripción AT-Hook: AKNA.

2.3.1 Estructura Genética.

El gen que codifica para el factor de transcripción AT- Hook (AKNA) se encuentra localizado en el cromosoma 9q32, está constituido por 24 exones y tiene una extensión de ADN genómico de aproximadamente 61Kb (Figura 2.4). Esté da origen a nueve transcritos con producto proteico distinto (nueve isoformas), mediante la utilización de promotores alternos, de procesos de empalme (splicing) y de dos sitios distintos de poliadenilación [55,56].

Siddiqa A. *et al*, [55] observaron que AKNA es expresado principalmente en órganos linfoides secundarios, además, Sims-Mourtada *et al*, [56] encontraron que, de los nueve transcritos funcionales, cuatro presentan especificidad de tejido. Los ARNm derivados del promotor putativo 1c (transcritos C1 y C2, figura 2.4) únicamente se expresan en tejido linfoide secundario, mientras que los ARNm derivados de los promotores putativos de los exones 2 y 3 (transcritos D y E, respectivamente) sólo se expresan en el timo. Los transcritos restantes, con excepción de los transcritos B1 y B2 que se expresan en niveles similares en ambos tejidos, presentan una expresión predominante en las amígdalas; sin embargo, esta no es específica ya que también se expresan en el timo [56].

AKNA es un gen con una alta variabilidad genética, hasta el momento existen 9,155 SNP reportados, de los cuales, únicamente 1,603 caen en exones. De los 7,660 SNP que caen en regiones intrónicas o intergénicas, 1,353 se encuentran cerca de la región no traducida 5´ (5´ UTR) del gen AKNA [57].

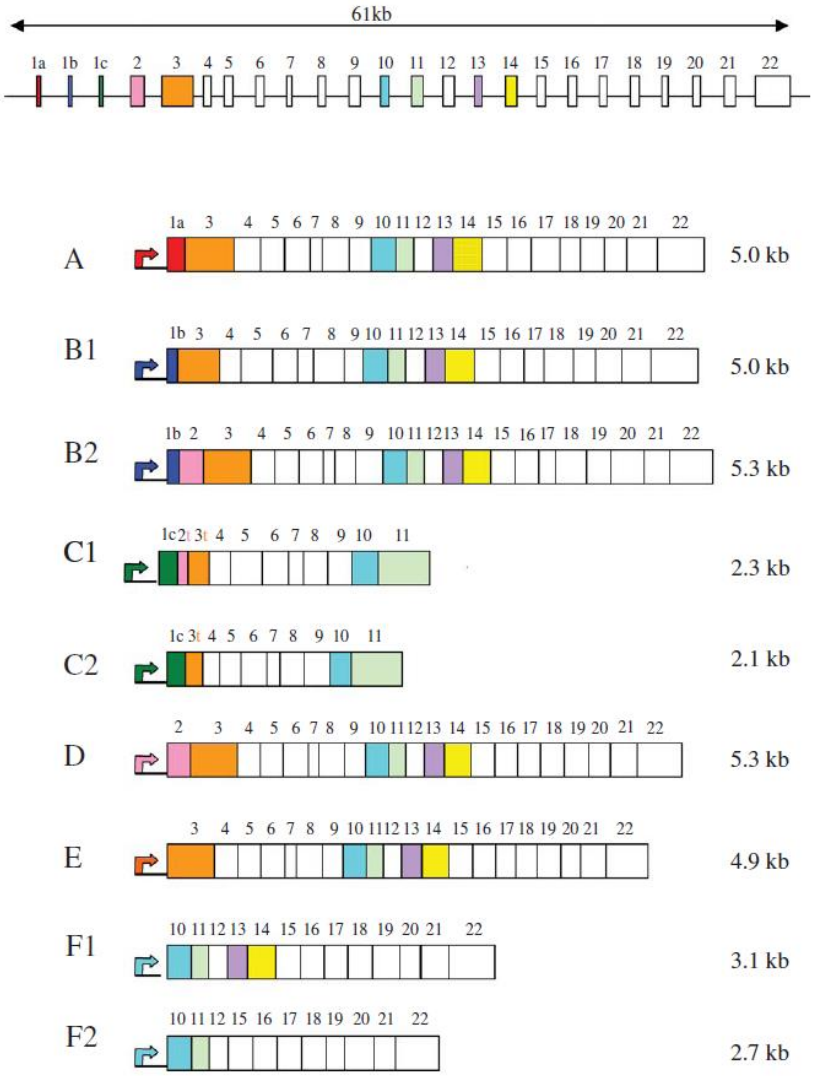

Figura 2.4. Estructura genética y transcritos de AKNA. Tomado de Sims-Mourtada *et al.* [56].

2.3.2 Estructura Proteica y Función.

La proteína AKNA está integrada por 633 aminoácidos y cuenta con un peso aproximado de 70 KDa. Esta proteína cuenta con un dominio de unión a ADN de tipo AT-Hook, que consta de nueve aminoácidos (RTRGRPADS). Este dominio se caracteriza por su capacidad de interaccionar directamente con el surco menor del ADN en regiones ricas en adenina y timina del genoma, de ahí su nombre [55,58] (Figura 2.5). El motivo AT-Hook fue descrito por primera vez en la proteína cromosomal del grupo de alta movilidad HMG–I (Y) y desde entonces ha sido reportado en otras proteínas con capacidad de unión a ADN [58]. Los aminoácidos G-R-P del dominio AT-

Hook se encuentran altamente conservados en todas estas proteínas, las cuales, se han descrito como factores modificadores de la cromatina o como factores de transcripción y se ha demostrado su capacidad de activar o reprimir una gran gama de redes genéticas [58].

Según lo descrito por Reeves *et al*, [59] los cuatro aminoácidos consenso G-R-P son necesarios y, sobre todo, suficientes para que la proteína se una al ADN. Visto de esta manera, en AKNA se tienen dos dominios del tipo AT-Hook (a1 y a3), uno en cada extremo de la proteína. Por otro lado, AKNA también cuenta con otro motivo de unión al ADN (a2), el cual, fue descrito por Huth *et al*, [60] al estudiar una isoforma truncada de HMG-1(Y), denominada HMG-I (2/3). Este último dominio, si bien no es el dominio consenso AT-Hook, reconoce múltiples elementos reguladores en el ADN y se cree que pudiera modelar la conformación del ADN.

AKNA también tiene tres dominios PEST localizados en las regiones Leu10-Thr43, H149-Ser171, y P616-T63 (b1, b2 y b3, respectivamente). Estas regiones son sitios blanco para la degradación de la proteína por lo que se considera que la vida media de AKNA pudiera ser corta (Figura 2.5).

Siddiqa *et al*, [55] sugieren la capacidad de AKNA de regular positivamente la expresión de moléculas coestimuladoras de la respuesta inmune, específicamente de CD40 y CD40L. Además, observaron que durante la diferenciación de linfocitos B, AKNA se expresa principalmente en linfocitos localizados en los centros germinales, en donde, las interacciones entre receptor y ligando son cruciales para la maduración de los linfocitos B [55,56].

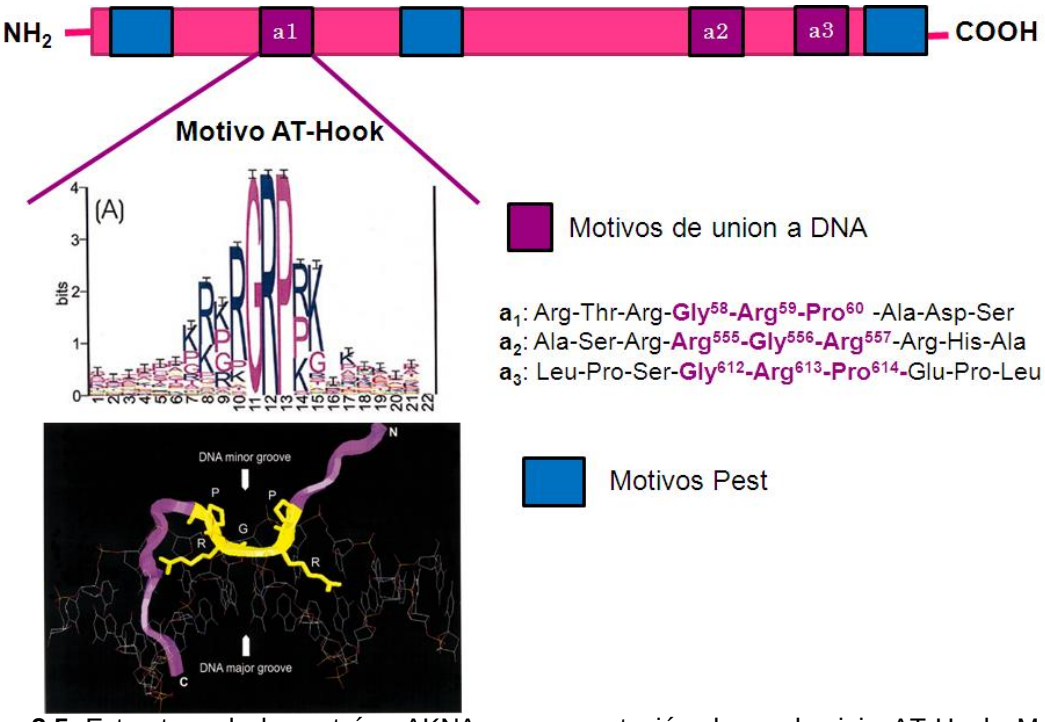

Figura 2.5. Estructura de la proteína AKNA y representación de su dominio AT-Hook. Modificado de Aravind *et al.* [58].

Recientemente se publicó un estudio que sugiere un papel funcional adicional de AKNA. En este estudio se generó un modelo animal en ratones, donde, mediante mutación dirigida, eliminaron el gen AKNA. Los autores observaron que los ratones KO para AKNA tenían un menor tamaño que sus hermanos heterocigotos y homocigotos silvestres (WT), además, observaron que a los ocho días de nacidos, únicamente 25% de los ratones KO sobrevivieron, en comparación con el 100% de los ratones WT. Aparentemente, las causas probables de dichas muertes prematuras fueron reacciones inflamatorias agudas inducidas por patógenos, especialmente en los pulmones, con destrucción alveolar e infiltración de neutrófilos. Asimismo, Ma *et al*, [61] investigaron la expresión de una gama amplia de genes relacionados con el proceso inflamatorio y encontraron que en los ratones KO, había una mayor expresión de metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9), de interferón-γ (IFNγ), de interleucina-1β (IL-1β) y de otros genes que codifican moléculas involucradas en la activación e infiltración alveorlar de neutrófilos (proteína granular neutrofílica (NGP), péptido antimicrobiano relacionado con la catelicidina (CRAMP) y S100A8/9). Los autores de este estudio concluyen que el

fenotipo secundario a la deficiencia de AKNA se debe a una pérdida global de su función represora (hasta entonces desconocida), la cual aparentemente desregula genes esenciales para el control del proceso inflamatorio, que sin control genera daño tisular severo y muerte prematura [61]. A partir de este estudio, se ha propuesto que la función de AKNA es necesaria para regular la magnitud de la activación de neutrófilos inducida por patógenos, y para la proliferación e infiltración de éstos a los tejidos. Lo que implica que, cuando AKNA no es expresado, las reacciones de los neutrófilos son incrementadas con el fin de destruir patógenos [62].

Apoyando la noción de que AKNA juega un papel importante en la regulación de los procesos inflamatorios, se reportó una asociación de AKNA con una enfermedad auto-inflamatoria denominada Síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), la cual es una enfermedad sistémica inflamatoria caracterizada por la aparición de uveítis y afectación de diversos órganos ricos en pigmento. En este estudio los autores encontraron una disminución significativa en la expresión de CD18 y AKNA en los pacientes con VKH en comparación con los controles sanos. Este estudio es consistente con la hipótesis de que la deficiencia en AKNA conlleva a una desregulación negativa de los procesos inflamatorios, lo que podría resultar en un proceso de inflamación crónica [63]. Sin embargo, el efecto causal de la disminución de AKNA no ha sido evaluado a la fecha, por lo que se desconoce si realmente lo anterior podría explicar lo observado por Mao *et al*. [63].

Por otro lado, en un estudio de secuenciación de ARN en células hepáticas humanas (Huh 7.5) recién infectadas con virus de hepatitis C (VHC), encontraron que AKNA se encuentra expresado. Los autores reportan que, dentro de los 50 genes con mayor expresión durante la infección aguda por VHC, AKNA se encuentra cuatro veces más expresado tras 72 horas de la infección que en las células no infectadas. No existe evidencia alguna que apunte directamente al posible papel de AKNA durante una infección viral, por lo que los autores no logran concluir si esta sobre expresión de AKNA se debe a un mecanismo del hospedero o del virus para regular negativamente la red de genes pro-inflamatorios durante la infección aguda de VHC [64].

2.3.3 AKNA y Cáncer Cervicouterino.

Un gran número de factores genéticos han sido asociados con CaCU, sobre todo en genes relacionados con la respuesta inmune; no obstante, ninguno ha mostrado resultados consistentes, con excepción del polimorfismo DRB1*13/DBQ1*060 del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) clase II [11,65-71]. Dentro de dichos factores genéticos se encuentran polimorfismos en los genes que codifican para el factor de necrosis tumoral (TNF) [72,73], la matriz metalopeptidasa 1 [74], p53 [75-79], interleucina 10 (IL-10) [38,73,80,81], el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) [82], interleucina 1 beta (IL-1β) [11], el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) [11] y FAS [83].

En el primer estudio de ligamiento basado en microsatélites, llevado a cabo en 278 pares de familiares afectados, se identificaron tres loci ligados al CaCU. Dentro de estos tres loci, el de mayor puntaje LOD fue el locus 9q32, marcador D9S1856 y D9S930 (MLS=1.95, $p< 0.002$). Dentro de éste, se han identificado cinco genes candidatos potencialmente involucrados con la predisposición genética a esta enfermedad y que tienen funciones relevantes en el desarrollo de la respuesta inmune (IKBKAP, PTPN3, TSCOT, AMBP, AKNA, TNFSF15, TNFSF8 y DEC1). Entre estos se encuentra el gen AKNA [12].

El artículo de Perales *et al*, es la primera evidencia de la posible relación directa de AKNA con el CaCU [13]. En éste, se evaluó la asociación del SNP R1119Q del gen AKNA con CaCU en una población mexicana. Este polimorfismo está ubicado en el aminoácido Arginina (R) de la región consenso del dominio AT-Hook amino terminal de AKNA y provoca el cambio de un aminoácido básico por un aminoácido neutro hidrofílico (Glutamina), lo que potencialmente pudiera comprometer la funcionalidad de AKNA. En este estudio, se analizó la frecuencia de Arginina (R) o Glutamina (Q) de dicho polimorfismo en 21 mujeres mexicanas con NIC, 26 con CaCU diagnosticado y 50 controles sin lesión pero positivas para la infección por VPH. Los autores observaron que el genotipo Q/Q estuvo presente en 8.33% de los controles, en 16.67% de las mujeres con NIC y en 75% de los pacientes con CaCU. Asimismo, en este estudio se encontró una fuerte asociación del genotipo Q/Q con el riesgo de presentar CaCU (RM= 3.66, IC95%=1.35- 9.94) [13,62].

Capítulo III

3.1 Hipótesis de Trabajo.

Algunas variantes genéticas en la región promotora del gen AKNA disminuyen su nivel de expresión, lo cual aumenta la susceptibilidad al cáncer cervicouterino.

3.2 Hipótesis Conceptual.

Se ha descrito que AKNA es capaz de regular la expresión de moléculas coestimuladoras de la respuesta inmune, como CD40 y su ligando, y de regular negativamente genes involucrados en el proceso inflamatorio. Por lo que, variantes genéticas en la región promotora del gen AKNA que disminuyan su nivel de expresión, generarán una menor expresión de CD40 y CD40L, lo que resultará en una respuesta inmune deficiente y por consiguiente en el desarrollo de CaCU. Por otro lado, si disminuye la expresión de AKNA su función represora de genes involucrados en el proceso de inflamación se anularía, lo que conllevará a un aumento en la expresión de estos genes y, por ende, a un proceso de inflamación crónico. Esto se ha visto asociado con un mayor riesgo de desarrollar distintas neoplasias, incluida el CaCU (Figura 3).

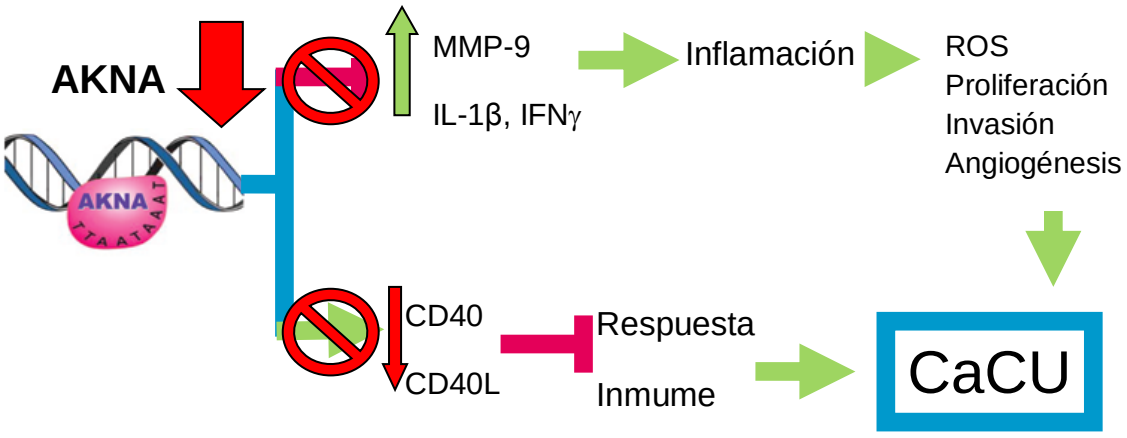

Figura 3. Hipótesis conceptual.

3.3 Objetivos.

3.3.1 Objetivo General.

Evaluar la asociación de los polimorfismos de un solo nucleótido de la región promotora de AKNA con CaCU y su efecto funcional sobre los niveles de expresión de AKNA a nivel sistémico y de cérvix.

3.3.2 Objetivos Particulares.

1. Seleccionar SNP en la región promotora del gen AKNA que se encuentren en elementos de respuesta putativos para factores de transcripción y que estén previamente validados.

2. Evaluar la asociación de SNP en la región promotora del gen AKNA con CaCU.

3. Correlacionar los niveles de expresión del gen AKNA a nivel sistémico y de cérvix con la presencia de CaCU.

4. Analizar la relación entre los SNP de la región promotora con los niveles de expresión de AKNA y CaCU.

5. Evaluar si existe un desbalance alélico en la expresión de AKNA propiciado por los alelos de los SNP de interés.

Capítulo IV

4 Materiales y Métodos.

4.1 Población de Estudio.

Este proyecto se llevó a cabo mediante el uso del banco de biológicos conformado a partir del estudio “Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical” del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Las muestras que comprenden dicho banco fueron obtenidas de mujeres sin lesión en cuello uterino (SLC) y con lesión escamosa intraepitelial (LEI) en cuello uterino del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos (CAPASAM), y de mujeres con CaCU en cualquier estadio del Servicio de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Los criterios de inclusión para la selección de las mujeres que comprenden dicho banco fueron los siguientes:

- Mujer que acudió a consulta a CAPASAM durante el periodo de junio 2008 a diciembre de 2011 y a la Unidad de Ginecología del INCan con diagnóstico histopatológico de CaCU, durante el periodo de septiembre de 2010 a diciembre de 2011.
- Diagnóstico citológico, colposcópico e histopatológico reciente.
- Consentimiento informado firmado donde se autorice la toma de muestra sanguínea y de cérvix, al igual que, su almacenamiento para la construcción de un banco de muestras biológicas que se utilizará en proyectos de investigación futuros,
- Residencia en México de mínimo cinco años,
- Mujeres mayores de 18 años y
- No haber iniciado tratamiento

Se excluyeron a aquellas mujeres que padecieran alguna enfermedad autoinmune, que tuvieran un cuadro inflamatorio o que tuvieran alguna coinfección de transmisión sexual al momento de la selección.

A cada mujer que decidió participar, posterior a la firma del consentimiento informado, se le tomó una muestra sanguínea con anticoagulante-EDTA (6ml aprox.) y sin anticoagulante (5ml aprox.). A partir de esta muestra se obtuvo el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) mediante Trizol. Asimismo, se tomó una muestra de exudado de cérvix en las mujeres SLC y de biopsia de cérvix para las mujeres con LEI y CaCU, de la cual, se obtuvo tanto ADN como ARN mediante un kit comercial (Genomic DNA Purification kit de Fermentas). Para el caso del ARN procedente de ambas muestras (de sangre periférica y de raspados o biopsias de cérvix), se realizó la síntesis de la cadena complementaria del DNA (cDNA) para su mejor preservación. El banco de muestras del proyecto descrito ("Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical"), se encuentra en congeladores de propiedad del laboratorio 4 planta baja del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CISEI) del INSP, bajo el resguardo del Dr. Vicente Madrid Marina.

La población de estudio para este proyecto, comprende 420 mujeres en las que, dentro del banco descrito, fue confirmada la infección por VPH. De éstas se cuenta con muestra de ADN y ARN de sangre periférica, y con muestra de ARN de exudado o biopsia de cérvix, según sea el caso. De las 420 mujeres VPH positivas (VPH +), 109 no presentan LEI, 149 tienen diagnóstico de LEI (122 con lesión de bajo grado y 27 con lesión de alto grado) y 162 tienen diagnóstico confirmado de CaCU.

4.2 Selección de SNP.

En primera instancia se obtuvo, de la base de datos RefSeq de NCBI [84], la secuencia río arriba del transcrito funcional F1 de AKNA (2Kb a partir del inicio de la trascripción). A partir de dicha secuencia, se realizó un análisis bioinformático para la identificación de sitios de unión de factores de transcripción (FT) en esta región. Para ello, se utilizaron cuatro algoritmos diferentes con el fin de brindarle al análisis una mayor cobertura, reproducibilidad y validez. A continuación, se enlistan los programas que se utilizaron junto con una breve descripción de cada uno de ellos, al igual que se especifican los parámetros usados.

- Neural Network Promoter Prediction. Este programa es capaz de predecir inicios de transcripción y cajas TATA en secuencias genómicas de eucariotas, mediante un modelo de red neuronal con arquitectura de tiempo de retardo. Este algoritmo permite espaciamientos variables entre los sitios de unión funcionales, lo que juega un papel muy importante en el proceso de iniciación de la transcripción [85]. Se tomó como punto de corte un puntaje de 0.8 como mínimo. Este software se encuentra en línea con acceso gratuito en: http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html

- TFSEARCH. Esta herramienta en línea (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) busca fragmentos de secuencias altamente correlacionadas con la base de datos de perfiles de sitios de unión de FT "TFMATRIX" en la base de datos "TRANSFACT", la cual, contiene datos probados experimentalmente de sitios de unión de FT y de sus genes regulados. Además, debido a la amplia compilación de sitios de unión, la base de datos "TRANSFACT" permite la derivación de matrices de posición peso. Se restringió la búsqueda a sólo matrices de FT de vertebrados y el punto de corte fue un puntaje mínimo de 0.8.

- SiteGA. Este programa toma en cuenta interacciones estructurales con el core del sitio de unión del FT y con las regiones flanqueantes. Esto lo hace mediante el uso de un algoritmo genético con una función discriminatoria de las frecuencias de dinucleótidos posicionados a nivel local. Este método se deriva a partir del análisis del contexto de los dinucleótidos locales, y proporciona la sutileza del análisis discriminante con la velocidad de un algoritmo genético en la detección de características significativas. Se estima que este abordaje tiene una mayor precisión que los métodos tradicionales de matrices de posicionamiento ponderadas [86]. Se utilizaron todos los FT disponibles en el programa gratuito (E2F, HNF4, IRF1, ISGF3, NFkB, PPAR, SF1, SREBP y STAT1) y se adecuó el punto de corte del puntaje para cada FT a no menos de 0.8. (http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/sitega/index.pl)

- P-Match. Este programa gratuito en línea (http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/pmatch/bin/p-match.cgi) combina los abordajes de matrices de peso y de comparación de patrones, por lo que proporciona una mayor precisión en el reconocimiento de sitios de unión de FT. Esta herramienta usa la librería de matrices de peso de la base de datos "TRANSFACT" junto con los alineamientos de los sitios de unión asociados con estas matrices. El algoritmo de P-Match busca subsecuencias de ADN, que coincidan con alguno de los sitios de unión a FT conocidos para cada set de datos. Este algoritmo calcula el puntaje de similitud usando la matriz de peso correspondiente, lo que constituye la principal novedad de este algoritmo, en contraste con el abordaje clásico de comparación de patrones que calcula un puntaje únicamente por medio del conteo de las discrepancias [87]. Se utilizó únicamente el conjunto de matrices correspondiente para vertebrados, y se delimitó la búsqueda a sólo las matrices de alta calidad. Para el punto de corte se utilizó la opción que minimiza los falsos negativos y permite encontrar el mayor número de sitios de unión genómicos. Esta opción es la más recomendada para el análisis detallado de fragmentos cortos de ADN. Asimismo, debido a la opción que presenta de utilizar perfiles de matrices específicos para el tipo celular, se realizaron dos análisis por separado.

El primero fue de manera no específica, es decir utilizando ningún perfil específico, lo que evalúa a los FT que no presentan ninguna especificidad por el tejido. Mientras que el segundo fue utilizando el perfil específico para células del sistema inmune, esto debido a la evidencia previa de que AKNA se expresa principalmente en este tipo celular.

Con los resultados que arrojaron cada uno de los programas se ubicaron, en el contexto genómico, los sitios putativos de unión a FT dentro de la región promotora del gen AKNA. Una vez hecho esto, se realizó una búsqueda en la base de datos dbSNP para así contar con todos los SNP reportados en la región promotora de AKNA hasta la fecha. De todos los SNP reportados se hizo una selección de aquellos que cumplieron con los siguientes criterios:

- Dentro de sitios de unión de FT.
- Validados por HapMap o 1000 Genomes project
- Frecuencia del alelo menor (MAF) > 1%

4.3 Genotipificación y Análisis de la Expresión Génica.

La genotipificación se realizó por discriminación alélica con la tecnología de PCR en combinación con sondas Taqman fluorogénicas en el equipo de PCR en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems.

Para el análisis de expresión de AKNA se utilizó la sondan TaqMan con número de ensayo Hs00363936_m1, de Applied Biosystems, la cual amplifica la unión entre le exón 14 y 15 y permite identificar 6 de los 9 transcritos distintos reportados (incluyendo el transcrito F1). Se realizó un rango dinámico con la finalidad de determinar la eficiencia de amplificación para el gen AKNA. Para realizar el PCR en tiempo real se utilizó el equipo 7900HT de Applied Biosystems, y las unidades relativas de expresión de AKNA se determinaron con el gen HPRT1 como control endógeno. Para el control endógeno también se realizaron el rango dinámico y se comprobó que la eficiencia de amplificación fuera semejante a la obtenida para el gen AKNA. Todo lo anterior se hizo por duplicado y con un coeficiente de variación (CV) no mayor a 3%. Si los duplicados resultaban con un CV mayor se repetía el ensayo. Todo lo anterior se realizó tanto a nivel de cérvix (cDNA derivado de los exudados o de las biopsias según sea el caso) como a nivel sistémico (cDNA derivado de células mononucleares de sangre periférica [PBMC]).

Las dos sondas TaqMan de expresión utilizadas se seleccionaron de tal manera que uno de sus oligos cayese en una unión exón-exón. Esto con la finalidad de evitar que se amplificara DNA genómico.

4.4 Cuantificación de ARNm Específico.

Para realizar la cuantificación de ARNm específico de alelo, primero se hizo la búsqueda de un SNP sinónimo ligado a cada uno de los SNP que se encontraron asociados con CaCU. Esta búsqueda se realizó en la base de datos del proyecto de los 1000 genomas. Mediante el software Primer Express de Applied Biosystems se diseñó la sonda TaqMan específica para cada alelo de cada SNP sinónimo, procurando que al menos uno de los oligos cayese en una unión exón-exón para evitar la amplificación de DNA genómico. Con esto, se realizó la determinación de los niveles de expresión por alelo, para cada SNP sinónimo, mediante PCR en tiempo real. Se ocupó como templado el cDNA derivado de los PBMC, pues fue en estos donde se encontró una mayor expresión relativa de AKNA. Para la cuantificación se siguió el método propuesto por Chen X. *et al* [88]. Se realizó una curva estándar a partir de diluciones de dos muestras homocigotas, cada una para un alelo diferente del SNP asociado y que tuvieran un valor de Ct similar (±0.5) para el gen endógeno HPRT1 entre sí. Las diluciones utilizadas fueron 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Con esta curva estándar se obtuvo la pendiente y la ordenada al origen necesarias para calcular la tasa de expresión de ARNm específico por alelo mediante la ecuación propuesta por Chen X. *et al:*

$$\log_2\left(-\frac{alelo\ 2}{alelo\ 1}\right) = a \times (Ct_2 - Ct_1) + (b_2 - b_1)$$ [88]

Una vez obtenida la ecuación lineal $(f(x) = 1.436 \times x + 0.060)$ derivada de la curva estándar, con una R^2 =0.97, se hicieron los ensayos de desbalance alélico únicamente en las mujeres heterocigotas para el SNP asociado [88].

4.5 Análisis Estadístico.

En primera instancia se hizo un análisis descriptivo de todas las características de la población de estudio. Posteriormente, se realizó un análisis de asociación, mediante modelos de regresión bivariados y multivariados, de cada SNP con los diferentes grupos de diagnóstico ya descritos (sin lesión, lesión intraepitelial de bajo o alto grado y CaCU). De la misma manera se evaluó la asociación de los niveles de expresión de AKNA con los diferentes grupos de diagnóstico, para lo cual, se categorizaron las variables (expresión en PBMC y en cérvix) en terciles de acuerdo a la distribución observada en el grupo de mujeres SLC para cada variable. Con los SNP que se encontraron asociados, se analizó la relación SNP-nivel de expresión de AKNA mediante modelos de regresión lineal multivariados estratificados por los alelos de los SNP asociados.

Para finalizar, mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis se comparó, en sujetos heterocigotos, el logaritmo en base dos de la tasa del número de transcritos específicos para cada alelo del SNP sinónimo (análisis de desbalance alélico). Asimismo se calculó el estimador de la media poblacional de dicha variable con sus intervalos de confianza para cada grupo de estudio y de forma global.

El nivel de significancia estadística considerado para este estudio fue de 0.05, lo que representa un nivel de confianza de 95%. Todos los análisis de regresión se ajustaron por edad, tipo de VPH, antecedentes de enfermedad de transmisión sexual, y antecedentes heredofamiliares de cáncer. Todo lo anterior se llevó a cabo en el software STATA 12 (StataCorp, Collage Station, TX, EUA).

4.6 Consideraciones Éticas y de Bioseguridad.

El presente trabajo fue aprobado por las comisiones de investigación, ética y bioseguridad del INSP (Anexo 1, 2 y 3). Asimismo, se cuenta con el consentimiento informado firmado de cada mujer cuya muestra será utilizada para este proyecto (ver anexo 4).

Capítulo V

5. Resultados.

5.1 Análisis Descriptivo de la Población de Estudio.

Las mujeres con CaCU y con LEI fueron mayores en edad al momento del diagnóstico, iniciaron su vida sexual y tuvieron su primer parto a menor edad; tuvieron mayor número de gestaciones; y reportaron de manera más frecuente el uso de ningún método anticonceptivo que las mujeres sin lesión VHP+. Por otro lado, la mayoría de las mujeres, independientemente del diagnóstico, tenían infección comprobada por VPH de alto riesgo, habían tenido menos de tres parejas sexuales, reportaron no haber tenido antecedentes familiares de ningún tipo de cáncer, ni de CaCU en particular, y reportaron no tener el hábito de fumar en el momento de entrar al estudio. Las mujeres con LEI reportaron con mayor frecuencia haber padecido con anterioridad infección de transmisión sexual (ITS), diferentes a la infección por VPH, que las mujeres sin lesión VPH+ y que las mujeres con CaCU. Incluso, la mayoría de las mujeres con CaCU reportaron no haber tenido ningún tipo de ITS con anterioridad (Tabla 5.1).

Con los factores de riesgo ya establecidos para LEI y CaCU se realizaron modelos de regresión logística multinomial, ajustando por edad, para comprobar su asociación en nuestra población de estudio. Efectivamente, se encontró riesgo mayor de tener LEI y CaCU en las mujeres que iniciaron su vida sexual y tuvieron su primer hijo antes de los 22 años, al igual que las mujeres que tuvieron un mayor número de gestaciones (más de tres hijos). Asimismo, para estas variables se encontró una tendencia estadísticamente significativa (p de tendencia<0.05). Por otro lado, se encontró una asociación significativa positiva del uso de ningún método anticonceptivo con CaCU y del uso de anticonceptivos hormonales con LEI. Sin embargo, para las variables de antecedentes familiares de cáncer y de ITS se observó un comportamiento opuesto a lo esperado en las mujeres con CaCU, con una asociación negativa estadísticamente significativa con el antecedente de haber padecido algún otra ITS y CaCU, al igual que

con el antecedente de haber padecido con anterioridad una infección por VPH. No obstante, para las mujeres con LEI ambas asociaciones fueron positivas. Aunado a esto, el tener antecedentes familiares de algún tipo de cáncer se asoció de forma negativa tanto con LEI como con CaCU. Por último, no se encontró asociación estadísticamente significativa de las variables de edad de la menarca, número de parejas sexuales, antecedentes familiares de CaCU y tabaquismo con LEI, ni con CaCU (Tabla 5.2).

Con todo lo anterior, y tras haber llevado a cabo un análisis de bondad de ajuste con distintos modelos (Anexo 6), decidimos incluir como covariables en los siguientes análisis de asociación las variables de edad, tipo de VPH (bajo o alto riesgo), antecedentes de ITS y antecedentes familiares de cáncer.

5.2 Análisis bioinformático y selección de SNP.

En primera instancia se decidió validar los seis sitios de inicio de la transcripción (SIT) reportados previamente por Sims-Mourtada *et al.* [56]. Para ello, se obtuvo de la base de datos RefSeq de NCBI la secuencia genómica de AKNA (9:114334149-114398503) y se introdujo a la herramienta bioinformática Neural Network Promoter Prediction (NNPP), que fue la misma herramienta utilizada por Sims-Mourtada *et al* [56]. Además de las seis cajas TATA, con sus respectivos SIT putativos reportados anteriormente, el programa encontró un total de 59 cajas TATA y SIT putativos no reportados con anterioridad en toda la secuencia genómica del gen AKNA. Exclusivamente para la isoforma F1 se encontraron dos SIT putativos adicionales al reportado, incluso, uno de ellos obtuvo un mayor puntaje (localizado en la base 9:114361854 con un score de 0.97) que el ya reportado (localizado en la base 9: 114360173 y con un score de 0.94) (Figura 5.1). Dado esto, se decidió establecer la región promotora de estudio a partir de la posición anterior a la primera base de la secuencia del transcrito F1 reportada (AY703046) hasta 2Kb río arriba del último SIT predicho (9:114362315-114360099 bp) (Figura 5.1). Esta secuencia de 2,216 pb fue lo que se utilizó como dato de entrada para los tres programas bioinformáticos restantes.

Tabla 5.1 Análisis descriptivo de la población de estudio por diagnóstico.

Variable	Total (420)	Sin Lesión (109)	LEI (149)	CaCU (162)	Valor *p*
Edad (años)					
Mediana (5%-95%)	39 (22-66)	34 (22-66)	34 (21-66)	51 (32-76)	<**0.01***
Edad de la menarca (años)					
Mediana (5%-95%)	13 (11-15)	13 (11-15)	13 (10-15)	13 (11-16)	0.27*
Edad inicio de vida sexual (años)					
Mediana (5%-95%)	18 (14-25)	20 (15-27)	18 (14-24)	17 (13-24)	**<0.01***
Edad al primer parto (años)					
Nulípara	12.75	52.73	7.25	3.75	**<0.01****
< 19	39.38	14.55	44.20	43.75	
19 – 21	23.51	7.27	27.54	25.62	
≥22	24.36	25.45	21.01	26.88	
Tipo de VPH (%)					
Bajo Riesgo	8.49	14.58	15.00	0.00	**<0.01****
Alto Riesgo	91.51	85.42	85.00	100.00	
No. parejas sexuales (%)					
≤ 3	84.95	79.61	87.16	86.34	0.20**
4 – 9	12.86	18.45	9.46	12.42	
≥ 10	2.18	1.94	3.38	1.24	
Paridad (%)					
Nulípara	12.53	33.96	6.76	3.73	**<0.01****
1 – 3	47.47	55.66	52.70	37.27	
4 – 6	27.47	7.55	29.73	38.51	
> 6	12.53	2.83	10.81	20.50	
Antecedentes de ITS					
Ninguna	55.94	53.33	24.49	88.16	**<0.01****
Otra ITS	34.90	35.24	60.54	9.87	
VPH	9.16	11.43	14.97	1.97	
Método Anticonceptivo					
Ninguno	26.67	11.11	11.72	49.69	**<0.01****
No hormonales	38.52	51.52	35.86	32.92	
Hormonales	34.81	37.37	52.41	17.39	
Antecedentes familiares de cáncer (%)					
No	70.05	58.88	71.43	76.25	**<0.01****
Si	29.95	41.12	28.57	23.75	
Antecedentes familiares de CaCU (%)					
No	88.09	87.5	85.52	90.91	0.35**
Si	11.91	12.50	14.48	9.09	
Tabaquismo (%)					
No	72.50	75.93	66.67	74.38	0.19**
Si	27.95	24.07	33.33	25.62	

***** Valor *p* de la prueba de Kruskal-Wallis.
** Valor *p* de la prueba X^2.

Tabla 5.2. Análisis de asociación de los factores de riesgo conocidos para LEI y CaCU.

Variable	Sin lesión/LEI/CaCU (n=109/149/163)	RM[a] (IC 95%)	
		LEI	CaCU
Edad de la menarca (años)			
<12	12/30/29	1	1
≥12	95/118/131	0.50 (0.24-1.02)	0.47 (0.22-1.01)
Edad inicio de vida sexual (años)			
>21	34/16/15	1	1
18-21	43/59/63	**3.02 (1.47-6.24)**	**4.19 (1.85-9.46)**
<18	27/73/83	**5.95(2.81-12.60)***	**8.66 (3.74-20.03)***
Edad al primer parto (años)			
≥22	14/29/43	1	1
Nulípara	29/10/6	**0.12 (0.04-0.34)**	**0.17 (0.05-0.57)**
19-21	4/38/41	**3.92 (1.15-13.38)**	**4.71 (1.36-16.26)**
<19	8/61/70	**3.29 (1.23-8.81)***	**3.05 (1.13-8.23)***
Paridad			
Nulípara	36/10/6	1	1
≤3	59/78/60	**7.10 (3.13-16.11)**	**3.95 (1.48-10.54)**
>3	11/60/95	**49.01 (16.57-144.96)***	**20.87(6.63-65.68)***
No. parejas sexuales (%)			
≤3	82/129/139	1	1
>3	21/19/22	0.57 (0.28-1.13)	0.91(0.43-1.91)
Método anticonceptivo			
No hormonal	51/52/53	1	1
Hormonal	37/76/28	**2.00 (1.14-3.46)**	0.80 (0.41-1.55)
Ninguno	11/17/80	1.58 (0.67-3.71)	**4.38 (2.00-9.58)***
Antecedentes de ITS			
Ninguna	56/36/134	1	1
Otra ITS	37/89/15	**3.75 (2.11-6.65)**	**0.22 (0.11-0.47)**
VPH	12/22/3	**2.85 (1.26-6.48)***	**0.14 (0.04-0.56)***
Antecedentes familiares de cáncer			
No	63/ 105/122	1	1
Si	44/42/38	**0.57 (0.34-0.97)**	**0.44 (0.24-0.79)**

Algunos números no suman el total de la población de estudio debido a falta de información en el cuestionario.
El texto en negritas denota significancia estadística.
a. Razón de Momios ajustada por edad.
* Valor *p* de tendencia significativo (p<0.05).

Con todos los motivos predichos por cada una de las herramientas bioinformáticas utilizadas, se obtuvo en total 1,546 motivos putativos para 50 FT distintos. Siendo más específicos, al utilizar el programa SiteGA se encontró 10 motivos para cinco FT, con FTSearch se obtuvo 116 motivos para 13 FT y con P-Match 479 motivos, al hacer el análisis sin un perfil específico, y 940, al utilizar el perfil específico para las células del sistema inmune, para 32 FT distintos contando ambos abordajes. Debido a que el algoritmo que implementa P-Match es mucho más sensible que el de los otros programas, no fue sorprendente que éste fuera el que predijo el mayor número de

motivos. Asimismo, dado que el número de FT a analizar con SiteGA es limitado, pues su algoritmo requiere de una función discriminante específica para cada FT, era de esperarse que con esta herramienta se encontrara un número menor comparado con las otras dos herramientas bioinformáticas utilizadas.

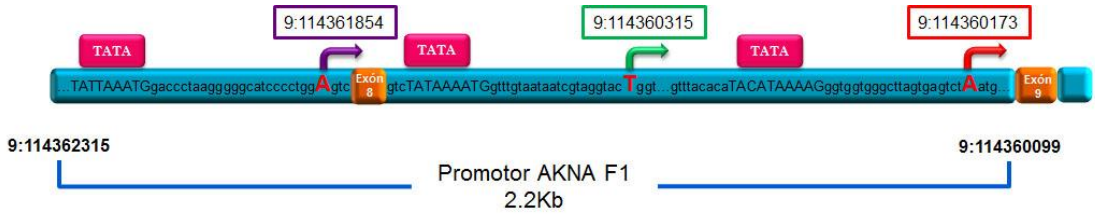

Figura 5.1 Región promotora de la isoforma F1 de AKNA a estudiar, los sitios de inicio de la transcripción (SIT) y cajas TATA predichas por la herramienta NNPP. Las letras rojas, junto con las flechas de colores, indican los tres SIT putativos propuestos por la herramienta bioinformática NNPP. Las letras en mayúsculas de color negro denotan la caja TATA atribuida a cada SIT y las cajas naranjas indican la posición de los exones 8 y 9 respectivamente. La proteína de unión a las cajas TATA (TATABP) se muestra como recuadros rosas marcados con las letras TATA.

Por otro lado, el número de motivos idénticos para un mismo FT predichos por más de un programa fue muy bajo. FTSearch encontró, dentro de las 10 cajas TATA que predijo, las mismas tres cajas TATA predichas por NNPP. Además, comparte, con los motivos predichos por P-Match, 67 motivos para cinco FT. El hecho de que estas dos últimas herramientas sean las que tuvieron duplicación en los motivos predichos no es raro, pues ambas utilizan las mismas matrices de posición ponderadas. La diferencia radica en el algoritmo utilizado y en que P-Match tiene la capacidad de definir un conjunto específico de FT presentes en la célula (perfil específico de células del sistema inmune).

Al cruzar la información generada del análisis bioinformático con la base de datos de dbSNP, se encontró que, de los 37 SNP validados presentes en la región promotora de estudio, 16 se encuentran dentro de al menos un motivo predicho por alguna de las herramientas bioinformáticas. De éstos, sólo dos no cumplieron con el último criterio de selección, el cual, consistía en una MAF mayor al 1% [89].

Debido a que al aplicar todos los criterios de selección, resultó en un número demasiado elevado de SNPs a estudiar, dada la metodología experimental propuesta, hubo la necesidad de establecer nuevos criterios de selección. Se decidió tomar en cuenta el desequilibrio de ligamiento que pudiera existir entre los 14 SNP y tomar únicamente un SNP por grupo de ligamiento. Se encontraron cuatro grupos de SNP que se han reportado en desequilibrio de ligamiento entre sí conformados por un total de 12 SNP. Se seleccionó, de cada uno de los cuatro grupos, el SNP que se encontró en el motivo predicho con el mayor puntaje, dándole mayor peso a los puntajes obtenidos por la herramienta P-Match, más los dos SNP que no se encontraron en desequilibrio de ligamiento con ningún otro SNP candidato. Esto resultó en un total de seis SNP candidatos a estudiar: rs2636898, rs10122672, rs11527453, rs10817594, rs10817595 y rs73656049 (Figura 5.2).

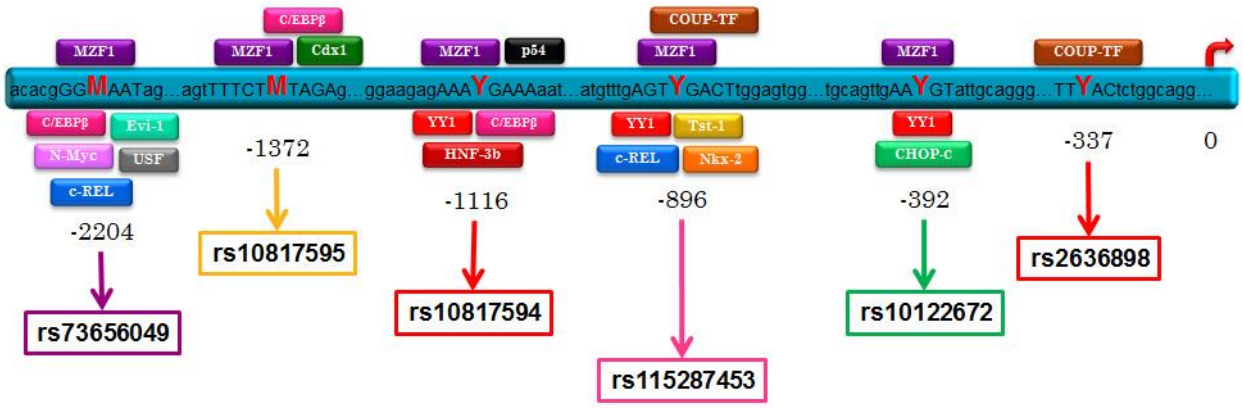

Figura 5.2. Región promotora de la isoforma F1 de AKNA con los FT predichos y SNP de estudio. La flecha roja señala el SIT, siendo la base de partida para la asignación de la posición de cada SNP en la región promotora. La letra roja indica, en código degenerado, el SNP seleccionado y su posición dentro de la secuencia del motivo predicho. Las letras en mayúsculas indican la secuencia del motivo predicho y los FT correspondientes a cada uno de los motivos predichos están representados por cuadros de colores con su nombre escrito en letras blancas. En total se tienen 14 FT diferentes para los motivos en los cuales se encuentran los seis SNP de estudio: MZF1 (morado), C/EBPβ (rosa), Evi-1 (turquesa), N.Myc (lila), USF (gris), c-Rel (azul), Cdx1 (verde obscuro), p54 (negro), YY1 (rojo), HNF-3b (rojo obscuro), COUP-TF (café), Tst-1 (amarillo), NKx-2 (naranja) y CHOP-C (verde claro). Cinco de los seis SNP seleccionados se encuentran dentro de un motivo para el FT MZF1.

5.3 Análisis de Asociación de los SNP Estudiados con CaCU.

Se encontró una asociación negativa estadísticamente significativa con CaCU para el genotipo T/T del polimorfismo -392C>T (rs10122672) (RM=0.31; IC95% 0.12-0.80), la cual, estuvo acompañada por una tendencia significativa a lo largo de los tres genotipos del polimorfismo. En otras palabras, se encontró que las mujeres portadoras del genotipo T/T del polimorfismo -392C>T tienen tres veces menos (-1/0.31) posibilidades de tener CaCU que las mujeres portadoras del genotipo del homocigoto para alelo ancestral (genotipo C/C). Esta significancia y dirección en la asociación con CaCU se mantuvo al hacer el análisis por alelos, la cual, resultó en una RM para el alelo menos frecuente (T) de 0.56 (IC95% 0.35-0.90). Además, para este mismo alelo se observó una asociación negativa estadísticamente significativa con LEI (RM=0.64, IC95% 0.42-0.99) (Tabla 5.3).

El polimorfismo -1372C>A (rs10817595) se comportó de forma muy similar al descrito anteriormente. De igual forma, se encontró una asociación negativa estadísticamente significativa con el genotipo homocigoto para el alelo menos frecuente (genotipo A/A) y CaCU (RM=0.31, IC95% 0.12-0.79); sin embargo, para éste también se encontró una asociación estadísticamente significativa con LEI (RM=0.37, IC95% 0.16-0.86). Estas asociaciones con CaCU y con LEI se mantuvieron al hacer el análisis por alelos de este polimorfismo (RM=0.57, IC95% 0.36-0.90; RM=0.60, IC95% 0.39-0.90; respectivamente) (Tabla 5.3).

Al hacer el análisis por haplotipos se observó que las asociaciones negativas descritas tanto para el polimorfismo -392C>T como para el polimorfismo -1372C>A fueron potenciadas. Se encontró que las portadoras de los alelos menos frecuentes para dichos polimorfismos de forma simultánea (haplotipo TCA) tienen 5.5 veces menos posibilidades de presentar CaCU (RM=0.18, IC95% 0.08-0.41) y tres veces menos posibilidades de presentar LEI (RM=0.33, IC95% 0.15-0.71), en comparación con las mujeres que presentan el haplotipo CCC. Para el polimorfismo -1116C>T (rs10817594) no se encontró asociación estadísticamente significativa con LEI, ni con CaCU. Tal vez, sea ésta la razón de que para la asociación del haplotipo en donde se encuentran presentes de forma simultánea los tres alelos menos frecuentes de los tres

polimorfismos de interés, no se haya alcanzado la significancia estadística con LEI ni con CaCU (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Análisis de asociación de los SNP de estudio con LEI y con CaCU.

Polimorfismo	Frecuencia (%)			LEI		CaCU	
	Sin lesión (n=109)	LEI (n=149)	CaCU (n=162)	RM[a] (IC 95%)	Valor *p*	RM[a] (IC 95%)	Valor *p*
-392C>T (rs10122672)							
C/C	26.60	36.51	28.22	1.00		1.00	
C/T	45.74	44.44	53.37	0.62 (0.30-1.31)	0.21	0.71 (0.31-1.60)	0.41
T/T	27.66	19.05	18.40	0.43 (0.18-1.01)	0.05	**0.31 (0.12-0.80)***	**0.02**
C (0.55)	49.47	58.73	54.91	1.00		1.00	
T (0.45)	50.53	41.27	45.09	**0.64 (0.42-0.99)**	**0.04**	**0.56 (0.35-0.90)**	**0.02**
HW *p*[b]	0.70						
-1116C>T (rs10817594)							
C/C	42.31	46.67	34.57	1.00		1.00	
C/T	45.19	38.52	54.32	0.74 (0.39-1.41)	0.36	1.37 (0.68-2.75)	0.38
T/T	12.50	14.81	11.11	0.88 (0.36-2.12)	0.78	0.59 (0.21-1.64)	0.31
C (0.64)	64.90	65.93	61.73	1.00		1.00	
T (0.36)	35.10	34.07	38.27	0.88 (0.58-1.35)	0.57	0.91 (0.57-1.44)	0.68
HW *p*[b]	0.82						
-1372C>A (rs10817595)							
C/C	25.00	37.96	27.61	1.00		1.00	
C/A	46.15	43.80	53.99	0.54 (0.26-1.11)	0.09	0.69 (0.31-1.55)	0.34
A/A	28.85	18.25	18.40	**0.37 (0.16-0.86)***	**0.02**	**0.31 (0.12-0.79)***	**0.01**
C (0.55)	48.08	59.85	54.91	1.00		1.00	
A (0.45)	51.92	40.15	45.09	**0.60 (0.39-0.90)**	**0.02**	**0.57 (0.36-0.90)**	**0.02**
HW *p*[b]	0.67						
Haplotipos							
CCC	48.48	61.09	55.47	1.00		1.00	
TCA	17.58	6.79	6.20	**0.33 (0.15-0.71)**	**<0.01**	**0.18 (0.08-0.41)**	**<0.01**
TTA	33.94	32.13	38.32	0.74 (0.45-1.23)	0.24	0.63 (0.36-1.10)	0.10

El texto en negritas denota significancia estadística.
a. Ajustado por edad, tipo de VPH, antecedentes de ITS y antecedentes familiares de cáncer.
b. Valor *p* de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg
* Valor *p* de tendencia significativo (*p* <0.02).

Todos lo polimorfismos de estudio se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (p>0.05) y las frecuencias alélicas de los polimorfismos -392C>T, -1116C>T y -1372C>A encontradas en la población de estudio, se asemejan a las reportadas en el proyecto de los 1000 genomas para la población con ascendencia mexicana.

5.4 Análisis de los Niveles de Expresión de AKNA.

La distribución de las URE de AKNA, normalizadas por el gen endógeno HPRT-1, fue evaluada por grupo de estudio tanto a nivel sistémico (ARNm obtenido de PBMC) como a nivel de cérvix (ARNm obtenido de exudados o biopsias de cérvix) (Figura 5.3). Las mujeres con LEI presentaron niveles de expresión mayores de AKNA en PBMC que las mujeres sin lesión VPH+ (p=0.003). En contraste, en las mujeres con CaCU los niveles de expresión de AKNA en PBMC fueron mucho menores que en las mujeres sin lesión VPH+ (p<0.001) (Figura 5.3a). Esta tendencia en la diferencia observada entre la distribución de los niveles de expresión de AKNA en los distintos grupos de estudio también se observó a nivel de cérvix, aunque no fue tan contrastante como a nivel sistémico. Sin embargo, y quizás debido a la reducción del tamaño de muestra, no se observaron diferencias significativas entre la distribución de los niveles de expresión de AKNA en cérvix observada en las mujeres sin lesión VPH+ y la observada en las mujeres con LEI, así como la observada en las mujeres con CaCU. No obstante, la diferencia observada entre los niveles de expresión de AKNA en cérvix en las mujeres con LEI y las mujeres con CaCU sí alcanzó significancia estadística (p<0.001), siendo en estas últimas donde se obtuvo los niveles menores de expresión (Figura 5.3b).

A pesar de no haber detectado diferencia en la distribución de los niveles de expresión de AKNA en cérvix entre las mujeres sin lesión VPH+ y las mujeres con CaCU, en el modelo de regresión sí se encontró una asociación estadísticamente significativa con el tercil de mayor expresión de AKNA (URE >1.6) y CaCU. Esta asociación tuvo una RM de 0.23 (IC95% 0.06-0.88, p=0.032), la cual es consistente con la dirección de la asociación encontrada a nivel sistémico (Tabla 5.5).

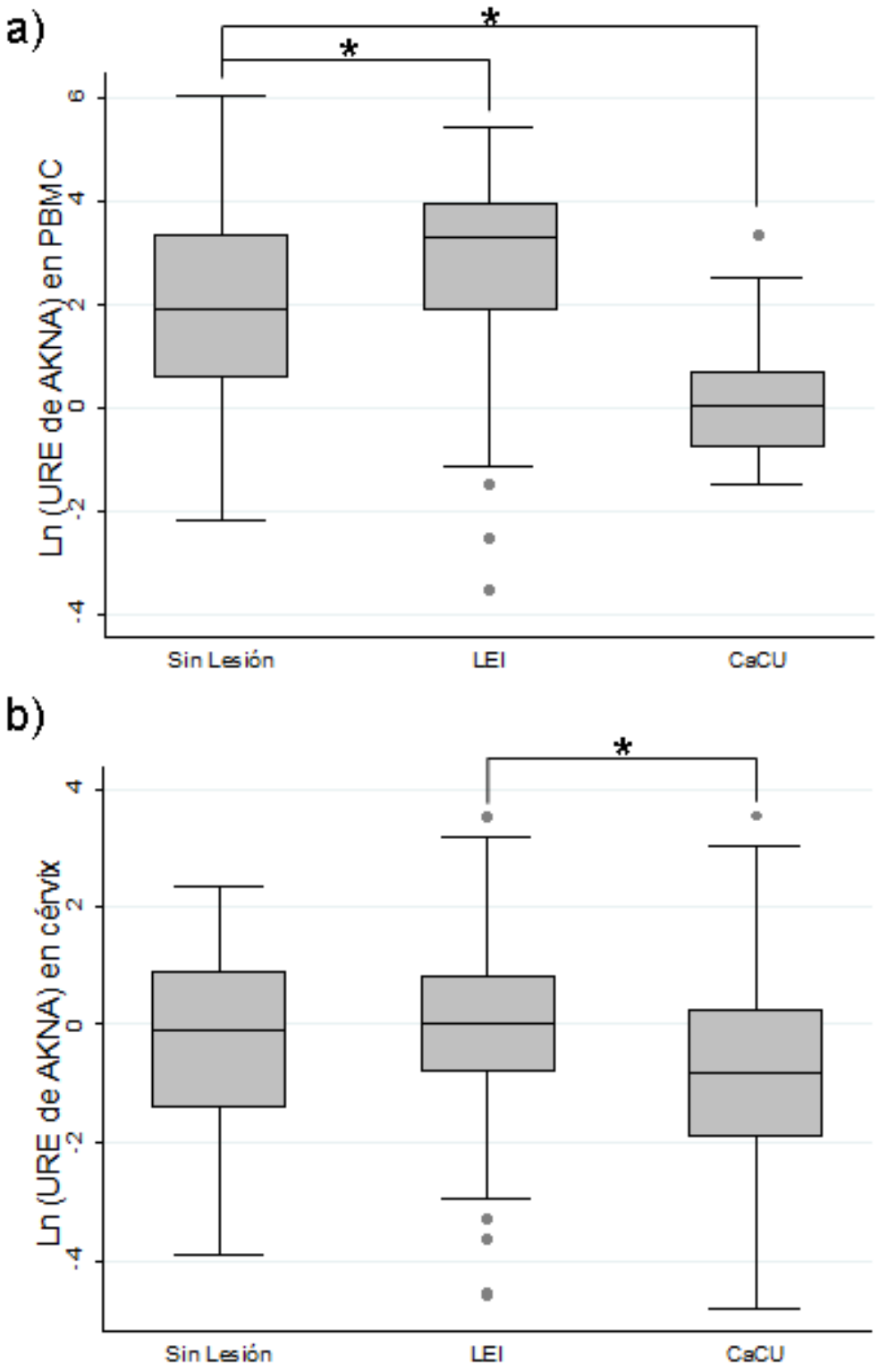

Figura 5.3. Distribución del logaritmo natural de las URE de AKNA por diagnóstico, en PBMC (a) y en cérvix (b). El asterisco representa un valor *p* estadísticamente significativo ($p<0.001$) de la prueba de Kruskal-Wallis corregida por múltiples comparaciones.

Tabla 5.5. Razones de momios ajustadas para las URE de AKNA, LEI y CaCU.

URE de AKNA	Sin lesión/LEI/CaCU (n=109/149/163)	RM[a] (IC95%)	
		LEI	CaCU
PBMC (n=412)			
<2.35	35/27/132	1.00	1.00
2.35-20.16	35/37/26	1.99 (0.87-4.56)	**0.21 (0.09-0.49)**
>20.16	34/85/1	**4.03 (1.87-8.69)***	**0.005 (0.0005-0.04)***
Cérvix (n=269)			
<0.39	11/27/49	1.00	1.00
0.39-1.61	11/57/36	1.54 (0.47-5.09)	0.33 (0.09-1.18)
>1.61	11/47/20	1.36 (0.41-4.46)	**0.23 (0.06-0.88)**

Algunos números no suman el total del tamaño de la muestra debido a una calidad de la muestra no satisfactoria.
El texto en negritas denota significancia estadística (p<0.05).
a. Ajustado por edad tipo de VPH, antecedentes de ITS y antecedentes familiares de cáncer.
* Valor de p de tendencia estadísticamente significativo (p<0.02)

5.5 Efecto de los SNP sobre los Niveles de Expresión de AKNA en CaCU.

Para evaluar si los SNP de interés tenían relación con los niveles de expresión de AKNA observados en las pacientes con CaCU, se comparó la distribución de las URE de AKNA en PBMC entre los genotipos de los tres polimorfismos de interés (Figura 5.4). Las pacientes con CaCU portadoras del genotipo homocigoto para el alelo T y para el alelo A del polimorfismo -392C>T (Figura5.4a) y del polimorfismo -1372C>A (Figura 5.4c), respectivamente, tuvieron mayores niveles de expresión de AKNA que las portadoras del genotipo homocigoto para el alelo ancestral correspondiente a cada polimorfismo. Ambas diferencias en la distribución de las URE de AKNA fueron estadísticamente significativas, con un valor de p de 0.006 para ambos polimorfismos. Con los genotipos del polimorfismos -1116C>T también se encontró diferencia estadísticamente significativa (p=0.01), en la distribución de los niveles de expresión de AKNA; sin embargo, ésta se observó entre las pacientes heterocigotas y las homocigotas para el alelo ancestral C/C (Figura 5.4b).

La diferencia promedio en las URE de AKNA en PBMC estimada entre los alelos tanto del polimorfismo -392C>T como del -1372C>A fue de 0.93 (0.25-1.62) URE en las pacientes con CaCU. Asimismo, para el polimorfismo -1116C>T la diferencia promedio entre alelos fue de 0.92 URE (0.21-1.63) en las pacientes con CaCU (Tabla 5.4). Todas estas diferencias promedio estimadas (coeficientes β) tuvieron una tendencia estadísticamente significativa, al ser evaluada a través de los tres genotipos de cada

polimorfismo de interés. La diferencia promedio estimada llego a ser hasta de una URE de AKNA (β=1.14; IC95% 0.30-1.99) más en las pacientes con CaCU portadoras de los tres alelos menores de los polimorfismos de interés de forma simultánea, haplotipo TTA, que las portadoras de los tres alelos ancestrales, haplotipo CCC. Esta diferencia también mostró una tendencia significativa a través de los tres haplotipos (Tabla 5.4).

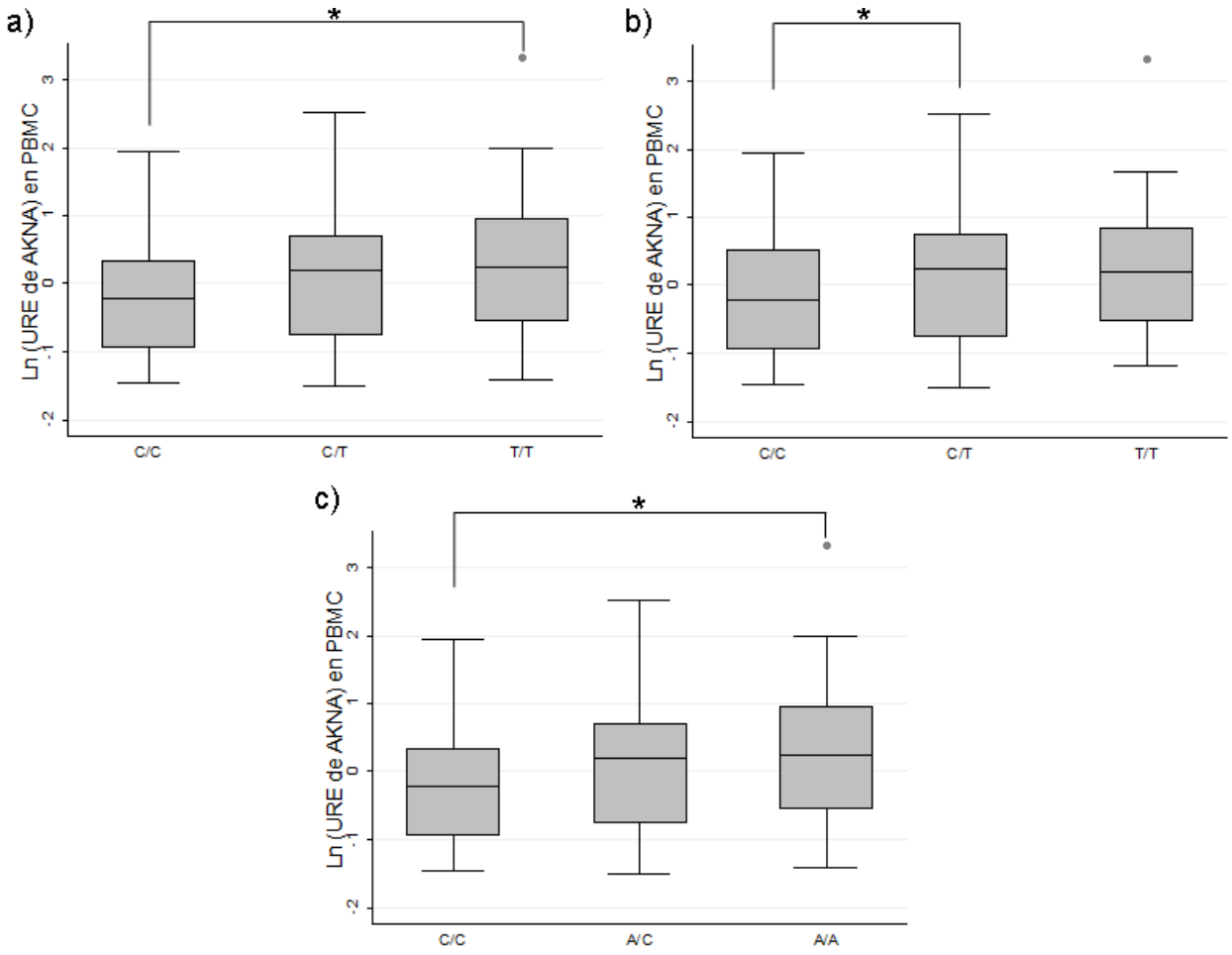

Figura 5.4. Distribución del logaritmo natural de las URE de AKNA en PBMC de pacientes con CaCU estratificada por genotipos de los polimorfismos -392C>T (a), -1116C>T (b) y -1372C>A (c). El asterisco representa un valor *p* estadísticamente significativo (*p*<0.01) de la prueba de Kruskal-Wallis corregida por múltiples comparaciones.

Para explorar más a fondo el posible efecto del polimorfismo -1372C>A sobre la regulación transcripcional de AKNA, se llevó a cabo un análisis de desbalance alélico en las mujeres heterocigotas para dicho polimorfismo. Sólo fue posible evaluarlo en

este polimorfismo dado que, como se mencionó anteriormente en el capítulo IV, sólo para el polimorfismo -1372C>A se encontró el SNP sinónimo en desequilibrio de ligamiento necesario para llevar a cabo los ensayos de cuantificación alelo específica.

Tabla 5.6. Diferencia promedio estimada de las URE de AKNA en PBMC entre los alelos de los polimorfismos de interés, estratificada por diagnóstico.

Alelos	coeficiente β[a] (IC95%)			
	Total	Sin lesión	LEI	CaCU
-392C>T (rs10122672)				
C	-	-	-	-
T	1.41 (-4.67-7.49)	2.41 (-19.20-24.03)	-3.53 (-13.17- 6.11)	**0.93 (0.25-1.62)***
-1116C>T (rs10817594)				
C	-	-	-	-
T	3.93 (-2.45-10.32)	**24.02 (2.88-45.16)**	-6.83 (-16.56-2.90)	**0.92 (0.21-1.63)***
-1372C>A (rs10817595)				
C	-	-	-	-
A	2.03 (-3.93-7.99)	5.52 (-15.13-26.17)	-2.62 (-11.85-6.62)	**0.93 (0.25-1.62)***
Haplotipos				
CCC	-	-	-	-
TCA	-3.02 (-15.17-9.14)	-21.57 (53.25-10.11)	2.01 (-19.30-23.32)	0.78 (-0.92-2.48)
TTA	3.08 (-4.40-10.56)	13.96 (-12.20-40.11)	-6.38 (-17.89-5.13)	**1.14 (0.30-1.99)****

El texto en negritas denota significancia estadística (p<0.05).
a. Ajustado por edad, tipo de VPH, antecedentes de ITS y antecedentes familiares de cáncer.
* Valor de p de tendencia estadísticamente significativo (p<0.02), evaluado por genotipo
**Valor p de tendencia estadísticamente significativo (p<0.02), evaluado por haplotipos

Se encontró una diferencia clara entre el número de transcritos provenientes de cada uno de los alelos de estudio. Independientemente del diagnóstico, el número de transcritos provenientes del alelo menor (alelo A) fue mayor que el número de transcritos provenientes del alelo ancestral (alelo C) (Figura 5.5a). En promedio, el número de transcritos provenientes del alelo A fue casi tres veces más que el número de transcritos provenientes del alelo C ($\frac{alelo\ A}{alelo\ C} = 2^{\ log2(\frac{alelo\ A}{alelo\ C})} = 2^{1.58} = 2.99$). El desbalance alélico más alto en promedio fue observado en las pacientes con LEI ($\frac{alelo\ A}{alelo\ C} = 3$), seguido por el desbalance alélico observado en las mujeres sin lesión VPH+ ($\frac{alelo\ A}{alelo\ C} = 2.99$) y por último el encontrado en las mujeres con CaCU ($\frac{alelo\ A}{alelo\ C} = 2.95$) (Figura 5.5b).

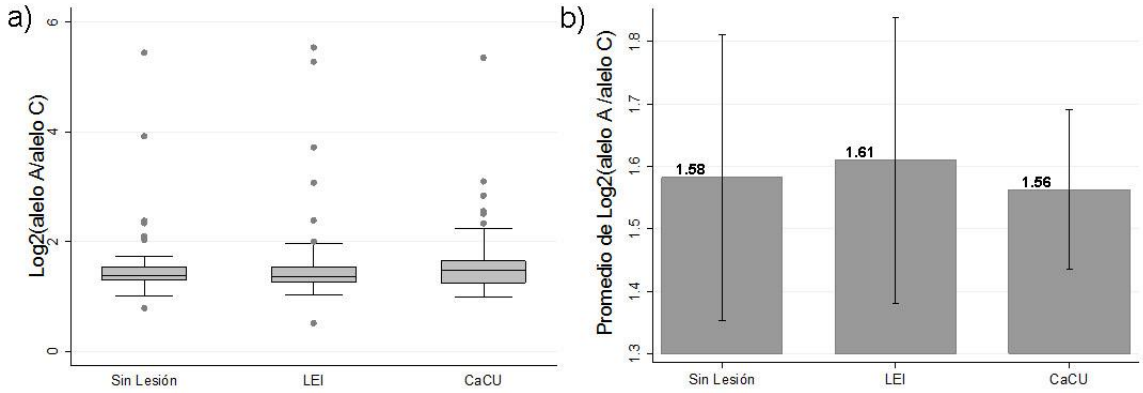

Figura 5.5. Desbalance alélico en la expresión de AKNA en heterocigotas para el polimorfismo -1372C>A. a) Distribución del logaritmo en base dos de la razón del número de transcritos provenientes de cada alelo del polimorfismos -1372C>A, estratificada por diagnóstico. No hubo diferencias significativas entre la distribución del desbalance alélico observada en cada grupo de estudio (valor *p* de la prueba de Kruskal-Wallis de 0.44). b) Promedio del logaritmo en base dos de la razón del número de transcritos provenientes de cada alelo del polimorfismo -1372C>A por grupo de estudio. Las barras de error representan la desviación estándar observada en cada grupo.

Capítulo VI

6. Discusión.

En términos generales, se pueden enumerar tres hallazgos principales en este estudio. En primera instancia, se identificaron dos polimorfismos no codificantes asociados de forma negativa con CaCU y con LEI; en segundo, la identificación de la existencia de una asociación negativa de magnitud alta entre los mayores niveles de expresión de AKNA en PBMC y a nivel de cérvix con CaCU; y por último, que estos dos eventos no son independientes dado el desbalance alélico en la expresión de AKNA observado. A continuación se discutirán todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio de forma particular y se resalta su aportación al conocimiento actual del CaCU y del papel de AKNA en esta enfermedad, sus limitaciones y fortalezas, así como su congruencia a partir de los estudios previamente reportados.

6.1 Factores de Riesgo ya Conocidos para Lesión Escamosa Intraepitelial y Cáncer Cervicouterino en Nuestra Población de Estudio.

El haber encontrado asociación estadísticamente significativa con la mayoría de los factores ya establecidos como de riesgo para CaCU [19], evidencia que nuestra población de estudio se comporta de forma muy semejante a la población general. Esto le da fortaleza metodológica al presente estudio que se traduce a su vez en validez externa para los resultados obtenidos. El que la variable de número de parejas sexuales no haya tenido una asociación significativa en nuestra población de estudio, a pesar de ser reconocida como un factor de riesgo para CaCU, no es sorprendente; este factor está relacionado directamente con un riesgo mayor de infección por VPH, de hecho, se ha reportado que éste es el principal factor de riesgo para una infección incidente por VPH [90]. Al tener únicamente mujeres VPH+ como población de estudio, impide ver la asociación con un mayor riesgo de infección, puesto que la probabilidad de infección por VPH es de 1.00 sin importar su diagnóstico (todas las mujeres de la

población de estudio ya han sido infectadas). Por ende, este factor se comporta de forma homogénea en los tres grupos de estudio y no se encontró una asociación estadísticamente significativa con LEI ni con CaCU.

Por otro lado, el hecho de haber encontrado asociación negativa entre no haber padecido con anterioridad alguna ITS, diferente a la infección por VPH, y CaCU podría causar controversia, ya que, al ver que esta variable sí se comporta como factor de riesgo en las mujeres con LEI, nos sugiere que hay un sesgo de medición diferencial en esta variable. No obstante, es poco probable que esta variable este confundiendo los resultados de este estudio debido a que todos los modelos de asociación fueron ajustados por ésta.

El que se haya encontrado una asociación negativa con la variable de antecedentes heredofamiliares de algún tipo de cáncer y CaCU, así como LEI sugiere que, de existir un sesgo de medición, éste fue no diferencial. Por otro lado, esta asociación pierde significancia al evaluar los antecedentes familiares de CaCU de forma específica. Este comportamiento en la variable no refleja el que las mujeres con familiares que hayan padecido CaCU buscaran de forma más consiente la atención sanitaria específicamente en torno a esta enfermedad y por ende se detectaran con mayor frecuencia, que las mujeres que no habían tenido antecedentes familiares de este tipo de cáncer. Aunado a esto, de existir algún factor genético que sea el responsable de la asociación negativa observada con esta variable, es poco probable que esté enmascarando la asociación observada específicamente con los polimorfismos de AKNA. Este razonamiento se basa en que todos los modelos de asociación fueron ajustados por antecedentes heredofamiliares de cáncer, e indirectamente por los posibles factores genéticos que pudieran estar reflejando la variable.

6.2 SNP No Codificantes en AKNA como Factores de Susceptibilidad a Cáncer Cervicouterino.

A pesar de que el papel preciso de AKNA en la carcinogénesis no ha sido reportado hasta la fecha, la evidencia que muestra el ligamiento de su locus con CaCU y el reporte previo de un SNP codificante en su dominio AT-Hook amino terminal que aumenta el riesgo de presentar dicha neoplasia, perfilan a AKNA como un factor genético de susceptibilidad para CaCU [12,13]. Aunado a esto, la capacidad de AKNA de regular positivamente moléculas coestimuladoras de la respuesta inmune y el papel que se le ha propuesto como regulador negativo de procesos inflamatorios, vinculan la función de AKNA con dos características distintivas del surgimiento y habilitación del cáncer: la evasión de la destrucción de las células tumorales por parte del sistema inmune y los procesos de inflamación crónicos que promueven el crecimiento de las células tumorales [91]. En apoyo a lo anterior, se encontraron dos SNP no codificantes en la región promotora de la isoforma F1 de AKNA, -392C>T (rs10122672) y -1372C>A (rs10817595), asociados negativamente con CaCU, así como con LEI. Cabe recalcar, que los tres polimorfismos de interés estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg y que las frecuencias alélicas observadas en nuestra población de estudio son semejantes a las reportadas para cada polimorfismo en población con ascendencia mexicana por el proyecto de los 1000 genomas [92]. Esto nos permite decir que no hubo sesgo de selección que favoreciera las asociaciones encontradas y le da validez externa a dichas asociaciones. Asimismo, es poco probable que las asociaciones encontradas en este estudio se encuentren enmascaradas por la presencia del SNP codificante de AKNA reportado previamente (rs3748178), dado que, éste no se encuentra en desequilibrio de ligamiento con ninguno de los tres polimorfismos de interés, según lo reportado [92]. Con este estudio se ha generado evidencia adicional, que soporta la noción de AKNA como un factor genético de susceptibilidad al CaCU.

Por otro lado, se puede observar en los resultados obtenidos para los SNP -392C>T y -1372C>A, que ambos se encuentran en desequilibrio de ligamiento entre sí (D´ de 0.99 con un valor de $p<0.01$). En el momento de la selección de los SNP a estudiar (Noviembre de 2012), la información concerniente al desequilibrio de ligamiento de los

SNP candidatos no contemplaba lo anterior, pero al realizar la búsqueda con los datos actuales del proyecto de los 1000 genomas (información actualizada en Octubre de 2013), se comprobó que este desequilibrio de ligamiento sí esta reportado para otras poblaciones de ascendencia mexicana [92]. De manera semejante, el polimorfismo -1116C>T (rs10817594) se encontró en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo -1372C>A pero con una magnitud menor (D´ de 0.80 con $p<0.01$). No obstante, para este polimorfismo no hay reportes previos de desequilibrio de ligamiento con ninguno de los otros dos polimorfismos de interés.

Dado todo lo anterior, es difícil determinar qué polimorfismo, de entre el -392C>T y el -1372C>A es funcional, teniendo en cuenta únicamente los resultados del análisis de asociación. Aunque si es posible observar que, de ambos polimorfismos, el -1372C>A es el que presenta mayor consistencia a lo largo de los análisis de asociación realizados. Además de encontrarse asociado con CaCU, éste se encontró asociado con LEI. Asimismo, en este polimorfismo se observó tendencia significativa a lo largo de los tres genotipos en los dos grupos de pacientes evaluados, en comparación con el -392C>T, cuyo genotipo homocigoto para el alelo menos frecuente se encontró asociado únicamente con CaCU, siendo en el único grupo de estudio, donde se observó una tendencia significativa para los genotipos de dicho SNP. Conforme se avance en la discusión, se verá que la evidencia obtenida en este estudio sugiere que el polimorfismo -1372C>A es el que tiene mayor probabilidad de ser funcional (polimorfismo de acción en *cis*) y ser considerado como un locus de rasgos cuantitativos de expresión o eQTL, por sus siglas en inglés (variantes que explican el fenotipo de expresión génica) [93].

6.3 Niveles de Expresión de AKNA a Nivel Sistémico y en Cérvix en Mujeres con Lesión Escamosa Intraepitelial y Cáncer Cervicouterino.

Con respecto a los niveles de expresión de AKNA, el único reporte previo de su asociación indirecta *in vivo* con una enfermedad ha sido con el síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada. En un estudio de casos y controles Mao *et al*., encontraron niveles significativamente menores de la proteína AKNA en linfocitos T $CD4^+$ obtenidos de pacientes en comparación con las obtenidas de controles sanos [63]. Este síndrome se caracteriza por una inflamación crónica de los tejidos altamente pigmentados y la disminución en la concentración de AKNA vista en estos pacientes, es consistente con la falta de regulación negativa de la intensidad de la respuesta inflamatoria observada en los ratones KO para AKNA. No obstante, las moléculas y mecanismos involucrados en la regulación transcripcional de AKNA, así como la evaluación de sus niveles de expresión en cualquier tipo de neoplasia no han sido evaluados. Este estudio presenta la primera evidencia del comportamiento de los niveles de expresión de AKNA en pacientes con CaCU a nivel sistémico, así como en el microambiente tumoral.

En este estudio se observaron niveles de expresión menores de AKNA en PBMC, así como en biopsias tumorales de pacientes con CaCU, que en las PBMC y en exudados de cérvix de pacientes sin lesión VPH+. La interacción entre CD40, presente en las células dendríticas, y su ligando, presente en los linfocitos T $CD4^+$, probablemente logre potenciar la activación y coestimulación de los linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$ y con ello generar una respuesta inmune eficiente *in vivo*. Por consecuencia, dicha interacción podría tener un papel crucial en la generación de una respuesta inmune capaz de eliminar la infección viral o la lesión premaligna [94]. Además, en el caso particular del CaCU se ha mostrado que a pesar de la presencia de linfocitos T $CD8^+$ infiltrantes, éstos tiene una actividad disminuida [49]. El tener bajos niveles de expresión de AKNA pudiera comprometer la cantidad de CD40 y de CD40L (u otras moléculas coestimuladoras), presentes en la superficie de células dendríticas y linfocitos T $CD4^+$, lo que implica una inmunidad deficiente en las pacientes con CaCU.

De manera contraria, existe evidencia que sugiere que una inflamación crónica, con infiltrados inflamatorios prolongados de macrófagos y neutrófilos, está asociada con

persistencia del VPH y un mayor riesgo de desarrollar LEI de alto grado [95, 96, 97]. Esto es congruente con los fenotipos observados en los ratones KO para AKNA, y constituye otro mecanismo posible que explica los bajos niveles de expresión de AKNA, vistos en las pacientes con CaCU en comparación con las pacientes sin lesión VPH+. El tener niveles bajos de expresión de AKNA, podría potenciar la expresión de citocinas proinflamatorias y moléculas importantes para la activación de neutrófilos, lo cual, podría promover una inflamación crónica que favoreciera la persistencia del VPH; lo que resulta en un mayor riesgo de CaCU. Aunado a esto, el aumento de células inflamatorias infiltrantes (neutrófilos) en el microambiente tumoral, podría inducir liberación mayor de especies reactivas de oxigeno (ROS), la cuales se sabe, pueden ser químicos mutagénicos, y acelerar la transición de las células tumorales a estados de mayor malignidad [91].

Por otro lado, se observaron niveles de expresión de AKNA altos en PBMC de pacientes con LEI, comparados con los observados en pacientes sin lesión VPH+. Esto puede ser explicado por el hecho de que en pacientes con LEI, la respuesta inmune se encuentra totalmente activa, tratando de lograr la eliminación de la lesión provocada por el VPH. Después de todo, se tiene bien documentado que la mayoría de las lesiones provocadas por la infección de VPH, eventualmente regresan a epitelio normal y, aunque no todos los mecanismos de la respuesta inmune relacionados con este fenómeno se entienden por completo, existe evidencia de elementos clave de la respuesta inmune celular (como una mayor tasa de linfocitos T CD4:CD8, una respuesta Th1 predominante, la generación de respuesta inmune celular a antígenos virales tempranos, etc.), que favorecen la regresión citológica de las lesiones en pacientes VPH+ [49, 95, 98-102]. En contraste, en CaCU esta respuesta ha sido contrarrestada por la acción de las células tumorales. Reportes previos han mostrado que las células tumorales son capaces de secretar citocinas antinflamatorias (IL-10 y TGF-β, IL-4), e inhibir la respuesta inmune [33,49].

Incluso, es altamente probable que un gran porcentaje de las mujeres con LEI, siga con infección activa por VPH, lo que significa que el genoma viral aún no se integra al genoma de la célula hospedera; contrario a lo que ocurre en CaCU, donde se infiere que el genoma viral ya se encuentra integrado. La sobre expresión de AKNA podría

deberse para contrarrestar no sólo la lesión sino también la infección activa de VPH. Esto último también explica los niveles de expresión de AKNA altos, vistos en las PBMC de pacientes sin lesión VPH+. Se ha visto que 72 hrs. después de la infección con virus de hepatitis C (VHC) en células Huh 7.5, AKNA se encuentra sobre expresado. Esto apoya la idea de que AKNA es diferencialmente expresado durante infecciones virales activas [64].

A pesar de que con la evidencia generada en este estudio no es posible identificar cuáles son las células que expresan AKNA en los raspados de cérvix y en las biopsias tumorales, en este estudio se tiene la hipótesis de que, dado los niveles bajos de URE de AKNA vistos a nivel de cérvix, comparados con los de PBMC, el número de células que expresan AKNA presentes en los raspados y biopsias de cérvix es menor. Este razonamiento se basa en el hecho de que la expresión de AKNA ha sido reportada únicamente en órganos linfoides secundarios y células del sistema inmune. Esto permite hacer la inferencia de que son los linfocitos infiltrantes y/o células dendríticas presentes en el cérvix y microambiente tumoral, los responsables de los niveles de expresión de AKNA vistos *in situ*. Esfuerzos futuros deben ser dirigidos en la identificación de las células que expresan AKNA en cérvix, para así clarificar el posible papel que tiene este gen en la patología del CaCU, ya que es altamente probable que las funciones atribuidas a AKNA, sean específicas al tipo celular y dependientes del microambiente en el que las células se encuentren expuestas.

6.4 Desbalance Alélico en la Expresión de AKNA.

Uno de los resultados más interesantes de este estudio fue el encontrar que las mujeres portadoras de dos copias del alelo menor para cada uno de los tres SNP de interés, tuvieron niveles de expresión de AKNA mayores con respecto a las portadoras de dos copias del alelo ancestral correspondiente, lo que sugiere que la presencia de estos polimorfismos favorece una expresión mayor de AKNA. El impacto biológico de tener una URE de AKNA más, dado el haplotipo que porta la paciente con CaCU, no se puede inferir fácilmente. En primera instancia el tener una mayor expresión de AKNA, resultaría en una mayor producción de CD40 y CD40L o bien en un aumento en la regulación negativa de procesos inflamatorios, es decir su inhibición, o incluso en ambas. Ambos procesos son intuitivamente opuestos, y es difícil saber, sin un contexto espacio-temporal, lo que resultaría al aumentar de forma sistémica, la expresión de AKNA. Por otra parte, se ha visto que el papel que tienen CD40 y su ligando en el cáncer, es sumamente complejo y dependiente del microambiente y de la célula que las expresa, por lo que inferir el impacto del aumento de dichas moléculas coestimuladoras en la carcinogénesis no es sencillo [103-105]. En tercer y último lugar, en CaCU el papel de la inflamación en la persistencia viral y en el riesgo de desarrollar esta neoplasia, es controversial [95-97].

La evaluación del desbalance alélico, nos permite saber si existe una diferencia en el número de transcritos provenientes de cada alelo de un polimorfismo en particular; en una persona heterocigota para dicho polimorfismo, se espera que el número de transcritos proveniente de cada alelo sea igual ($2^{\,log2(\frac{alelo\,A}{alelo\,C})} = 2^0 = 1$), es decir, que estén en equilibrio. La existencia de un desbalance alélico apunta a que el polimorfismo responsable es funcional y afecta la regulación transcripcional en *cis* del gen en cuestión, lo que corrobora la principal característica de un eQTL.

Se han reportado un gran número de SNP en regiones promotoras asociados a CaCU; sin embargo, pocos son los que han sido evaluados mediante un abordaje de desbalance alélico, para corroborar si son polimorfismos funcionales de acción en *cis*. Recientemente Chen y Gyllensten evaluaron un *cis*-eQTL del gen HLADRB1, en

pacientes con CaCU y sus hallazgos dan una posible explicación a los patrones tan variables de asociación de los haplotipos B*07 y DRB1*1501-DQB1*0602 y de los patrones de asociación tan consistentes del haplotipo DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603 en CaCU [71]. No obstante, no existe algún otro estudio que, mediante la evaluación del desbalance alélico, señale la existencia de un posible polimorfismo de acción en *cis*. Así, es relevante identificar aquellas variantes no codificantes, que tienen una función sobre los patrones de expresión espacio temporales anormales, vistos en las pacientes con CaCU. Esto dará evidencia de moléculas o genes no asociados con anterioridad y un entendimiento más profundo del papel que tienen los factores genéticos ya conocidos en la carcinogénesis.

Los resultados de este estudio muestran que la expresión de AKNA es favorecida por la presencia del alelo A del polimorfismo -1372C>A. Los motivos predichos en el análisis bioinformático, en la posición de dicho polimorfismo corresponden al FT dedo de zinc mieloide 1 (MZF1), proteína de unión a CCAT/ enhancer beta (C/EBPB) y caudal type homeobox 1 (Cdx1). Este último es un FT específico de intestino, por lo que es muy poco probable que éste sea el responsable de la regulación transcripcional de AKNA en PBMC. Ambos FT restantes, presentes en células del sistema inmune, se han visto asociados con diferentes tipos de cáncer [106-109]; sin embargo, sólo del MZF1 existe evidencia de su participación en CaCU, al reducir la capacidad invasiva de la línea celular SiHa [110]. Con la evidencia generada en este estudio, no es posible concluir cuál de los FT participa en la regulación de la expresión de AKNA, y la manera en que este lo está haciendo (como represor o activador de la transcripción).

6.5 Limitaciones del Estudio.

Debido a que este estudio parte de un banco de muestras biológicas construido previamente, la recolección de datos se realizaron con objetivos externos a este estudio. Lo que implicó que no se pudiera ajustar desde el diseño, variables potencialmente confusoras y en controlar posibles sesgos de medición diferenciales. Esto se ve reflejado en el comportamiento inesperado de algunas covariables en la población de estudio, como se discutió en el apartado 6.1. No obstante, esta limitante se vio superada al llevar a cabo el ajuste en los análisis de asociación realizados, lo que evitó, que repercutiera en la validez interna y externa de los resultados obtenidos.

Por otro lado, dada la naturaleza del diseño transversal de este estudio, no se puede asegurar que todas las mujeres tengan el mismo tiempo de evolución o de infección. Esto nos impide asegurar que las diferencias encontradas en los niveles de expresión de AKNA son causa o efecto del diagnóstico de las mujeres en cada grupo de estudio. Sin embargo, la posibilidad de que los niveles de expresión de AKNA son parcialmente debidos a la presencia del polimorfismo, le da indirectamente temporalidad a la asociación observada entre los niveles de expresión de AKNA y CaCU.

Por último, vale la pena considerar que, dada la proximidad física entre los tres polimorfismos de estudio y el desequilibrio de ligamiento visto entre estos, el SNP sinónimo seleccionado para los ensayos de desbalance alélico también se encontró en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos -392C>T y -1116C>T. Por lo anterior, no se puede precisar cuál de los tres polimorfismos constituye el verdadero *cis*-eQTL. No obstante, se considera que, dado los resultados consistentemente encontrados a lo largo de todo el estudio para el SNP -1372C>A (sección 6.2), y que al correr de nuevo el análisis bioinformático pero cambiando la secuencia inicial por el alelo menor de dicho SNP, no se encuentra el motivo inicialmente predicho para MZF1, y es altamente probable que este polimorfismo sea el responsable del desbalance alélico observado.

CAPÍTULO VII

7.1 Conclusiones.

Las asociaciones significativas encontradas con CaCU, así como con LEI, de los SNP reguladores de AKNA y de sus niveles de expresión en PBMC, sugieren que la regulación transcripcional de este gen tiene un papel en la historia natural de esta enfermedad. Pero, su efecto es dependiente del estadio. Asimismo, se encontró un desbalance alélico en la expresión de AKNA entre ambos alelos del SNP -1372 C>A (rs10817595), el cual, muestra que la expresión de AKNA es favorecida por la presencia del alelo menos frecuente de este polimorfismo. **Esto lleva a concluir que la asociación observada entre CaCU y el polimorfismo -1372 C>A (rs10817595), así como con los niveles altos de expresión de AKNA, son debidas potencialmente al efecto que ejerce el alelo A sobre la regulación transcripcional de AKNA.**

Este estudio sienta las bases para la identificación de los mecanismos responsables de los niveles de expresión de AKNA vistos en las pacientes con LEI y CaCU, lo que ayudará a la identificación de posibles nuevos blancos terapéuticos y al entendimiento de la función de AKNA y su papel en la oncogénesis.

7.2 Perspectivas.

De este trabajo han surgido varias perspectivas factibles de abordar en un futuro cercano, las cuales, a continuación se enumeran:

1. Realizar ensayos de funcionalidad *in vitro* de los SNP asociados para poder constatar cual es el verdadero *cis*-eQTL.
2. Correlacionar los niveles relativos de expresión de AKNA con marcadores específicos e inespecíficos de inflamación para poder corroborar *in vivo* que el fenotipo encontrado en ratones se asemeja a lo esperado en humanos.
3. Evaluar qué células son las que expresan el gen AKNA en cérvix y en el microambiente tumoral.
4. Evaluar los niveles de expresión de AKNA en sujetos sanos a nivel sistémico así como en cérvix de mujeres sanas.

PUBLICACIONES.

1. Martínez-Nava GA, Martínez-Barnetche J, Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, Burguete-García AI. Selección de SNP reguladores en estudios de gen candidato para estudios de enfermedades de importancia en Salud Pública: un abordaje bioinformático. Salud pública de México. (Enviado el 10 de febrero de 2014).

2. Martínez-Nava GA, Torres-Poveda K, Lagunas-Martínez A, Bahena-Román M, Zurita-Díaz MA, Ortíz-Flores E, García-Carrancá A, Madrid-Marina V and Burguete-García AI. Cervical cancer associated *akna* promoter polymorphism affects *akna* expression levels. Genes and Immunity (Enviado el 28 de Junio de 2014)

REFERENCIAS.

1. CDC. Controlling Cancer in Developing Countries. Prevention and treatment strategies merit further study. Disease Control Priorities Project. 2007.
2. Lewis MJ. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). 2004:40.
3. Almonte M, Murillo R, Sánchez GI, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, Lazcano-Ponce E, Herrero R. Nuevos Paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina. Salud Publica Mex 2010. 52(6): 544-559.
4. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and related cancers in Mexico. Summary Report 2010. Disponible en: www. who. int/ hpvcentre. Consultado el 15 de septiembre de 2011.
5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Default.aspx, accesado el 25 de noviembre de 2011.
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Mujeres y Hombres en México 2009. 13ª ed. México.
7. Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS. Disponible en: http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html. Consultado el 1° de abril de 2012
8. Sánchez-Barriga JJ. Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. Gac Med Méx 2012;148:42-51
9. Lazcano-Ponce E, Palacio-Mejía LS, Allen-Leigh B, Yunes-Diaz E, Alonso P, Schiavon R, Hernandez-Avila M. Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of Papanicolaou coverage, birthrate, and the importance of

diagnostic validity of cytology. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008; 17:2808e2817.

10. Magnusson PK, Lichtenstein P, Gyllensten UB. Heritability of cervical tumours. Int. J. Cancer 2000, 88 (5): 698–701.
11. Zhang X, Zhang L, Tian C, Yang L, Wang Z. Genetic variants and risk of cervical cancer: epidemiological evidence, meta-analysis and research review. BJOG 2014; 121(6):664-73.
12. Engelmark MT, Ivansson EL, Magnusson JJ, Gustavsson IM, Beskow AH, Magnusson PK, Gyllensten UB. Identification of susceptibility loci for cervical carcinoma by genome scan of affected sib-pairs. Hum Mol Genet 2006; 15; 15(22):3351-60.
13. Perales G, Burguete-García AI, Dimas J, Bahena-Román M, Bermúdez-Morales VH, Moreno J, Madrid-Marina V. A polymorphism in the AT-hook motif of the transcriptional regulator AKNA is a risk factor for cervical cancer. Biomarkers 2010; 15(5):470-4.
14. Consejo de Salubridad General, Gobierno Federal. Prevención y Detección Oportuna del Cáncer Cérvico Uterino en el Primer Nivel de Atención. México: Secretaría de Salud. 2008.
15. Ciaran B. J. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer 2007; 7(1):11-22.
16. Smith JH. Bethesda 2001. Cytopathology 2002; 13(1):4-10
17. Gutiérrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, Madrid-Marina V. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. Salud Publica Méx 2009; 5(3).
18. Reynales-Shigematsu LM, Rodriguez ER, Lazcano-Ponce E. Cost-Effectiveness analysis of a quadrivalent Human Papilloma Virus vaccine in Mexico. Arch Med Res 2009; 40:503-513
19. Roberto Tapia Conyer. El Manual de Salud Pública, Editorial: Sistemas Inter Editores. segunda edición, 2006. Pg. 690
20. Baldwin P, Laskey R, Coleman N. Translational approaches to improving cervical screening. Nat Rev Cancer 2003; 3; 217- 226

21. Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B y Hernández-Ávila M. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. Salud Publica Méx 2009; 15(2):S208-S119.
22. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Patol 1999; 189:12-19.
23. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002; 55:244-265.
24. Torres-Poveda KJ, Burguete A, Bermúdez VH, Madrid-Marina V. La infección por el virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino: una perspectiva de salud pública. Rev Invest Clin 2008; 60 (5): 414-420.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (24 oct 2008). Infección genital por VPH - CDC Fact Sheet en español. Consultado el 12 de febrero del 2012.
26. Acheson NH. Fundamentals of Molecular Virology. Capitulo.11 Papillomaviruses. Editorial John Wiley & Sons Inc. 1a edición.
27. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer MulticenterCervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348:518-527.
28. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. Vaccine 2006; S1/16–S1/22.
29. Kanodia S, Fahey LM y Kast WM. Mechanisms used by Human Papillomaviruses to escape the host immune response. Curr Cancer Drug Targets 2007; 7:79-89.
30. Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, Verheijen RH, Meijer CJ. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. Lancet 2001; 358(24): 1782-1783.

31. Coleman N, Birley HDL, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, Taylor-Robinson D, Stanley MA. Immunological events in regressing genital warts. Am J Clin Pathol 1994; 102:768–74.
32. Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, von Blomberg ME, Bontkes HJ. Bontkes HJ. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. Int J Cancer 2007 15; 121(8): 1749-55.
33. Alcocer-Gonzalez JM, Berumen J, Tamez-Guerra R, Bermudez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P, Madrid-Marina V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cancer cells. Viral Immunology 2006, 19(3):481-91.
34. 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. Immunology 2001; 167:2972-2978.
35. de Gruijl TD, Bontkes HJ, Verheijen RHM, Wallboomers JMM, Scheper RJ Differences in cytokine mRNA profiles between pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. Eur J Cancer 1999; 35: 490-497.
36. Scott ME, Ma Y, Kuzmich L, Moscicki AB. Diminished IFN-gamma and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. Int J Cancer 2009; 124(6):1379-83.
37. Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. Science 1998, 280, 248-253.
38. Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Cruz M, Martínez-Nava GA, Bahena-Román M, Ortíz-Flores E, Ramírez-González A, López-Estrada G, Delgado-Romero K, Madrid-Marina V. Association of the SNP at -592 of human IL-10 gene with an increased risk for Human Papillomavirus cervical lesión development. Infect Agent Cancer 2012; 7(1):32.
39. Wank R, Thomssen C. High risk of squamous cell carcinoma of the cervix for women with HLA-DQW3. Nature 1991; 352:723-725.
40. Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijers PJ, Walboomers JM, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. Frequency of down-regulation of individual HLA-A and B

alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. Br J Cancer 1995; 72 (2):405-11.

41. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Cabello RF, Stern LP. Natural history of HLA expression during tumor development. Immunol Today 1993; 14:491-499.
42. Williams MV, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. Future Virol. 2011; 6(1): 45–57.
43. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell 1993; 75:495–505.
44. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. Oncogene 1998; 10:2943–54.
45. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. J Gen Virol 1999; 80:1513–7.
46. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin proteasome pathway. Cancer Res 1996; 56:4620–4.
47. Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000; 92 (9): 690-8
48. Marangoz S, Güllü IH. Expression of ras, c-myc, and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. Cancer 1999; 85:2668-2669.
49. Díaz-Benítez CE, Navarro-Fuentes KR, Flores-Sosa JA, Juárez-Díaz J, Uribe-Salas FJ, Román-Basaure E, González-Mena LE, Alonso de Ruíz P, López-Estrada G, Lagunas-Martínez A, Bermúdez-Morales VH, Alcocer-González JM, Martínez-Barnetche J, Hernández-Pando R, Rosenstein Y, Moreno J, Madrid-Marina V. CD3ζ expression and T cell proliferation are inhibited by TGF-β1 & IL-10 in cervical cancer patients. J Clin Immunol 2009; 29(4):532-544.
50. Stern PL, Kitchener HC. Vaccines for the Prevention of Cervical Cancer. Capítulo 6. Natural immune control of HPV infección. Edt. Oxford University Press, Inglaterra. 1ª ed. 2008. pg. 63.

51. Bermúdez-Morales, VH, Burguete, AI, Gutierrez ML, Alcocer-González, JM, Madrid-Marina, V. Correlation between IL-10 expression & human papilloma-virus infection in cervical cancer: A mechanism for immune response escape. Cancer Investig 2008; 26: 1037–1043.
52. Arany I, Grattendick KG, Tyring SK. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV 16) through the 5`-segment of the upstream regulatory region (URR). Antiviral Research 2002; 55: 331-339
53. Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales VH, Gutiérrez-Xicotencatl L, Alcocer-González J, Recillas-Targa F, Madrid-Marina V. E6 and E7 oncoproteins from human papillomavirus type 16 induce activation of human TGFβ1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. Viral Immunol 2006; 19: 468–480.
54. Patel S, Chiplunkar S. Host immune responses to cervical cancer. Curr Opin Obstet Gynecol 2009; 21 (1):54-9.
55. Siddiqa A, Sims-Mourtada JC, Guzman-Rojas L, Rangel R, Guret C, Madrid-Marina V, Sun Y, Martinez-Valdez H. Regulation of CD40 and CD40 ligand by the AT-hook transcription factor AKNA. Nature 2001; 420:383-387.
56. Sims-Mourtada JC, Bruce S, McKeller MR, Rangel R, Guzman-Rojas L, Cain K, Lopez C, ZimonjicC DB, Popescu NC, Gordon J, Wilkinson MF, Martinez-Valdez H. The Human AKNA Gene Expresses Multiple Transcripts and Protein Isoforms as a Result of Alternative Promoter Usage, Splicing, and Polyadenylation DNA Cell Biol 2005; 24; 5, 325-338
57. Consultado el 10 de febrero de 2014 en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=80709&mrna=NM_030767.4&ctg=NT_008470.19&prot=NP_110394.3&orien=forward&refresh=refresh
58. Aravind L, Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. Nucleic Acids Res 1998; 26(19): 4413–4421.
59. Reeves R, Nissen MS. The A*T-DNA-binding domain of Mammalian High Mobility Group I chromosomal proteins. J Biol Chem 1990; 265(15): 8573-82,

60. Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JN, Reeves R, Gronenborn AM, Clore GM. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. Nat Struct Biol 1997; 4(8):657-65.
61. Ma W, Ortiz-Quintero B, Rangel R, McKeller MR, Herrera-Rodriguez S, Castillo EF, Schluns KS, Hall M, Zhang H, Suh WK, Okada H, Mak TW, Zhou Y, Blackburn MR, Martinez-Valdez H. Coordinate activation of inflammatory gene networks, alveolar destruction and neonatal death in AKNA deficient mice. Cell Res 2011; 21(11):1564-77
62. Torres-Poveda Kirvis, Burguete-García Ana I, Bahena-Román Margarita, Lagunas-Martínez Alfredo and Madrid-Marina Vicente (2012). AKNA as Genetic Risk Factor for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer, Intraepithelial Neoplasia, Supriya Srivastava (Ed.), ISBN: 978-953-307-987-5, InTech. Available from:http://www.intechopen.com/articles/show/title/akna-as-genetic-risk-factor-for-cervical-intraepithelial-neoplasia-and-cervical-cancer. p.311-336.
63. Mao L, Yang P, Hou S, Li F, Kijlstra A. Label-free proteomics reveals decreased expression of CD18 and AKNA in peripheral CD4+ T cells from patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. PLoS One 2011; 6(1):e14616.
64. Papic N, Maxwell CI, Delker DA, Liu S, Heale BS, Hagedorn CH: RNA-sequencing analysis of 5' capped RNAs identifies many new differentially expressed genes in acute hepatitis C virus infection. Viruses 2012; 4(4):581-612
65. Hildesheim A, Apple RJ, Chen CJ, Wang SS, Cheng YJ, Klitz W, Mack SJ, Chen IH, Hsu MM, Yang CS, Brinton LA, Levine PH, Erlich HA. Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. J Natl Cancer Inst 2002; 94(23):1780-9.
66. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papilomavirus-type specificity. Nature Genet 1994; 6(2):157-62.
67. Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, Franco EL, Villa LL. Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the

natural history of human papillomavirus infection. J Infect Dis 2002; 186(2):164-72.

68. Hernández-Hernández DM, Cerda-Flores RM, Juárez-Cedillo T, Granados-Arriola J, Vargas-Alarcón G, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, García-Carrancá A, Salcedo-Vargas M, Mohar-Betancourt A. 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):1099-106.
69. Madeleine MM, Brumback B, Cushing-Haugen KL, Schwartz SM, Daling JR, Smith AG, Nelson JL, Porter P, Shera KA, McDougall JK, Galloway DA. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk: a population-based study. J Infect Dis 2002; 186(11):1565-74.
70. Hildesheim A, Schiffman M, Scott DR, Marti D, Kissner T, Sherman ME, Glass AG, Manos MM, Lorincz AT, Kurman RJ, Buckland J, Rush BB, Carrington M. Human leukocyte antigen class I/II alleles and development of human papillomavirus-related cervical neoplasia: results from a case-control study conducted in the United States. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998; 7(11):1035-41.
71. Chen D, Gyllensten U. A cis-eQTL of HLA-DRB1 and a frameshift mutation of MICA contribute to the pattern of association of HLA alleles with cervical cancer. Cancer Med 2014; 3(2):445-52.
72. Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJ, Meijer CJ, Pawade J, Glew S. TNFalpha polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. Gynecol Oncol 2004; 92(2):675-9.
73. Singh H, Jain M, Sachan R, Mittal B. Association of TNFA (-308G>A) and IL-10 (-819C>T) promoter polymorphisms with risk of cervical cancer. Int J Gynecol Cancer 2009; 19(7):1190-4.
74. Lai HC, Chu CM, Lin YW, Chang CC, Nieh S, Yu MH, Chu TY.Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism as a prognostic predictor of invasive cervical cancer. Gynecol Oncol 2005; 96(2):314-9.

75. Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. Lancet. 1998; 352(9131):871-2.
76. Minaguchi T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y. No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection. Cancer Res 1998; 58(20):4585-6.
77. Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC, Schwartz P, Mortel R, Barnes W, Greenberg M, McGowan L, Scott DR, Martin M, Herrera JE, Carrington M. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. Nature 1998; 396(6711):531-2.
78. Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated cervical cancer. Mol Cell Biol Res Commun 2000; 3(2):111-4.
79. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski G. P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. Int J Cancer 2000; 87(4):528-33.
80. Farzaneh F, Roberts S, Mandal D, Ollier B, Winters U, Kitchener HC, Brabin L. The IL-10 -1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. BJOG 2006; 113(8):961-4.
81. Matsumoto K, Oki A, Satoh T, Okada S, Minaguchi T, Onuki M, Ochi H, Nakao S, Sakurai M, Abe A, Hamada H, Yoshikawa H. Interleukin-10 -1082 gene polymorphism and susceptibility to cervical cancer among Japanese women. Jpn J Clin Oncol 2010; 40(11):1113-6.
82. Singh H, Jain M, Mittal B. Role of TGF-beta1 (-509C>T) promoter polymorphism in susceptibility to cervical cancer. Oncol Res 2009; 18(1):41-5.
83. Lai HC, Lin WY, Lin YW, Chang CC, Yu MH, Chen CC, Chu TY. Genetic polymorphisms of FAS and FASL (CD95/CD95L) genes in cervical carcinogenesis: An analysis of haplotype and gene-gene interaction. Gynecol Oncol 2005; 99(1):113-8.

84. The NCBI handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct. Chapter 18, The Reference Sequence (RefSeq) Project. Disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books
85. Reese MG. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the Drosophila melanogaster genome. Comput Chem 2001; 26(1):51-6.
86. Levitsky VG, Ignatieva EV, Ananko EA, Turnaev II, Merkulova TI, Kolchanov NA, Hodgman TC. Effective transcription factor binding site prediction using a combination of optimization, a genetic algorithm and discriminant analysis to capture distant interactions. BMC Bioinformatics 2007; 8:481
87. Chekmenev DS, Haid C, Kel A E. P-Match: transcription factor binding site search by combining patterns and weight matrices. Nucleic Acids Res 2005; 33: W432–W437
88. Chen X, Weaver J, Bove BA, Vanderveer LA, Weil SC, Miron A, Daly MB, Godwin AK: Allelic imbalance in BRCA1 and BRCA2 gene expression is associated with an increased breast cancer risk. Hum Mol Genet 2008; 17(9):1336-48.
89. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res 2001; 29(1):308-11. Accesado en Noviembre del 2012.
90. Moscicki AB. HPV infections in adolescents. Dis Markers 2007; 23(4):229-34.
91. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144(5):646-74.
92. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA: An integrated map pf genetic variation from 1,092 human genomes. Nature 2012; 491(7422):56-65.
93. Nica AC, Dermitzakis ET. Expression quantitative trait loci: present and future. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2013; 368(1620):20120362.

94. French RR, Chan HTC, Tutt AL, Glennie MJ. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T cell help. Nat Med 1999; 5:548.
95. Hibma MH. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. Open Virol J 2012; 6:241-8.
96. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Burk RD, Rodriguez AC, Alfaro M, Hutchinson ML, Morales J, Schiffman M. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10(10):1021-7.
97. Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, Edelweiss MI, Kirma N, Valente PT, Syrjänen KJ, Cunha-Filho JS. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. Gynecol Oncol 2007; 105(1):157-65.
98. Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, Verheijen RH, Meijer CJ. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. Lancet 2001; 358(9295):1782-3.
99. Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini JS, Căpîlna M, Félix S, Seillès E, Mougin C, Prétet JL. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. Gynecol Oncol 2006; 102(1):22-31.
100. de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, Kenter G, Offringa R, van der Burg SH. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. Cancer Res 2004; 64(15):5449-55.
101. Peng S, Trimble C, Wu L, Pardoll D, Roden R, Hung CF, Wu TC. HLA-DQB1*02-restricted HPV-16 E7 peptide-specific CD4+ T-cell immune responses correlate with regression of HPV-16-associated high-grade squamous intraepithelial lesions. Clin Cancer Res 2007; 13(8):2479-87.

102. Woo YL, van den Hende M, Sterling JC, Coleman N, Crawford A, Kwappenberg KM, Stanley MA, van der Burg SH. A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. Int J Cancer 2010; 126(1):133-41.
103. Altenburg A, Baldus SE, Smola H, Pfister H, Hess S. CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. J Immunol 1999; 162(7):4140-7.
104. Hill SC, Youde SJ, Man S, Teale GR, Baxendale AJ, Hislop A, Davies CC, Luesley DM, Blom AM, Rickinson AB, Young LS, Eliopoulos AG. Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. J Immunol 2005; 174(1):41-50.
105. Huang Q, Qu QX, Xie F, Zhang T, Hu JM, Chen YG, Zhang XG. CD40 is overexpressed by HPV16/18-E6 positive cervical carcinoma and correlated with clinical parameters and vascular density. Cancer Epidemiol 2011; 35(4):388-92.
106. Hromas R, Morris J, Cornetta K, Berebitsky D, Davidson A, Sha M, Sledge G, Rauscher F 3rd. Aberrant expression of the Myeloid Zinc Finger gene, MZF-1, is oncogenic. Cancer Res 1995; 55(16):3610-4.
107. Gaboli M, Kotsi PA, Gurrieri C, Cattoretti G, Ronchetti S, Cordon-Cardo C, Broxmeyer HE, Hromas R, Pandolfi PP. Mzf1 controls cell proliferation and tumorigenesis. Genes Dev 2001; 15(13):1625-30.
108. Albergaria A, Resende C, Nobre AR, Ribeiro AS, Sousa B, Machado JC, Seruca R, Paredes J, Schmitt F. CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBPβ) isoforms as transcriptional regulators of the pro-invasive CDH3/P-cadherin gene in human breast cancer cells. PLoS One 2013; 8(2):e55749.
109. Rask K, Thörn M, Pontén F, Kraaz W, Sundfeldt K, Hedin L, Enerbäck S. Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta(C/EBBeta) and C/EBzeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. Int J Cancer 2000; 86(3):337-43.
110. Tsai SJ, Hwang JM, Hsieh SC, Ying TH, Hsieh YH. Overexpression of myeloid zinc finger 1 suppresses matrix metalloproteinase-2 expression and reduces

invasiveness of SiHa human cervical cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2012; 425(2):462-7.

ANEXOS

1. Carta de aprobación del poryecto por parte de la comisión de Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública

Instituto Nacional de Salud Pública
Comisión de Investigación

No. Proyecto. 500

Cuernavaca, Mor., a 08 de octubre del 2012.

C. Gabriela Angélica Martínez Nava
Doctorado en Ciencias de la Salud
Área de Concentración en Enfermedades Infecciosas
Instituto Nacional de Salud Pública

Por medio del presente informo a usted la Comisión de Investigación, evaluó su proyecto de tesis titulado: **"Caracterización de variantes genéticas en la región promotora del gen AKNA asociadas a cáncer Cervicouterino"**; el dictamen de esta comisión es: **aprobado**.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce
Presidente de la Comisión
de Investigación-INSP

Ccp. Mtra. Lorena Elizabeth Castillo Castillo.- Jefa del Departamento de Asuntos Escolares.- Presente.

Avenida Universidad 655
Colonia Santa María Ahuacatitlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
conm.: (777) 329 3000
Ext. 3103
www.insp.mx

2. Carta de aprobación del proyecto por parte de la comisión de bioética del Instituto Nacional de Salud Pública.

Instituto Nacional de Salud Pública
Comisión de Ética

Cuernavaca, Morelos, a 3 de septiembre de 2012

CI Tesis: 503

Gabriela Martínez Nava
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud
Pública- Enfermedades Infecciosas
Presente

En relación a su protocolo de tesis titulado ***"CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN AKNA ASOCIADAS A CÁNCER CERVICOUTERINO",*** me permito informarle que los miembros de esta Comisión han acordado otorgarle el dictamen de:

Exento de Revisión

Lo anterior debido a que su investigación no incluye sujetos humanos y/o la base secundaria que está utilizando ya ha sido revisada y aprobada por esta u otra Comisión de ética.

Le solicito atentamente que en caso de ocurrir algún cambio o actualización de datos que afecten el planteamiento actual de su protocolo de tesis, lo comunique oportunamente para someterlo a consideración de esta Comisión.

Atentamente

Dra. Julieta Ivone Castro Romero
Presidenta Comisión de Ética

ccp. Dr. Vicente Madrid Marina- Coordinador Doctorado en Ciencias de la salud – Enfermedades Infecciosas
Mtro. Miguel Ángel Reyes – Depto. Asuntos Escolares

Avenida Universidad 655
Colonia Santa María Ahuacatitlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
conm.: (777) 329 3000
Ext. 2465, 7424, 2262
www.insp.mx

3. Carta de aprobación del proyecto por parte de la comisión de bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA
COMISION DE BIOSEGURIDAD

CB12-295.

Cuernavaca, Mor., a 17 de Septiembre del 2012.

CB: 50

C. Martínez Nava Gabriela Angélica
Tesista Doctorado en Enfermedades Infecciosas
Instituto Nacional de Salud Pública
P r e s e n t e

Por medio del presente informo a usted que el dictamen de la Comisión de Bioseguridad a su proyecto titulado: "**CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN AKNA ASOCIADAS A CÁNCER CERVICOUTERINO**, el dictamen de la Comisión de Bioseguridad es: **APROBADO** debido a que dicho proyecto establece todas las medidas de uso y manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI); por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

Le recordamos que cuando algún proyecto de investigación haga uso de agentes infecciosos o maneje muestras clínicas de origen humano y/o animal y no sean procesadas en este instituto, deberá enviar una carta de la institución o instituciones en la cual se responsabilizan del manejo y disposición final de los RPBI y tóxicos generados durante el transcurso de la investigación.

Asimismo, si el proyecto maneja materiales radiactivos, será necesario enviar a esta Comisión la licencia del ININ del responsable encargado.

Atentamente,

Dr. Salvador F. Villalpando Hernández
Presidente de la Comisión
de Bioseguridad-INSP

Col. Santa María Ahuacatitlán
62508 Cuernavaca, Morelos
México

e-mail: svillalp@insp.mx

Tel-Fax:01 (777) 3293000 ext 7204
Secretaria: 7204

4. Carta de consentimiento informado aprobada por la comisión de ética del Instituto Nacional de Salud Pública para el proyecto: "Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical"

Instituto Nacional de Salud Pública

Gobierno Del Estado De Morelos 2006 - 2012 | SALUD | Secretaría de Salud | Servicios de Salud de Morelos

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRA SANGUÍNEA Y PARA TOMA DE MUESTRA DE EXUDADO CERVICAL

FECHA: /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

día mes año

En México mueren muchas mujeres por Cáncer cérvicouterino y cada año se reportan más de 11,000 nuevos casos; lo cual sugiere que existe un factor genético en la población que la haga susceptible a esta enfermedad. El Instituto Nacional de Salud Pública está realizando un estudio titulado "Polimorfismos de la región reguladora del gen de Interleucina 10 y su asociación con la infección del virus del papiloma humano y el cáncer cérvicouterino" con el fin de identificar factores genéticos de susceptibilidad en la población mexicana.

En este estudio se está invitando a mujeres que acuden a consulta en el Centro de Atención de la Mujer referidas de centros de atención primaria con un diagnóstico presuntivo que será confirmado ó descartado por el ginecólogo colposcopista. En caso de aceptar participar en el estudio mediante la firma de esta carta de consentimiento se le pedirá lo siguiente:

a) Responder a un cuestionario de 42 preguntas sobre características demográficas e historia reproductiva que le hará el profesional encargado de toma de muestra en un tiempo aproximado de 15 minutos. La información que usted dé será estrictamente confidencial y de suma importancia para el logro de los objetivos del presente estudio. Cuando esta información se emplee en reportes científicos, serán resumidos de tal forma, que no aparezca algún nombre o forma alternativa de identificación.
b) Permitir la toma de muestra sanguínea (2 tubos de 7 ml = dos cucharaditas) por el profesional especializado encargado, con la que nos permitirá extraer el ADN para analizar los polimorfismos del gen de IL-10, el ARN para analizar la expresión del ARNm de IL-10 y suero para medir el nivel de proteína de IL-10" y establecer relaciones con el diagnóstico que el ginecólogo colposcopista le realice. Por otro lado, esta muestra servirá para la creación de un banco de ADN, ARN y suero que nos permitirá en un futuro realizar otras investigaciones de importancia para la salud de la población en general. La toma de

sangre será tomada con material nuevo y estéril y se llevará a cabo en el consultorio del Centro de Atención para la Salud de la Mujer, así como la aplicación del cuestionario.

c) Permitir la toma de muestra de exudado de cérvix por el ginecólogo colposcopista en un tiempo aproximado de 10 minutos. En este procedimiento le tomarán muestra del canal endocervical con un cepillo (citobrush) 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. Adicionalmente el ginecólogo le tomará muestra de esta zona para realizar un frotis o extendido en lámina para la citología o Papanicolau y le hará una colposcopia adicionándole ácido acético para detectar tempranamente cualquier tipo de lesión que tenga que ser tratada. El diagnóstico colposcópico lo realizará el ginecólogo colposcopista al momento de la consulta, la citología será enviada para su análisis patológico.

RIESGOS Y MOLESTIAS POTENCIALES:

La toma de muestra de exudado cervical 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 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 si usted tiene una infección por el Virus del Papiloma Humano o algún tipo de lesión del cuello uterino que requiera de tratamiento oportuno.

En la siguiente cita de control luego de la toma de muestra, el ginecólogo colposcopista del Centro de Atención para la Salud de la Mujer, le dará a cada uno de las pacientes el diagnóstico colposcópico. El resultado de la prueba de PCR para VPH y de la citología, se dará al paciente un mes después de la toma de muestra en una de las citas de control. Los resultados se darán por escrito, con copia en la historia clínica de cada uno de las pacientes. En caso de que los resultados muestren que usted tiene alguna lesión, el personal médico especializado del 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 exudado 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 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 (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 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

Comisión de Ética
Instituto Nacional de Salud Pública
Versión Aprobada:
Mayo 12, 2009
Proyecto: CI-814
Folio Identificador: J16

5. Poder del estudio para las asociaciones con los factores genéticos.

Dado que este trabajo parte de un banco de muestras construido con anterioridad, debemos partir del tamaño de muestra existente para poder determinar el poder que cuenta el estudio. En la figura 6 se grafica la capacidad del estudio para detectar distintas magnitudes de asociación (OR) estadísticamente significativas, tomando en cuenta distintas MAFs, es decir, el poder esperado que se cuenta con este estudio dependiendo de varias MAFs. Este cálculo se llevó acabo con el programa Quanto 1.2 [81] y los parámetros utilizados fueron: una muestra de 200 mujeres (100 sin lesión y 100 con CaCU o bien, 100 con LEI) con una tasa de incidencia de 9.1 por cada 100 mil mujeres, un nivel de significancia del 95% tomando en cuanta ambas colas de la distribución, una MAF que varía de 1% a 30% y un OR que va 1.2 a 3. El cálculo del poder se realizó tomando en cuenta tanto un modelo de herencia codominante (fig. 6).

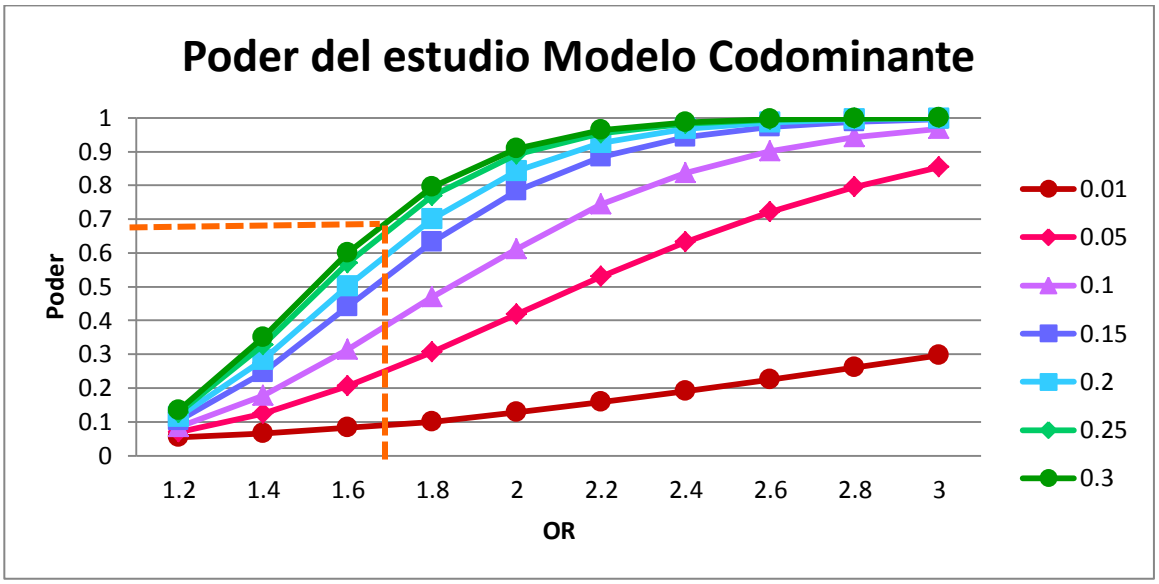

Figura 6. Cálculo de Poder con un modelo de herencia codominante, con una n de 200, con una tasa de incidencia de $9.1X10^4$ y una α de 0.05; cada color representa una MAF diferente. La línea punteada de color naranja representa el poder aproximado de la RM obtenida para el homocigoto T/T del SNP -1116C>T y CaCU. Con un poder casi del 70% podemos decir que el polimorfismo -1116C>T no se asocia con CaCU.

6. Evaluación de la bondad de ajuste de los modelos de regresión logística multinomial probados.

Se realizó el cálculo la devianza, coeficiente de Akaike (AIC), la pseudo R2 y el LR de cinco modelos distintos (Tabla 6):

Modelo A: $P(DX = k-1|edad) = 1 / (1+\exp^{-(\beta 0+\beta 1 edad)})$

Modelo B: $P(DX = k-1|edad, \text{tipo VPH}) = 1 / (1+\exp^{-(\beta 0+\beta 1 edad+ \beta 2 \text{ tipo VPH})})$

Modelo C: $P(DX=k-1|edad, \text{tipo VPH y antecedentes de cáncer}) = 1 / (1+\exp^{-(\beta 0+\beta 1 edad +\beta 2 \text{tipo VPH}+ \beta 3 \text{antecedentes cáncer})})$

Modelo D: $P(DX=k-1|edad, \text{tipo VPH y antecedentes de ITS}) =$

$= 1 / (1+\exp^{-(\beta 0+\beta 1 edad +\beta 2 \text{tipo VPH}+ \beta 3 \text{antecedentes ITS})})$

Modelo E: P (DX=1|edad, tipo VPH, antecedents ITS y antecedents cáncer)=

$= 1 / (1+\exp^{-(\beta 0+\beta 1 ead + \beta 2 \text{tipo VPH}+ \beta 3 \text{antecedentes ITS}+ \beta 4 \text{antecedentes cáncer})})$

Tabla 6. Medidas de bondad de ajuste para los cinco modelos de regresión logística multinomial probados.

	Medidas de Bondad de Ajuste			
Modelo	Pseudo R^2	LR	Devianza	AIC
A	0.16	113.558 **0.00**	615.727	1.894
B	0.19	137.907 **0.00**	591.378	1.84
C	0.2	146.062 **0.00**	583.223	1.833
D	0.27	194.207 **0.00**	535.078	1.692
E*	**0.28**	202.133 **0.00**	**527.153**	**1.687**

*Modelo utilizado en los análisis de asociación realizados

El modelo denominado como E fue el que obtuvo la mayor pseudo R^2, la menor devianza y el menor AIC. Además, al realizar la prueba de Wald para las covariables de edad, tipo de VPH, antecedentes de ITS y antecedentes heredofamiliares de cáncer todas, con excepción de tipo de VPH tuvieron un $p<0.02$, por lo que podemos rechazar que los coeficientes sean iguales a cero (H_0: $\beta=0$). Aunado a esto, al realizar la prueba de cociente de verosimilitudes entre el modelo E (modelo saturado) y los otros 4 modelos (modelos reducidos) vimos que el modelo reducido no explica lo mismo que el modelo saturado ($p<0.001$). Es por todo lo anterior que decidimos quedarnos con el modelo E, P(DX=1|edad, tipo VPH, antecedentes de ITS y antecedentes de cáncer), para realizar los análisis de asociación.