

Instituto Nacional de Salud Pública

Escuela de Salud Pública de México

Evaluación de la asociación de polimorfismos de TLR9 con la expresión de TNF e IL-10 en lesión intraepitelial escamosa (bajo y alto grado) y cáncer cérvico uterino.

TESIS

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Salud Pública

Presenta :

Cecilia Martínez Campos Generación 2012-2016

Director de tesis : Dr. Vicente Madrid Marina Asesores : Dra. Ana I. Burguete García Dr. Jorge Salmerón Castro

> Cuernavaca, Mor. 25 de agosto de 2016

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Vicente Madrid Marina, en la Dirección de Infecciones crónicas y cáncer del Centro del Investigación en Enfermedades Infecciosas en el Instituto Nacional de Salud Pública.

Comité de Sinodales:

Presidente: Dr. Constantino Lopez Macías (IMSS) Secretario: Dr. Vicente Madrid Marina (INSP) Primer sinodal: Dra. Carmen Maldonado Bernal (HIMFG) Segundo sinodal: Dr. Jesús Martínez Barnetche (INSP)

Tercer sinodal: Dr. Sergio Encarnación Guevara (UNAM)

Agradecimientos

- A mi director de tesis Dr. Vicente Madrid Marina
- A mi comité de asesores de tesis: Dra. Ana I. Burguete García

Dr. Jorge Salmerón Castro

- A los investigadores que formaron parte de mi comité de sinodales: Dr. Constantino López Macías Dra. Carmen Maldonado Bernal Dr. Jesús Martínez Barnetche Dr. Sergio Encarnación Guevara
- A todos los miembros del Laboratorio 4planta baja (CISEI/INSP), especialmente a: Dra. Kirvis Torres Poveda M. Margarita Bahena M. Crysele Calderón Dr. Alfredo Lagunas Dra. Carla Contreras
- A todos los miembros del laboratorio 2 planta baja (CISEI/INSP).
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada durante el desarrollo de este proyecto, con el número de registro 219268, y por el financiamiento de este proyecto a través del proyecto titulado "Validación de un panel de marcadores genéticos para la identificación de un perfil de susceptibilidad a cáncer cérvico uterino en población mexicana"

Resumen

TLR9 ("Toll-like receptor 9") es un receptor localizado principalmente en los compartimentos endosomales de las células que reconoce ADN de virus y bacterias, entre otros. Este reconocimiento induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α) e inhibe la expresión de citocinas anti-inflamatorias (IL-10) en ciertos tipos celulares, lo que a su vez favorece la activación y diferenciación de las células del sistema inmune. Sin embargo, es posible que el reconocimiento del genoma de los VPHs de alto riesgo a través de TLR9 no ocurra en algunas mujeres genéticamente susceptibles a la infección, puesto que las proteínas virales E6 y E7 de VPH16 inhiben la expresión de este receptor de manera temporal. Por otro lado, TLR9 se sobre-expresa en células tumorales de cáncer de cérvico uterino y se ha reportado que aumenta en periferia en algunos tipos de cáncer.

En este estudio se evaluó la expresión de TLR9, TNF-α e IL-10 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de mujeres positivas para VPH sin lesión intrapitelial escamosa (SL VPH⁺), mujeres con lesión intraepitelial escamosa (LEI) y cáncer cérvico uterino (CaCU), respecto al grupo control (mujeres negativas para VPH sin lesión intrepitelial escamosa; SL VPH^{neg}). Así mismo se evaluó la asociación de tres polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen de TLR9 (-1486T/C, -1237T/C y 2848G/A) con todos los grupos de estudio.

Nuestros resultados muestran que el genotipo TT en el locus -1486 del promotor de TLR9 está asociado significativamente con LEI y CaCU en la población de estudio. Además, se encontró que la expresión de TLR9 aumenta de manera significativa en PBMCs de pacientes con LEI y CaCU y que los niveles altos de expresión de TLR9 están asociados significativamente con LEI y CaCU, lo que sugiere que TLR9 puede ser utilizado como un nuevo biomarcador de la progresión hacia CaCU. Aunado a esto, encontramos que los niveles de TNF- α e IL-10 aumentan de manera significativa en CaCU respecto a los niveles de expresión de estas citocinas en el grupo control.

4

Índice

Agradecimientos
Resumen 4
Introducción9
Planteamiento del problema10
Marco teórico 11
VPH y desarrollo de cáncer cérvico uterino11
Mecanismo de infección de VPH12
Proteínas virales E6 y E713
Respuesta inmune de la mucosa cervical15
Mecanismos de evasión de la respuesta inmune15
TLR9 (Toll-Like Receptor 9)
Polimorfismos de un solo nucleótido de TLR918
Justificación
Pregunta de investigación 21
Hipótesis
Objetivo general
Objetivos particulares
Metodología
Banco de muestras23
Criterios de selección de SNPs del gen de TLR925
Genotipificación de SNPs del gen de TLR9 25
Medición de los niveles de ARN mensajero de TLR9, TNF e IL-10 de PBMCs
Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)26

Análisis Estadístico	
Consideraciones éticas y de bioseguridad	
Resultados	
Discusión	
Conclusiones	
Perspectivas	
Artículos enviados	
TLR9 gen polymorphism -1486T/C (rs187084) is associated with uterine cer Mexican female population	vical neoplasm in 47
Role of TLR9 on oncogenic virus-produced cancer.	
Anexo II	
Anexo III	
Anexo IV	
Anexo V	
Bibliografía	

Índice de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonuceico
ADN cf	Ácido desoxirribonuceico circulante libre de células ("DNA cell
	free")
ADNc	Ácido desoxirribonuceico complementario
AP-1	Proteína activadora-1 (del inglés "Activator protein-1")
CaCU	Cáncer cérvico uterino
CIN	Neoplasia cervical intraepitelial ("Cervical intraepithelial
	neoplasia")
HSIL	Lesión intraepithelial de alto grado ("High-grade squamous
	intraepithelial lesion")
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IRF	Factor regulador de interferón (Interferon regulatory factor)
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal ("c-Jun N-terminal Kinases")
LEI	Lesión escamosa intraepitelial
LSIL	Lesión intraepitelial de bajo grado ("Low-grade squamous
	intraepithelial lesion")
МАРК	Proteína quinasa activada por mitógenos ("Mitogen activated
	protein kinases")
MyD88	"Mieloyd Differentiation primary response gen 88"
NF-кВ	Factor nuclear- кВ (Nuclear Factor-кВ)
ODN	Oligodeoxinucleótido
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos ("Pathogen-
	Associated Molecular Pattern")
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica ("Peripheral blood
	mononuclear cell")

PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones ("Pattern Recognition
	Receptors")
SL	Sin lesión escamosa intraepitelial
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción ("Signal
	Transducer and Activator of Transcription")
ТАР	Transportador asociado con el procesamiento de antígeno
	("Transporter Associated with Antigen Processing")
TGF	Factor de crecimiento transformante ("Transforming growth
	factor")
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF- α	Factor de necrosis tumoral ("Tumor Necrosis Factor")
URE	Unidades relativas de expresión
VPH	Virus del Papiloma Humano

Introducción

El cáncer cérvico uterino se define como "Una alteración celular que se origina en el epitelio del cérvix que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, las cuales progresan a un cáncer *in situ* (confinado a la superficie epitelial) o a un cáncer invasor en donde las células con transformación maligna traspasan la membrana basal"(1). El cáncer cérvico uterino representa una enfermedad grave dado que a pesar de que es una enfermedad prevenible e incluso curable, las tasas de mortalidad por esta causa no han disminuido en los países de bajos y medianos ingresos (2).

El factor etiológico del cáncer cérvico uterino son los virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo y la persistencia de las infecciones con estos virus están asociadas a la transformación celular y al desarrollo de cáncer. En este sentido, la persistencia viral requiere de mecanismos de evasión de la respuesta inmune, entre los que se encuentran la disminución de la expresión de TLR9 (3, 4). Hasan y colaboradores publicaron que las proteínas virales E6 y E7 de VPH inhiben la expresión de TLR9 de manera temporal, por lo que es posible que este evento podría comprometer el reconocimiento del ADN viral en queratinocitos (3, 5).

TLR9 es un receptor que inicialmente se identificó como un receptor que reconoce ADN de genomas virales y bacterianos (6), sin embargo recientemente se ha reportado que reconoce y es activado por otros tipos de ADN, como ADN mitocondrial y ADN circulante (7-9). El reconocimiento de ADN a través de TLR9 induce la activación de las vías de las MAPKs (del inglés "Mitogen activated protein kinases"), la activación de factores de transcripción como AP-1 (Activator protein 1) y NFKB (Nuclear Factor κ B), éstos a su vez participan en la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-8, IL-1 y TNF- α (del inglés "Tumor Necrosis Factor") (10, 11). TNF- α es una citocina importante en la respuesta inmune ya que promueve la proliferación y activación de las células del sistema inmune e induce la apoptosis de células, entre ellas las tumorales (12). Por otra parte, se ha reportado que la activación de las vías de señalización de TLR9 disminuye la producción de la citocina inmunosupresora IL-10 en un modelo de células T reguladoras (13).

Planteamiento del problema

El cáncer cérvico uterino ocupa el tercer lugar de las neoplasias más frecuentes en mujeres a nivel mundial (14). En 2008, se reportaron 530, 000 casos nuevos, de los cuales alrededor de 270, 000 mujeres fallecieron por esta causa (14). El 80% de los decesos ocurrieron en países de bajos y medianos ingresos (15).

El factor etiológico del cáncer cérvico uterino es el virus de Papiloma Humano (VPH), un virus de ADN de doble cadena que infecta las células de la membrana basal de la epidermis cervical. El VPH es un virus extremadamente común a nivel mundial y se han descrito más de 100 tipos diferentes, sin embargo, los tipos VPH 16 y VPH18 generan el 70% de los casos de cáncer cérvico uterino (16). En general, el 90% de las mujeres que se infectan con VPH eliminan la infección de manera natural, por el contrario, el 10% restante de las mujeres infectadas no eliminan la infección, lo que puede llevar al establecimiento de infecciones persistentes que pueden proseguir hacia una lesión escamosa intraepitelial y finalmente cáncer cérvico uterino.

El hecho de que sólo algunas mujeres no logran eliminar la infección por VPH, sugiere que existen diferencias genéticas en TLR9, que favorecen la persistencia viral y en consecuencia, la progresión de lesiones de bajo y alto grado hacia cáncer invasor.

Marco teórico

En México, el cáncer cérvico uterino es el segundo tipo de cáncer más frecuente entre mujeres de cualquier edad y el segundo más frecuente en mujeres de entre 15 y 44 años (17). Estimaciones recientes muestran que cada año se diagnostican 10,186 casos de mujeres con cáncer cérvico uterino, de las cuales 5,061 fallecen por esta enfermedad (17). Alrededor del 9.4% de la población de mujeres en México, ha tenido una infección por VPH en algún momento de su vida y el 70% de los casos de cáncer cérvico uterino invasivo, son atribuidos a los tipos VPH16 y 18 (17).

La historia natural del desarrollo del cáncer cérvico uterino dura de 15 a 20 años e involucra la infección con el VPH, persistencia de la infección, la progresión hacia el carcinoma *in situ* y finalmente el cáncer invasor (18).

El cáncer cervical, base en su origen tisular, puede ser de dos tipos; ya sea de célula escamosa o glandular. Sin embargo, el 85% de los casos de cáncer cervical es de origen escamoso (19).

VPH y desarrollo de cáncer cérvico uterino

El VPH es un virus con una cápside de 55 nm, no envuelto, con un genoma de ADN (7-8 kb), que infecta las capas basales de la epidermis (20). Se han identificado alrededor de 120 tipos diferentes de VPH y un tercio de ellos infectan las células epiteliales del tracto genital (21). Los VPHs se dividen en dos grupos con base en su potencial oncogénico: VPHs de alto riesgo (HR, "High Risk"), grupo dentro del cual se encuentran HPV 16, 18, 31 y VPHs de bajo riesgo (LR, "Low Risk"), grupo dentro del cual se encuentran HPV 6 y 11 (21). Las infecciones por los HR VPH usualmente duran de 8 a 16 meses y eventualmente son eliminadas por el sistema inmune; sin embargo, el 10-20% de las mujeres no eliminan la infección por alteraciones de la respuesta inmune, lo que resulta en una infección persistente y una probable progresión hacia cáncer cérvico uterino (22, 23). Las lesiones de mujeres que no

eliminan la infección del VPH pueden progresar hacia neoplasia cervical grado (CIN; del inglés "Cervical intraepithelial neoplasia") 1, 2, 3 y cáncer invasor (24). En lesiones tipo CIN 1, un tercio de las células supra-basales tienen características de células basales; en lesiones tipo CIN 2 estas células cubren la mitad del grosor del tejido y en lesiones tipo CIN 3, estas células cubren la totalidad del tejido (Sistema de clasificación Richard) (25). La progresión de lesiones tipo CIN 3 hacia cáncer invasor, usualmente ocurre en lesiones que contienen el ADN viral integrado en el genoma del hospedero (25). Por otra parte, en el sistema de clasificación Bethesda, la etapa CIN I se clasifica como "lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado" (LSIL, por sus siglas en inglés "Low-grade squamous intraepithelial lesion") y las etapas CIN II y III como "lesiones intraepiteliales de alto grado" (HSIL, por sus siglas en inglés "highgrade squamous intraepithelial lesion"), esta última incluye el carcinoma *in situ (25)*.

Mecanismo de infección de VPH

El VPH infecta las células basales del epitelio cervical exclusivamente, de tal forma que su ciclo de replicación está acoplado al ciclo de diferenciación natural de dichas células, a las cuales accede mediante micro abrasiones del tejido epitelial que ocurren como resultado de diferentes tipos de traumas físicos (26). Las células basales del epitelio cervical sano salen del ciclo celular tan pronto migran a las capas supra-basales y sufren un proceso de diferenciación terminal; sin embargo, en las células basales infectadas por VPH, las proteínas virales dirigen la progresión del ciclo celular y la diferenciación de las células se retrasa (24). Cuando la célula basal infectada se divide, el genoma viral replicado segrega en la célula hija, la cual migra hacia las capas suprabasales y continúa con su ciclo de diferenciación, mientras que la célula basal continúa proliferando (mecanismo por el cual se mantiene la replicación viral) (26). Hasta ahora no se conoce el mecanismo exacto por el cual el VPH16 infecta dichas células, sin embargo, se sabe que la entrada del virus es dependiente de la unión con heparan sulfato proteoglicano y que es posible que requiera de la interacción con proteínas co-receptoras como la integrina α 6 (27). Los

VPHs se desensamblan en los endosomas tardíos y/o en los lisosomas y posteriormente el ADN viral es transferido al núcleo, sitio exclusivo de la replicación (20, 28).

El genoma de VPH codifica para seis proteínas de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y dos proteínas estructurales de expresión tardía L1 y L2 reguladas por una región larga de control (LCR por sus siglas en inglés) de aproximadamente 850 pb, sitio donde además se encuentra el origen de replicación de dicho genoma (20). . Las proteínas E1 y E2 están relacionadas con la regulación de la replicación del ADN viral, la proteína E4 se ha asociado con el colapso de los filamentos de citoqueratina, la proteína E5 está relacionada con la alcalinización de los endosomas y las proteínas E6 y E7 participan en la replicación viral y en el proceso de inmortalización y transformación de las células infectadas (20).

Proteínas virales E6 y E7

Las proteínas E6 y E7 son proteínas de expresión temprana y su unión a blancos celulares dirige la replicación viral, la inhibición de la apoptosis, la proliferación celular y la inestabilidad cromosómica (29). La proteína E6 es una proteína de 150 aminoácidos (18 KDa) que contiene dos motivos de cisteína (Cys-X-X-Cys) y un sitio de unión a dominios PDZ en el extremo carboxilo terminal, los cuales le permiten unirse a un gran número de blancos celulares (29). Uno de ellos es la proteína p53. E6 se une a la proteína p53 a través de la Proteína celular asociada a E6 (E6AP, por sus siglas en inglés), una ubiquitin ligasa que ubiquitina a p53. Esta señal dirige la degradación de p53 por el proteosoma, lo que finalmente inhibe la inducción de la apoptosis (29). De igual manera, E6 interactúa con las proteínas pro-apoptóticas Bak y c-Myc, así como pro-caspasa 8 y la molécula adaptadora FADD (del inglés "Fas Associated Death Domain") (29). E6 interactúa con proteínas que participan en la respuesta inmune antiviral como el Factor Regulador de Interferón 3 ("IRF3" por sus siglas en inglés) (29).

La proteína E7 es una proteína de 100 aminoácidos (13 KDa) que posee un dominio de dedos de zinc en su extremo carboxilo que permite su dimerización, además de un sitio de fosforilación dependiente de caseína II en su extremo amino terminal; E7 interactúa con diferentes blancos celulares mediante los dominios conservados CD1, CD2 y CD3 (29). Uno de sus blancos principales es la proteína retinoblastoma (Rb), de tal forma que su unión con esta proteína induce la activación de factores de transcripción de la familia E2F activando la expresión de proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular, como las ciclinas A y E (28). Además, E7 se une a las proteínas inhibidoras de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27, lo que de igual forma favorece la proliferación (28).

El análisis de la expresión de E6 y E7 muestra que éstas se expresan desde etapas tempranas de la infección con VPH e incluso son detectables en 11-27% de las mujeres positivas para VPH sin lesión (30-32). En las lesiones de bajo grado E6 y E7 se expresan en las capas basales y parabasales del epitelio cervical y el aumento en su expresión correlaciona con el aumento de la lesión y con la progresión hacia cáncer invasor (31, 33, 34).

Durante las etapas iniciales de la infección por VPH, la proteína viral E2 actúa como un factor de transcripción, el cual se une al promotor temprano del genoma viral (p97 en VPH16) y regula de manera positiva la expresión de las proteínas virales E6 y E7 (21, 24, 35). E2 es un activador de la transcripción de E6 y E7 cuando se expresa en niveles relativamente bajos, sin embargo funciona como un represor de E6 y E7 cuando se expresa en niveles altos, debido a que desplaza al factor de transcripción Sp1 del promotor temprano de VPH. En etapas tardías de la infección, la integración del genoma viral en el genoma celular rompe el marco de lectura de E2, lo que resulta en la sobreexpresión de E6 y E7 (36).

Respuesta inmune de la mucosa cervical

El epitelio cervical se divide en dos capas, la dermis y la epidermis separadas por la membrana basal. La epidermis está conformada en su mayoría por queratinocitos, los cuales tienen cierta capacidad inmunológica, por lo que pueden funcionar como células presentadoras no profesionales y son capaces de secretar péptidos antimicrobianos, interferones y citocinas proinflamatorias e inmuno-reguladoras, de tal forma que son capaces de inducir la activación de linfocitos T CD4 y CD8 de memoria (37). En condiciones normales, la población predominante de células del sistema inmune en la epidermis son las células de Langerhans (células presentadoras profesionales de antígeno CD207⁺) y en menor proporción se encuentran linfocitos T de memoria, mientras que en condiciones patológicas se reclutan neutrófilos, monocitos, células dendríticas plasmacitoides y en etapas más tardías linfocitos B y T activados (37). Por otra parte, la dermis (o submucosa) está poblada por células NK ("Natural Killers"), NKT ("Natural Killers T cell"), linfocitos B y linfocitos T (37, 38). Aunado esto, se han encontrado neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y B en lavados vaginales, lo que indica su presencia en la mucosa cervical (37).

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Los VPHs han desarrollado diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune. En general, estos mecanismos son: Disminución de la expresión de MHC I (del inglés "Major Histocompatibility Complex") y de la presentación de antígeno, así como la inhibición del reclutamiento de Células Presentadoras de Antígeno (APCs, por sus siglas en inglés), inhibición de la apoptosis, expresión de factores inmunosupresores, disminución de la activación de NKs, inhibición de la producción de IFNs tipo I y disminución del reclutamiento de linfocitos T CD4⁺ (35, 37).

Específicamente, las proteínas E6 y E7 inducen la disminución en la expresión del MHC I mediante la regulación negativa de TAP y LMP2, los cuales forman parte de la

vía de procesamiento y presentación de antígeno e inhiben la respuesta mediada por interferón Υ (IFN-Υ), al inhibir la fosforilación de STAT (por sus siglas en inglés; "Signal Transducer and Activator of Transcription") o mediante la inhibición de otros miembros de dicha vía como IRF1 (37). La proteína viral E2 de VPH16 favorece la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10; por su parte, E6 y E7 generan señales que inhiben la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF-α e IL-18, al mismo tiempo que inducen la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF-β (21, 39-42). En el mismo sentido, la infección de queratinocitos por VPH16 inhibe temporalmente la expresión de TLR9 de manera dependiente de E6 y E7 (4, 5).

TLR9 (Toll-Like Receptor 9)

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra patógenos y lleva a cabo sus funciones, entre otros mecanismos, a través de receptores denominados PRRs, (del inglés "Pattern Recognition Receptors") los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; del inglés Pathogen-Associated Molecular Pattern") (6). Uno de estos receptores es TLR9, un receptor principalmente citoplásmico que reconoce ADN de virus y bacterias. Este receptor es expresado predominantemente en células dendríticas plasmacitoides, linfocitos B, queratinocitos y células epiteliales (6).

TLR9 se localiza en el retículo endoplasmático. Sin embargo, el reconocimiento de ADN externo involucra el transporte de TLR9 del retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi y el procesamiento proteolítico del ectodominio de dicho receptor, evento necesario para su unión con la proteína MyD88 (del inglés "Mieloyd Differentiation 88") y la activación de la cascada de señalización del mismo (43).

Las señales de activación mediadas por TLR9 inducen, dependiendo del tipo celular, la producción de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias; así como la

expresión de moléculas co-estimuladoras, las cuales a su vez, favorecen la maduración de células del sistema inmune y por tanto, la activación de células efectoras encargadas de la eliminación del patógeno (6). La unión de TLR9 con su ligando induce la dimerización del receptor y el reclutamiento de varias moléculas adaptadoras y cinasas. Existen dos vías de señalización descritas para TLR9, cuyo factor común es el reclutamiento de la molécula adaptadora MyD88 y de las cinasas IRAK4 (Interleukin-1 receptor associated kinase 4) y TRAF6 (Tumor necrosis-factor-receptor-associated factor 6) (44-47). En células dendríticas convencionales, macrófagos y queratinocitos, la activación de TLR9 Ileva a la activación de IRF5, de las MAPKs y de la vía de JNK ("c-Jun N-terminal Kinases"), lo que involucra la activación de factores de transcripción como NF-κB y AP-1 (Activator protein-1) y la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF-α, IL-6 e IL-1 (48-51). Por otra parte, en células dendríticas plasmacitoides, se activan IRAK1, TRAF3, IKKα y se reclutan proteínas como osteoponina, DOCK2 y viperina, lo que lleva a la activación de IRF7 y a la expresión de interferones (IFNs) tipo I (52-56).

El estímulo a través de TLR9 es importante en la maduración de células dendríticas pues regula la expresión de MHC II, CD40 y la producción de IL-12 (57). Otros estudios han mostrado que el estímulo del TLR9 en linfocitos B favorece la producción de IL-6, mientras que en células dendríticas plasmacitoides favorece la producción de IFN- α e IL-12 (58). En macrófagos, la estimulación del TLR9 con oligodeoxinucleotido (ODN) CpG induce la expresión de TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ y la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD40, B7-1, B7-2 y MHC II (6, 59). De manera interesante, un estudio reciente muestra que la producción de TNF- α en respuesta al estímulo de TLR9 en macrófagos está condicionado a la tirosina 888 de este receptor, ya que si este aminoácido es sustituido por un aminoácido no conservado estructuralmente, los macrófagos no producen dicha citocina (60). Del mismo modo, la activación de las vías de señalización de TLR9 en linfocitos T reguladores disminuye la producción de la citocina inmunosupresora IL-10 (13).

Lo anterior nos indica que, en general, el reconocimiento de ADN a través de TLR9 favorece la expresión de citocinas proinflamatorias y disminuye la expresión de citocinas antiinflamatorias.

En el contexto de una infección por VPH16, existe evidencia de que E6 y E7 inhiben la expresión de TLR9 a nivel del promotor de manera temporal (5). Del mismo modo, Daud y colaboradores reportaron que las mujeres que no eliminan una infección por VPH16 en un periodo de cuatro meses tienen niveles de expresión de TLR9 menores que las mujeres que si eliminan la infección, en el mismo periodo de tiempo. Sin embargo, se ha reportado que, a largo plazo, la expresión de TLR9 aumenta en infecciones persistentes (periodo de ocho meses) y en células tumorales de cáncer cervical (62-66). Además, existe evidencia de que la expresión de TLR9 aumenta en PBMCs de pacientes con cáncer hepatocelular y en suero de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC; "Non small cell lung cancer") (67, 68).

En el estudio de Daud, se reporta también que los niveles basales de expresión de TLR9 (antes de la detección de VPH16) en cérvix son más altos en mujeres que no eliminan la infección por VPH16 en comparación con los niveles de expresión de TLR9 en mujeres que si eliminaron la infección en el mismo lapso de tiempo, por lo que los autores sugieren que es posible que existan factores genéticos relacionados con la expresión de TLR9 (polimorfismos, por ejemplo), involucrados en la susceptibilidad de tener infecciones persistentes con VPH16 (69).

Polimorfismos de un solo nucleótido de TLR9

Lazarus y colaboradores (2003) identificaron 20 SNPs en el gen de TLR9 por secuenciación directa de 70 muestras; 4 de estos polimorfismos (-1486T/C,-1237 T/C, G1174A y 2848G/A) se presentaron en una frecuencia mayor al 10% en tres grupos étnicos de E.U. (Afroamericano, Europeo e Hispano) (70).

En cuanto al papel funcional y de asociación de estos SNPs, se ha reportado lo siguiente:

- Un análisis *in silico* mostró que el alelo C en el locus -1486 del promotor de TLR9 genera un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 (71). Por otra parte, la proteína E6 se asocia con el factor de transcripción Sp1 regulando la transcripción del gen de TGF-β (42).
- El alelo C en la posición -1237 del promotor de TLR9 genera un sitio de unión para el factor de transcripción NF-κB (4, 72). La unión de NF-κB a este sitio forma parte de un complejo que incluye a la histona deacetilasa HDAC1 y a la demetilasa JARID1B (4). HDAC1 y JARID1B son proteínas que llevan a cabo la deacetilación y demetilación de histonas respectivamente; estos cambios epigenéticos están asociados con la condensación de la cromatina y en consecuencia con la represión de la transcripción.
- Los SNPs -1486 T/C y 2848G/A están asociados con CaCU en población china y polaca (73, 74).

Justificación

El cáncer cérvico uterino es un problema de salud en México y aunque es una enfermedad prevenible si se detecta a tiempo, las altas tasas de mortalidad no han disminuido. El factor etiológico del cáncer cérvico uterino es el VPH, un virus que en determinadas condiciones, evade la respuesta inmune favoreciendo su persistencia viral y la progresión hacia lesiones de bajo grado, de alto grado y finalmente cáncer invasor.

TLR9 es un receptor que reconoce ADN de tipo viral y bacteriano (entre otros) y dicho reconocimiento inicia una cascada de señalización que induce la expresión de TNF- α y otras citocinas proinflamatorias importantes para la eliminación del virus. Sin embargo, las proteínas virales E6 y E7 de VPH regulan negativamente la expresión de TLR9 de manera dependiente de variaciones genéticas en el promotor de TLR9, lo cual explicaría, en cierta medida, la evasión de la respuesta inmune y la persistencia viral.

Por lo que es importante conocer la expresión de TLR9 durante el curso de la progresión a CaCU así como la identificación de SNPs de riesgo para la infección por VPH, LEI y CaCU, con el fin de identificar posibles marcadores de susceptibilidad para esta enfermedad.

Preguntas de investigación

¿Existe una asociación entre los SNPs -1486 T/C, -1237 T/C y 2848G/A de TLR9 con lesión escamosa intraepitelial y cáncer cérvico uterino?

¿Existe una asociación entre los SNPs -1486 T/C, -1237 T/C y 2848G/A de TLR9 con la expresión de TLR9, TNF e IL-10?

Hipótesis

Existe una asociación entre los polimorfismos de un sólo nucleótido -1486 T/C, -1237 T/C y 2848G/A de TLR9 con los niveles de expresión de TLR9, TNF e IL-10 en lesión escamosa intraepitelial (bajo y alto grado) y cáncer cérvico uterino.

Objetivo general

Evaluar la asociación de los polimorfismos de TLR9 con la expresión de TLR9, TNF e IL-10 en lesión escamosa intraepitelial (bajo y alto grado) y cáncer cérvico uterino.

Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos de un sólo nucleótido -1486 T/C, -1237 T/C y 2848G/A de TLR9 a partir de muestras de ADN de sangre periférica de mujeres sin infección por VPH, de pacientes positivas para VPH sin lesión escamosa intraepitelial, con diagnóstico de lesión escamosa intraepitelial y con cáncer cérvico uterino.
- Evaluar la asociación de los polimorfismos de un solo nucleótido -1486 T/C, -1237 T/C y 2848G/A del promotor de TLR9 con el diagnóstico en los grupos de estudio.
- 3. Evaluar los niveles de expresión de TLR9, TNF e IL-10 a partir de ARN total obtenido de sangre periférica de de mujeres sin infección por VPH, de pacientes positivas para VPH sin lesión escamosa intraepitelial, con diagnóstico de lesión escamosa intraepitelial y con cáncer cérvico uterino.
- 4. Evaluar la asociación de los niveles de expresión de TLR9, TNF e IL-10 con el diagnóstico de infección por VPH sin lesión intraepitelial escamosa, con diagnóstico de lesión escamosa intraepitelial y con cáncer cérvico uterino.
- 5. Evaluar la distribución de la expresión de TLR9 estratificada por el genotipo de los polimorfismos asociados significativamente con la variable de diagnóstico.
- 6. Evaluar los niveles de TLR9 séricos en mujeres sin infección por VPH y con diagnóstico de cáncer cérvico uterino.

Metodología

Banco de muestras

Este proyecto tiene un diseño de estudio transversal y se llevó a cabo a partir de muestras del banco de biológicos formado para el proyecto "Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical" el cual cuenta con la aprobación de las comisiones de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Salud Pública y del Instituto Nacional de Cancerología (Proyecto CI: 814; folio J16) (Anexo V).

Para la formación de este banco se invitó a participar a mujeres que asistieron a consulta ginecológica en el Centro de Atención para la Mujer de los Servicios de Salud del Estado de Morelos (CAPASAM) en el periodo comprendido entre junio de 2008 y noviembre de 2010 y a consulta ginecológica en el Servicio de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) en el periodo comprendido entre septiembre de 2010 y diciembre de 2011. El diagnóstico colposcópico, citológico e histopatológico de cada participante fue proporcionado por la Unidad de Patología del CAPASAM e INCAN.

A las mujeres que aceptaron participar se les solicitó firmar la carta de consentimiento informado (Anexo I), responder a un cuestionario que realizó el profesional encargado de la toma de muestra (Anexo II) y permitir la toma de una muestra sanguínea por el profesional especializado encargado.

Criterios de inclusión:

- Mujer que acudió a consulta a CAPASAM durante el periodo de junio 2008 a noviembre 2010.
- Mujer que acudió a la Unidad de Ginecología del INCan durante el periodo de septiembre de 2010 a diciembre de 2011.
- Diagnóstico citológico, colposcópico e histopatológico.
- Información completa en cuestionario.
- Consentimiento informado firmado donde se autorice la toma de muestra sanguínea.
- Antecedente de historia familiar con tres generaciones nacidas en México.
- Edad: mujer mayor de 18 años.
- No haber iniciado ningún tipo de tratamiento.

Criterios de exclusión:

- Padecer de enfermedad autoinmune
- Co-infección de transmisión sexual al momento de la toma de muestra

La población de estudio para este trabajo estuvo constituida por 553 muestras de mujeres de 21 a 70 años, de las cuales se contaba con muestras de ADN y ARN de sangre periférica. Los grupos evaluados fueron: Sin lesión escamosa intraepitelial, negativas para la infección por VPH (SL VPH^{neg}; n=56); Sin lesión escamosa

intraepitelial, positiva para infección por VPH (SL VPH⁺; n=131); con Lesión Escamosa Intraepitelial positiva para la infección por VPH (LEI; n=194) y con cáncer cérvico uterino positiva para VPH (CaCU; n=172).

El Procedimiento de llenado de cuestionario y captura de datos, de toma, de transporte y de almacenamiento de las muestras, así como la detección y tipificación de VPH y la obtención de suero y la extracción de ADN y ARN de PBMCs se detalla en el anexo III.

Criterios de selección de SNPs del gen de TLR9

Los SNPs en el gen de TLR9 fueron seleccionados de la "dbSNP database" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) de acuerdo con los siguientes criterios: 1) SNPs validados por el proyecto de los 1000 genomas; 2) SNPs con una frecuencia del alelo menor (MAF por sus siglas en inglés; "Minor Allele Frequency") \geq 10%; 3) SNPs que participen en la regulación de la transcripción de TLR9 o 4) que se cuente con reportes previos de su asociación con CC en otras poblaciones. Los tres SNPs seleccionados fueron el SNP -1486T/C, -1237T/C y 2848G/A.

Genotipificación de SNPs del gen de TLR9

La genotipificación (75) fue realizada con ADN genómico obtenido de PBMCs utilizando sondas TaqMan prediseñadas (Thermo Fisher Scientific): -1486T/C (rs187084, assay c_230195_10); -1237T/C (rs5743836, assay c_32645383), and 2848G/A (rs352140, assay C_2301954_20) (Anexo IV). Se corrieron las reacciones de PCR tiempo real en el equipo StepOnePlus[™] en placas de 96 pozos. Las reacciones de PCR se prepararon con 5 µl de TaqMan Genotyping MasterMix 2X, 0.5 µl del ensayo 20X, 20 ng de ADN y agua para un volumen final de 10 µl.

Medición de los niveles de ARN mensajero de TLR9, TNF e IL-10 de PBMCs

Inicialmente se validaron los ensayos de expresión génica mediante una curva de amplificación con diluciones seriales de ADNc para cada gen de estudio, con el fin de comprobar que la eficiencia de amplificación fuera igual o cercana al 100% (Eficiencia [E]=100%±10). Para la evaluación de la expresión del mensajero de TLR9, se utilizaron sondas TaqMan de Life Technologies (Hs00152973_m1, Hs99999043_m1 y Hs00961622_m1 respectivamente) (Anexo IV) y se corrieron por *PCR tiempo real* (76) en el equipo Viia7 Real Time PCR System de Applied Biosystems en placas de 384 pozos.

Las reacciones de PCR se prepararon con 10µl de Master Mix 2X, 1 µl de ensayo 20X, 1 µl de ADNc (dilución 1:10 de ADNc sintetizado a partir de 1µg de RNA) y 7 µl de agua. Para la cuantificación relativa de la expresión génica se utilizó como gen endógeno el gen HPRT (del inglés "Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase"). La expresión relativa se evaluó por duplicado para cada muestra. El cálculo de las unidades relativas de expresión (URE) se realizó con el método 2^{-ΔCt}(77)

Se realizó la determinación de la expresión del mensajero de TNF-α (Hs99999043_m1) e IL-10 (Hs00961622_m1), con la misma metodología descrita para la evaluación de la expresión de TLR9.

Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

Los ensayos de ELISA para TLR9 (Cloud-Clone Corp; Cat. SEA709Hu) y TNF- α (R&D systems; Cat. HSTA00D) se realizaron conforme a las instrucciones del fabricante. Para evaluar los niveles de TLR9 y TNF- α en suero se seleccionaron, al azar, 20 muestras de mujeres sin lesión negativas para la infección por VPH (control) y 20 muestras de pacientes con CaCU mediante el programa Stata/SE ver. 14 (STATA, Inc., College Station, TX, USA).

Para la evaluación de TLR9 se adicionaron 100µl de suero (por duplicado) a cada pozo de la placa de de 96 pozos de ELISA (precubierta con un anticuerpo específico para TLR9) y se incubó por 2 horas a 37 °C. Terminada la incubación, se desechó el suero, se adicionaron 100 µl del reactivo de detección A (solución con el anticuerpo conjugado con biotina específico para TLR9) y se incubó la placa durante 1 hora a 37 °C. Se desechó la solución y se lavó con solución de lavado 3 veces. Posteriormente se adicionaron 100 µl del reactivo de detección B (solución de avidina conjugada con peroxidasa de rábano) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Se desechó la solución y se lavó la placa con solución de lavado 5 veces. Se adicionaron 90 µl de solución de sustrato TMB (sustrato cromogénico, $3,3^{-},5,5^{-}$ tetramentylbenzidine) y se incubó 10 minutos a 37 °C. Finalmente se adicionaron 50 µl de solución de paro (ácido sulfúrico 2N) y se leyó la placa a 450 nm.

Para la detección de TNF- α en suero, inicialmente se adicionaron 50 µl del diluyente RD1F (solución tampón de base proteica) a todos los pozos de la placa. Posteriormente se adicionaron 200 µl de las muestras y se incubó la placa durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavó la placa con buffer de lavado (solución tamponada de surfactante) 6 veces, se adicionaron 200 µl del conjugado TNF- α -HS (human TNF- α in serum) y se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Terminada la incubación, se lavó la placa 6 veces con solución de lavado, se adicionaron 50 µl de la solución de sustrato (solución de NADPH con estabilizadores) y se incubó la placa durante 3 horas a durante una hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se lavó la placa (ácido sulfúrico 2N) y después de 30 minutos se leyó la placa a 490 y 690 nm.

En ambos casos se prepararon las curvas de concentración estándar y se incluyeron dos controles negativos.

Análisis Estadístico

Las diferencias en la distribución de las variables descriptivas en la población de estudio fueron evaluadas utilizando la prueba de Chi cuadrada. Las variables continuas fueron expresadas como promedios ± desviación estándar y las variables categóricas fueron expresadas como porcentajes del total. Las diferencias en los valores de las medianas de las URE de TLR9 en el grupo de pacientes SL VPH⁺, LEI y CaCU fueron evaluadas con la prueba de Kruskall-Wallis, utilizando los valores de URE de TLR9 en el grupo SL VPH^{neg} como grupo de referencia.

Los terciles de expresión relativa de TLR9, TNF-α e IL-10 fueron estratificados en toda la población de estudio; los análisis de asociación de los niveles de expresión relativa baja, media y alta con los grupos SL VPH⁺, LEI y CaCU fueron evaluados mediante modelos de regresión logística multinomial.

Las diferencias entre la mediana de expresión de las URE de TLR9 por grupos de estudio o genotipos, se evaluaron mediante la prueba de Kruskall-Wallis.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (valor de p) y el coeficiente de correlación de desequilibrio de ligamiento (LD) fueron calculados utilizando el programa SNPSTATS (<u>http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats</u>). La asociación de los genotipos en el locus - 1486 del gen de TLR9 fue evaluada mediante modelos de regresión logística multinomial bajo tres modelos de herencia genética: modelo dominante, codominante y recesivo, se evaluó la asociación con LEI y CACU.

Todos los modelos fueron ajustados por edad, paridad (definido como el número de partos de cada mujer en la población de estudio) y el índice de masa corporal (IMC). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Stata/SE ver. 14 (STATA, Inc., College Station, TX, USA). Se consideró como valor de p estadísticamente significativo un valor <0.05, el cual se corrigió mediante el método de Bonferroni para comparaciones múltiples en los modelos de asociación (0.05/6=0.008).

Consideraciones éticas y de bioseguridad

El presente trabajo parte del estudio titulado "Polimorfismos de la región reguladora del gen de IL-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical", el cual, fue aprobado por las comisiones de investigación, ética y bioseguridad del INSP. Así mismo, se cuenta con el consentimiento informado firmado de cada mujer cuya muestra será utilizada para este proyecto.

Resultados

Características generales de la población de estudio

En la tabla 1 se muestran las características generales de la población de estudio. El banco de muestras estuvo constituido por muestras de mujeres VPH negativas sin lesión intraepitelial escamosa (SL VPH^{neg}); pacientes VPH positivos sin lesión intraepitelial escamosa (SL VPH⁺); pacientes VPH positivos con lesión intraepitelial escamosa (LEI) y pacientes VPH positivos con cáncer cérvico uterino (CaCU).

Tabla 1. (Característica	as generales	de la poblac	ción de estudi	0
Variable	SL VPH ⁻	SL VPH ⁺	LEI	CaCU	Valor de p
	(n=56)	(n=131)	(n=194)	(n=172)	
Edad± DS *	37.27 ±11.02	36.13±11.75	35.39±10.84	50.85± 13.07	0.0001 ^e
(min-max)	(18-68)	(19-70)	(18-72)	(22-86)	
IMC*	24.74± 5.02	24.82±4.13	25.77±3.99	26.66±5.11	0.0002 ^ª
Edad de inicio de vida sexual activa (años)*	20.14±3.55	20.01±3.91	17.92±3.12	17.5±2.96	0.0001 ^ª
Número de parejas sexuales*	2.34±2.47	2.92±3.96	2.46±3.138	2.12± 1.43	0.88ª
Gestaciones*	1.78±2.03	1.67±1.86	3.27±2.35	4.66±2.92	0.0001 ^e
Uso de condón (%)	18.52	45.68	28.4	7.41	0.0001 ^b

VPH, Virus de Papiloma Humano; SL, Sin lesión; LEI, Lesión escamosa intraepitelial; CaCU, Cáncer cérvico uterino; Índice de masa corporal, IMC; *Promedio.Valores en negritas denotan significancia estadística (P<0.05).^a Prueba de Kruskal-Wallis.^b

Como se observa en la tabla 1, el grupo de mujeres con CaCU tiene, en promedio, una edad, un IMC y un número de gestaciones significativamente mayor que el grupo control (SL VPH^{neg}). Por el contrario, la edad promedio de inicio de vida sexual y el porcentaje de uso de condón (reportado como: uso si o no) fueron significativamente menores en el grupo con CaCU respecto al grupo SL VPH^{neg}.

Tabla 2. Prevalen	cia de VP	'H en los g	(rupos de	estudio
	SL VPH⁻ (n=56)	SL VPH ⁺ (n=131)	LEI (n=194)	CaCU (n=172)
VPH de alto riesgo (%)	-	88.79	91.03	100
VPH16 y VPH18 (%)	-	64.49	63.46	98.26
VPH, Virus de Papiloma Humar	no; SL, Sin lesió	ón; LEI, Lesión e	scamosa intraej	pitelial; CaCU,
Cáncer cérvico uterino.				

En cuanto a la prevalencia de VPH en la población de estudio, encontramos que el 88.79%, el 91.03 % y el 100% de las muestras fueron positivas para VPH de alto riesgo en el grupo de pacientes VPH⁺ sin lesión, con LEI y con CaCU y que la proporción de mujeres que fueron positivas para VPH16 y VHP18 fue de 64.49, 63.46 y 98.26 en los grupos SL VPH⁺, LEI y CaCU respectivamente (Tabla 2).

Evaluación de la expresión de TLR9 en PBMCs con la infección por VPH, LEI y CaCU.

Posteriormente se evaluó la expresión relativa de TLR9, normalizada con la expresión del endógeno HPRT (Hipoxantina guanina ribosil transferasa) en PBMCs y se graficó estratificándola por grupo de estudio (Figura 2).



Figura 2. La expresión de TLR9 aumenta en el grupo de LEI y CaCU respecto al grupo control (SL VPH⁻). Las unidades relativas de expresión (URE) de TLR9 en PMBCs se calcularon respecto a la expresión del gen endógeno HPRT1 (Hipoxantina-guanina Fosforibosiltransferasa). Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas (prueba de Kruskall-Wallis) en la expresión de TLR9 en LEI (p=0.0001) y en CaCU respecto al grupo control, SL VPH⁻ (p=0.0003).

Los resultados mostraron que existe un incremento significativo en la expresión de TLR9 en PBMCs de pacientes con LEI y CaCU, respecto al grupo control (p=0.0003). Al evaluar la asociación de los niveles de expresión de TLR9, estratificados por terciles de expresión, con la infección por VPH, LEI y CaCU mediante modelos de regresión lineal, se encontró que el tercil más alto de expresión de TLR9 se asocia significativamente con LEI (OR=6.04; IC 95% 1.89-19.02) y con CaCU (OR= 4.60; IC 95% 1.38-15.38) (Tabla 3).

Tabla 3. Anal	isis de asociación en	tre los niveles	de ext	presion de TLR9 y	/ la infe	eccion por VPH, I	LEIY
		C	CaCU				
	VPH-/VPH+/LEI/CaCU	SL VPH+		LEI		CaCU	
PBMC (n=553)	n=56/131/194/172						
			Valor		Valor		Valor
URE		OR (95% CI) ^a	de p	OR (95% CI) ^a	de p	OR (95% CI) ^a	de p
TLR9							
<0.0342	20/41/52/42	1		1		1	
0.0342-0.183	19/26/53/57	0.59(0 .26-1.34)	0.211	0.90 (0.41-1.97)	0.792	1.33(0.58-3.02)	0.498
>0.183	4/29/76/45	3.15(0.96-10.35)	0.058	6.04 (1.89-19.32)	0.002	4.60 (1.38-15.38)	0.013

^aAjustado por edad, gestaciones e IMC.URE Unidades Relativas de Expresión .Valores en negritas denotan valores de p estadísticamente significativos (P<0.05)

Evaluación de la asociación del polimorfismo -1486T/C (rs187084) con

la infección por VPH, con LEI y CaCU.

Para llevar a cabo el análisis de asociación de SNPs de TLR9 con la infección por VPH, LEI y CaCU, inicialmente se seleccionaron los SNPs en el gen de TLR9 de acuerdo a los criterios de selección especificados en la metodología. Los SNPs seleccionados fueron el -1486T/C (rs187084); -1237T/C (rs5743836), y 2848G/A (rs352140). La distribución genotípica los SNPs estudiados se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg, de acuerdo con el análisis realizado en SNPstats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats), con una p=0.32 para el SNP -1486T/C; de p=0.27 para el SNP -1237 T/C y de p=0.86 para el SNP 2848G/A en toda la población de estudio. Adicionalmente, se evaluó el equilibrio de ligamiento entre los tres SNPs y se encontró que los SNPs -1486T/C y 2848G/A se encuentran en desequilibrio de ligamiento (coeficiente de correlación r²= 0.88), por lo que el análisis de asociación se llevó a cabo con los SNPs -1486T/C y -1237T/C.

Para la evaluación de la asociación de estos SNPs con los diferentes grupos de estudio, en 3 modelos de herencia, se llevaron a cabo análisis estadísticos por modelos de regresión logística multinomial, utilizando como grupo de referencia el genotipo homocigoto ancestral (Ensembl 83 Release). Con base en este análisis, encontramos una asociación estadísticamente significativa únicamente con el SNP -1486T/C (Tabla 4).

										·	
			u	(%)							
Modelo	Genotipo	SL VPH-	+HdVJS	EI	CaCU	SL VPH+		EI		CaCU	
		n=56	n=131	n= 194	n=172	0R (95% CI) ^a	valor de p	0R (95% CI) ^a	valor de p	0R (95% CI) ^a	valor de p
	c/c	18 (32.14)	27(27.27)	40(22.22)	39(23.78)	1		1		1	
Codominante	1/C	31 (55.36)	42 (42.42)	88(48.89)	77(46.95)	0.98 (0.45-2.10)	0.95	1.61 (0.76-3.38)	0.21	1.71(0.77-3.76)	0.185
	1/1	7 (12.5)	30(30.30)	52(28.89)	48(29.27)	3.21(1.10-9.35)	0.032	4.34(1.52-12.41)	0.006	5.96(1.99-17.86)	0.001
Dominanto	c/c	18(32.14)	27(27.27)	40(22.22)	39(23.78)	Ļ		1		Ħ	
	1/С+П	38(67.86)	72(72.73)	140(77.78)	125(76.22)	1.36 (0.66-2.82)	0.404	2.07 (1.02-4.23)	0.04	2.42 (1.14-5.15)	0.02
Decocium	c/c+1/c	49(87.5)	(01.69)69	128(71.11)	116(70.73)	1		1		1	
Michanan	1/1	7(12.5)	30(30.30)	52(28.89)	48(29.27)	3.26(1.25-8.50)	0.016	3.16(1.24-8.01)	0.016	4.18 (1.59-10.99)	0.003
	C (0.49)	67 (59.82)	96(48.48)	168(46.67)	155(47.26)	1		1		Ļ	
	T (0.51)	45(40.18)	102(51.52)	192(53.33)	173(52.74)	1.65(1.02-2.68)	0.042	1.90 (1.19-3.00)	0.006	2.25(1.38-3.68)	0.001
Se utilizó el gru	po SL VPHne	g como grupo	o control, n=5	6; SL, Sin lesid	in; LEI, Lesión e	escamosa intraepitelial;	cacu, cá	incer cérvico uterino; 01	R, Odds R	atio; CI, Intervalo de co	onfianza.
Valores en negri	itas denotan t	un valor de pa	significativo. ^a /	Ajustado por ec	dad, gestacione	s e IMC. Valores en negi	itas denot	an valores de p significa	ativos (p<	0.05)	

Tabla 4. Análisis de asociación del SNP -1486T/C (rs187084) con la infección por VPH. LEI v CaCU

El análisis estadístico mostró que el genotipo TT se asocia con 4.34 veces más posibilidades de tener LEI (IC 95% 1.52-12.41; p=0.006) en comparación con las mujeres negativas para la infección por VPH sin lesión escamosa intraepitelial. De igual manera, el genotipo TT se asocia con 5.96 veces más posibilidades de tener CaCU (IC 95% 1.99-17.86; p=0.001) bajo el modelo codominante y el modelo recesivo (IC 95% 1.59-10.99; p=0.003).

Evaluación de la expresión de TLR9 por genotipo en el locus -1486 del promotor de TLR9 en la infección por VPH, LEI y CC.

Con el fin de evaluar si existen diferencias en la distribución de la expresión relativa de TLR9 por genotipo (CC, TC y TT) en el locus -1486 del promotor de TLR9 en cada grupo de estudio, se realizó un análisis de Kruskall-Wallis (Figura 3).

Este análisis mostró que no existen diferencias significativas en la expresión de TLR9 por genotipo en el locus -1486 del gen de TLR9 en PBMCs de pacientes con infección por VPH, con LEI o con CaCU.



Figura 3. Expresión relativa de TLR9 por genotipo en el locus -1486T/C del promotor de TLR9 en PBMCs de a) grupo control (SL VPH^{neg}), b) pacientes con infección por VPH sin lesión intraepitelial (SL VPH⁺), c) con lesión escamosa intraepitelial (LEI) y d) con cáncer cérvico uterino (CaCU). Las unidades relativas de expresión (URE) de TLR9 se calcularon respecto a la expresión del gen endógeno HPRT1 (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa). La grafica representa la mediana y el rango intercuartil de la expresión relativa de TLR9 en los grupos correspondientes.

Evaluación de los niveles de TLR9 en suero de pacientes con CaCU

Adicionalmente se evaluaron los niveles de TLR9 en suero de 20 muestras de mujeres sin lesión negativas para la infección por VPH (SL VPH^{neg}) y 20 muestras de mujeres con cáncer cérvico uterino mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Las muestras a incluir en este ensayo se seleccionaron aleatoriamente mediante el programa Stata/SE ver. 14 (STATA, Inc., College Station, TX, USA) y los niveles de TLR9 se evaluaron por duplicado. Los resultados obtenidos muestran que la concentración de TLR9 en suero es mayor en las pacientes con CaCU respecto a la concentración de TLR9 en el del grupo control (p=0.0135) (Figura 4).



Figura 4. Los niveles proteicos de TLR9 aumentan significativamente en suero de pacientes con cáncer cérvico uterino respecto al grupo control (SL VPH^{neg}). Se evaluaron los niveles de TLR9 en suero en 20 muestras seleccionadas aleatoriamente obtenidas a partir de sangre periférica de mujeres negativas para VPH, sin lesión cervical intraepitelial (SL VPH^{neg}) y 20 muestras de pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCU). La gráfica representa la mediana y el rango intercuartil de la concentración de TLR9 (ng/ml) en los dos grupos de estudio. Las mediciones se realizaron por duplicado. Valor de p estadísticamente significativo (p=0.0135) por la prueba de U Mann Whitney.
Al evaluar la distribución de la concentración de TLR9 en suero estratificada por genotipo, observamos que la mediana de la concentración de TLR9 en suero es mayor en las mujeres portadoras del genotipo TT (n=9) en el locus -1486 de TLR9 (Figura 5), sin embargo estos resultados fueron estadísticamente no significativos.



Figura 5. Niveles de proteína de TLR9 en suero por genotipo. Los niveles de TLR9 en suero de 40 muestras se estratificaron por genotipo en el locus -1486 del promotor de TLR9 (genotipos CC, TC y TT). La gráfica representa la mediana y el rango intercuartil de los niveles de TLR9 (ng/ml) en suero. Las mediciones se realizaron por duplicado.

Evaluación de la expresión de TNF- α en PBMCs de pacientes con infección por VPH, LEI y CaCU.

Se evaluó la expresión relativa de la citocina proinflamatoria TNF-α en PBMCs del grupo SL VPH⁺, LEI y CaCU respecto al grupo SL VPH^{neg} (Figura 6).



Figura 6. La expresión de TNF- α en PBMCs aumenta en CaCU respecto al grupo con LEI. Las unidades relativas de expresión (URE) de TNF- α se calcularon respecto al nivel de expresión del gen endógeno HPRT1 (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa). El asterisco denota una diferencia estadísticamente significativa (p=0.001) por la prueba Kruskall-Wallis.

El análisis estadístico de regresión logística multinomial reveló que la expresión de TNF- α en PBMCs de pacientes con CaCU es significativamente mayor en comparación con la expresión de esta citocina en pacientes con LEI (Figura 6).

De acuerdo con estos resultados, la estratificación de la expresión de TNF- α por terciles de expresión en todos los grupos, mostró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión altos de TNF- α (>13 URE de TNF- α) y CaCU (OR=2.68; IC 95% 1.04-6.90) (Tabla 5).

rabia 5. Analisis de asociación entre los niveles de expresión de TNF y la									
infección por VPH, LEI y CaCU									
	SL VPH+ (n=131)		LEI (n=1	.94)	CaCU (n=172)				
PBMCs (n=553)									
URE	OR (95% CI) ^a	Valor de p	OR (95% CI) ^a	Valor de p	OR (95% CI) ^a	Valor de p			
TNF-α									
<2.79	1		1		1				
2.79-13	1.84 (0 .74-4.54)	0.19	1.23(0.52-2.89)	0.64	1.43(0.55-3.71)	0.464			
>13	1.05 (0.40-2.80)	0.92	1.27 (0.52-3.09)	0.60	2.68(1.04-6.90)	0.041			

Tabla 5. Análisis de asociación entre los niveles de expresión de TNF y la
infección por VPH, LEI v CaCU

^aAjustado por edad, gestaciones e IMC.URE Unidades Relativas de Expresión. Valores en negritas denotan valores de p estadísticamente significativos (p<0.05). Los OR fueron calculados respecto al grupo control SL VPH^{neg} (n=56).

Evaluación de TNF- α en suero de pacientes con CaCU.

Para evaluar si el incremento de la expresión de TNF- α correlaciona con los niveles de TNF- α en suero, se evaluaron los niveles de TNF- α en suero de 20 muestras de mujeres del grupo control (SL VPH^{neg}) y 20 muestras de mujeres con cáncer cérvico uterino (CaCU) mediante ELISA. Estas muestras fueron las mismas que se utilizaron para evaluar los niveles de TLR9 en suero. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de TNF-α es significativamente mayor en suero de pacientes con CaCU en comparación con los niveles de TNF- α en el grupo control (Figura 7).

Evaluación de la expresión de IL-10 en PBMCs de pacientes con infección por VPH, LEI y CaCU.

Posteriormente, se evaluó la expresión relativa de la citocina anti-inflamatoria IL-10 en PBMCs en todos los grupos de estudio. Los resultados mostraron que la expresión de IL-10 es mayor en los pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCU) en comparación con la expresión de esta citocina en el grupo SL VPH⁻ (Figura 8).



Figura 7. Los concentración de TNF- α sérica aumenta significativamente en pacientes con cáncer cérvico uterino (CaCU) respecto al grupo control (SL VPH-). Se evaluó la concentración de TNF- α en suero en 20 muestras seleccionadas aleatoriamente obtenidas a partir de sangre periférica. La gráfica representa la mediana y el rango intercuartil de la concentración de TNF- α (pg/ml) en los dos grupos de estudio. Las mediciones se realizaron por duplicado. Valor de p estadísticamente significativo (p=0.001) por la prueba de U Mann Whitney.



Figura 8. La expresión de IL-10 en PBMCs es mayor en CaCU respecto al grupo control (SL VPH). Las unidades relativas de expresión (URE) de IL-10 se calcularon respecto al nivel de expresión del gen endógeno HPRT1 (Hipoxantina-guanina Fosforibosiltransferasa). El asterisco denota una diferencia estadísticamente significativa (p=0.0001) en la prueba de Kruskal-Wallis.

En concordancia con estos resultados, el análisis de regresión logística realizado para evaluar la asociación entre los niveles de expresión de IL-10 (terciles de expresión) y la infección por VPH, LEI y CaCU mostró que el tercil de expresión más alto de expresión de IL-10 (>0.464 URE de IL-10) está asociado significativamente con CaCU (OR=7.52; IC 95% 2.83-19.96) (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de asociación entre los niveles de expresión de IL-10 y la									
infección por VPH, LEI y CaCU									
	SL VPH+ (n	=131)	LEI (n=1	.94)	CaCU (n=172)				
PBMCs (n=553)									
URE	OR (95% CI) ^a	Valor de p	OR (95% CI) ^a	Valor de p	OR (95% CI) ^a	Valor de p			
IL-10									
<0.152	1		1		1				
0.152-0.464	1.61(0.74-3.49)	0.23	1.04(0.49-2.20)	0.91	1.44 (0.54-3.83)	0.463			
>0.464	1.75(0.71-4.26)	0.22	0.87 (0.36-2.10)	0.75	7.52(2.83-19.96)	0.0001			

^aAjustado por edad, gestaciones e IMC. URE Unidades Relativas de Expresión. Valores en negritas denotan valores de p estadísticamente significativos (p<0.05). Los OR fueron calculados respecto al grupo control SL VPH^{neg} (n=56).

Discusión

Los resultados más relevantes de nuestro estudio fueron que los niveles altos de expresión de TLR9 en PBMCs están asociados significativamente con LEI y CaCU, Por otra parte, encontramos que el genotipo TT en el locus -1486 del gen de TLR9 podría ser un factor genético de susceptibilidad para LEI y CaCU.

TLR9 es un receptor muy importante para el reconocimiento de ácidos nucleicos de patógenos; más aún, trabajos recientes han mostrado que TLR9 está involucrado en el proceso de transformación celular; en 2008, el 23% de los nuevos casos de cáncer fueron atribuidos a agentes infecciosos (78). Interesantemente, virus oncogénicos de ADNc como el poliomavirus de célula Merkel, el virus de Epstein-Barr, el virus de Hepatitis B y el VPH modulan la expresión de TLR9 (3, 79-81).

Hasan y colaboradores mostraron que VPH16 y VPH18 inhiben la expresión de TLR9 mediante diferentes mecanismos en queratinocitos (82, 83). Sin embargo, otros

estudios han reportado que la expresión de TLR9 se incrementa en muestras cervicales de mujeres con infecciones persistentes, LEI y CaCU (63, 64, 66, 84, 85), lo que indica que TLR9 se incrementa, probablemente como resultado del estrés celular. Adicionalmente, la expresión de TLR9 aumenta en células tumorales de otros tipos de cáncer como cáncer de mama, de ovario, esofágico, de próstata, en el suero de pacientes con cáncer de célula no pequeña de pulmón y en PBMCs de pacientes con cáncer hepático (67, 68, 86-88).

En el presente estudio mostramos que el nivel de expresión de TLR9 es mayor en pacientes con LEI y con CaCU en comparación con el grupo control. De manera importante, encontramos que el tercil más alto de expresión de TLR9 incrementa 6.04 y 4.6 veces las posibilidades de tener LEI y CaCU respectivamente.

Adicionalmente, los resultados obtenidos mostraron que los niveles de TLR9 aumentan en suero de pacientes con CaCU respecto a las mujeres no infectadas y sin lesión.

Aunque se desconoce el papel de TLR9 en suero, este fenómeno podría estar relacionado con la presencia de ADN circulante libre de células (ADN_{cf}, por sus siglas en el inglés) en periferia de pacientes con cáncer, en particular, con la presencia de ADN_{cf} de VPH en pacientes con cáncer cérvico uterino, como han mostrado varios trabajos (89-93). La detección de ADN de VPH en estos estudios varía del 12 al 50% de los pacientes en los que se evaluó la presencia de cfADN. Relevantemente, Yang y colaboradores mostraron que el cfADN de HPV16 puede ser detectado en 50% de los pacientes con CaCU, en 33.3% de los pacientes con lesiones escamosas de alto grado, 20% de los pacientes con lesiones escamosas de bajo grado y 13.5% de donadores sin lesión (90).

La asociación de SNPs con el cáncer es una estrategia que permite identificar probables genotipos de riesgo para diferentes enfermedades, en este caso asociados con CaCU. El análisis de regresión logística realizado para evaluar la asociación de tres SNPs de TLR9 mostró una asociación estadísticamente significativa con el SNP - 1486T/C. En contraste con estudios previos en población china y polaca, en donde se

encontró que el genotipo CC en el locus -1486 del promotor de TLR9 es un genotipo de riesgo para CaCU (73, 74), nuestros resultados mostraron que el genotipo TT en el mismo locus, es un genotipo de riesgo para CaCU en población mexicana.

Estas diferencias pueden deberse a diferencias en la distribución de las frecuencias genotípicas entre las poblaciones. Esto es, los genotipos CC, TC y TT tuvieron una frecuencia genotípica de 0.15, 0.50 y 0.35 en el estudio de Chen y colaboradores (población china); mientras que Roszak y colaboradores reportaron una frecuencia genotípica de 0.14, 0.44 y 0.42. Por otra parte, las frecuencias genotípicas reportadas en este trabajo fueron de 0.32, 0.55 y 0.125, lo que nos indica que estas frecuencias genotípicas se distribuyen de manera inversa entre la población china y polaca con respecto a la muestra de la población mexicana evaluada en este estudio. En este sentido, nuestros resultados correlacionan con los datos reportados en el proyecto HapMap (HapMap MXL data (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/) en donde las frecuencias reportadas para los genotipos CC, CT y TT en el locus -1486 de TLR9 son de 0.26, 0.52 and 0.22 respectivamente (población de Los Angeles, USA, con ancestría mexicana). Adicionalmente, nuestros resultados son consistentes en el sentido de que existe una fuerte asociación entre el genotipo TT con LEI y CaCU.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la variante C en la posición -1486 del gen de TLR9, genera un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 (71), el cual puede activar o reprimir la transcripción de varios genes dependiendo de su asociación con otros factores. Por lo que un posible mecanismo de regulación involucraría la unión de Sp1 al alelo C en el locus -1486 del promotor de TLR9, funcionando como un represor de la transcripción, ya sea de manera independiente o en asociación con otros miembros de la familia de Sp1 como Sp3, el cual a su vez, se asocia con deacetilasas de histonas (94, 95). Más estudios son necesarios para evaluar el probable papel de Sp1 (u otros factores de transcripción) en la regulación de TLR9 durante la infección por VPH y la progresión a CaCU.

Aunado a la expresión de TLR9, se evaluó la expresión de la citocina TNF- α e IL-10 en PBMCs debido a su posible potencial como biomarcadores de la progresión hacia

43

cáncer cérvico uterino. Los resultados mostraron que TNF- α aumenta en PBMCs de pacientes con CaCU y aunque estas diferencias son estadísticamente no significativas, se encontró que el tercil más alto de expresión de TNF- α está asociado significativamente con el aumento de 2.68 veces las posibilidades de tener CaCU. Comparativamente, otro estudio encontró que los niveles de TNF- α aumentan en raspados cervicales de mujeres con lesión intraepitelial escamosa de alto grado en comparación con la concentración de TNF- α en el grupo control (96).

De acuerdo con los resultados obtenidos en PBMCs, encontramos que los niveles de TNF- α en suero son significativamente mayores en los pacientes con CaCU en comparación con el nivel de TNF- α en suero de pacientes sanos. En este sentido, se ha reportado que niveles altos de TNF- α en suero (estratificados en dos categorías de concentración) en pacientes con CaCU, disminuyen la mediana de tiempo de sobrevida en 8.35 meses (periodo de seguimiento de 2 años) en comparación con los pacientes que tuvieron concentraciones bajas de TNF- α (97).

Paralelamente, los niveles de expresión de IL-10 son mayores en los pacientes con CaCU en comparación con los niveles de expresión de IL-10 en el grupo SL VPH^{neg}. No se realizó la evaluación de IL-10 en suero debido a que varios estudios en el laboratorio y de otros grupos han evidenciado que los niveles de IL-10 aumentan en suero de pacientes con LEI y con CaCU (97-99).

Nuestros resultados mostraron que el tercil más alto de expresión de IL-10 (IL-10>0.464 URE/HPRT) está asociado con un incremento de 7.52 veces las posibilidades de tener CaCU. En relación a esto, el estudio de Li y colaboradores mostró que concentraciones altas de IL-10 en suero (estratificados en dos categorías de concentración) antes del inicio de tratamiento, disminuyen, de manera estadísticamente significativa, la mediana de tiempo de sobrevida en 5.56 meses en comparación con los pacientes que tuvieron niveles bajos de IL-10 al momento de la medición (97).

En conclusión, los resultados muestran que la expresión de TNF e IL-10 se incrementa en periferia de pacientes con cáncer cérvico uterino, lo que ha sido

reportado en otros tipos de cáncer, como en el caso de la leucemia linfoblástica aguda o el cáncer hepatocelular (100, 101).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la expresión de TLR9 aumenta de manera estadísticamente significativa en PBMCs de mujeres con LEI y CaCU. Aunado a esto, encontramos que niveles altos de expresión de TLR9 en PBMCs, están asociados con el incremento de las posibilidades de tener LEI y CaCU, así como que la concentración de TLR9 en suero es mayor en las mujeres con CaCU. En conjunto, estas evidencias sugieren que TLR9 podría ser utilizado como un biomarcador de la progresión a cáncer cérvico uterino. Relevantemente, es la primera vez que se reporta la presencia de TLR9 en muestras de suero de pacientes con cáncer cérvico uterino.

En este estudio se muestra también que el genotipo TT en el locus -1486 de TLR9 está asociado significativamente con tener LEI y CaCU, por lo que este polimorfismo es un potencial marcador genético de susceptibilidad para la infección por VPH, LEI y CaCU.

Perspectivas

Las perspectivas de este trabajo son replicar el análisis de asociación del SNP -1486T/C con LEI y CaCU en una población mexicana diferente a la analizada en este estudio, con un número de muestra mayor al reportado en este trabajo. Así como evaluar los niveles séricos de TLR9 en pacientes con lesiones pre-malignas con el fin de determinar si existe una correlación entre el aumento de la expresión de TLR9 en PBMCs y los niveles de proteína en suero; lo que llevaría a proponer a TLR9 como un biomarcador de la progresión hacia CaCU.

Artículos enviados

TLR9 gen polymorphism -1486T/C (rs187084) is associated with uterine cervical neoplasm in Mexican female population

Martínez-Campos Cecilia¹, Bahena-Román Margarita¹, Torres-Poveda Kirvis^{1,2}, Burguete-García Ana I.^{1*} and Madrid-Marina Vicente^{1*}

¹Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México. (Chronic Infectious Diseases and Cancer Division. Center for Research on Infectious Diseases. National Institute of Public Health);

²CONACyT Research Fellow-Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, Mexico

*Corresponding authors:

E-mail: vmarina@insp.mx (VMM)

E-mail: aburguete@insp.mx (AIBG)

Abstract

TLR9 is a Toll-Like Receptor (TLR) that recognizes DNA from viruses and bacteria and in turn, induces the expression of proinflammatory cytokines, which are important for infection clearance. However, there is evidence that Human Papillomavirus (HPV)-16 viral oncoproteins E6 and E7 inhibit TLR9 expression through regulatory elements in the TLR9 promoter. Based on this, we hypothesized that appropriate recognition of viral DNA through TLR9 does not occur in some genetically susceptible women and that these genetic variants could contribute to the risk of developing uterine cervical neoplasms. We genotyped Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in the TLR9 gene (-1486 T/C, -1237T/C and 2848G/A) in a cross-sectional study and evaluated its association with HPV infection (n = 131), Squamous Intraepithelial Cervical Lesion (SICL) (n = 194), and uterine cervical neoplasms (n = 172) in comparison with healthy controls (n = 56) in Mexican female population. Moreover, TLR9 expression was analyzed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) by Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in all study groups. Multinomial logistic regression analysis revealed that genotype TT in TLR9 -1486 locus is significantly associated with HPV infection (Odds Ratio [OR] = 3.21; 95% Confidence Interval [CI], 1.10–9.35), with SICL (OR = 4.34; 95% CI, 1.52–12.41), and with uterine cervical neoplasms (OR = 5.96; 95% CI, 1.99-17.86). Furthermore, analyses revealed that high expression levels of TLR9 in PBMCs were significantly associated with SICL (OR = 6.04; 95% CI, 1.89–19.32) and uterine cervical neoplasms (OR = 4.60; 95% CI, 1.38–15.38). Our findings indicate that genotype TT -1486 locus of the TLR9 gen comprises a risk genotype for uterine cervical neoplasms in Mexican females population and that high expression levels of TLR9 in PBMCs were significantly associated with SICL and uterine cervical neoplasms, which could be employed as a prognostic marker in the future.

Introduction

TLR9 is a Toll-Like Receptor (TLR) that recognizes DNA and DNA/RNA hybrids from viruses and bacteria that is a critical receptor in pathogen recognition, as well as in the innate and adaptive response (102, 103). TLR9 is expressed not only in immune system cells such as dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and T and B lymphocytes, but also in intestinal epithelium and keratinocytes. Recognition of pathogen DNA through TLR9 induces the activation of transcription factors such as Nuclear Factor kappa beta

(NF κ B), Activator Protein 1 (AP1), and Interferon Regulatory Factor (IRF) (104). These transcription factors, in turn, lead to the expression of proinflammatory cytokines such as Interleukin (IL)-1, IL-8, IL-6, and Tumor Necrosis Factor (TNF), and diminish the expression of immunosuppressive cytokines such as IL-10 and Transforming Growth Factor beta 1 (TGFB1) (105). Additionally, TLR9 signals induce the expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) II and co-stimulatory molecules such as CD40, CD80, and CD86 that, taken together, induce the recruitment of immune cells to the site of infection and induce the expression of other cytokines to generate an adaptive response in order to eliminate the infection.

However, viruses have developed diverse strategies to evade the immune response, and recently, it has been demonstrated that several DNA viruses inhibit TLR9 expression. Specifically, Human Papillomavirus (HPV), the etiological factor of uterine cervical neoplasms, impairs TLR9 expression during infection by mechanisms involving E6 and E7 viral oncoproteins (82). *In vitro* experiments demonstrated that the E7 HPV16 oncoprotein recruits an inhibitory transcriptional complex containing NFKB p50-p65 and ER α to the TLR9 proximal promoter (106).

In the same sense, Daud *et al.* reported that HPV16 infection clearance within a period of 4 months was associated with an increase of TLR9 expression, while persistence of the infection was related with a decrease of TLR9 expression in cervical samples. They also reported that women that did not eliminate HPV infection had a TLR9 basal expression (before HPV detection) higher than women that eliminate the infection, suggesting that genetics differences in TLR9 are involved in HPV clearance.

In this regard, Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) -1486T/C and 2848G/A in *TLR9* have been associated with uterine cervical neoplasms in Chinese and Polish populations (107, 108). In a Chinese population, the TC genotype in TLR9 -1486 locus was associated with an increased risk for uterine cervical neoplasm (107). Whereas CC genotype in the same position and AA genotype in the 2848 position of the *TLR9* gene were associated with an increased risk for uterine cervical neoplasm in a Polish population.

As mentioned before, HPV16 oncoproteins inhibit TLR9 expression through regulatory elements in the TLR9 promoter *in vitro*, nevertheless other works have shown that TLR9 increases in cervical cells of patients with persistent infections and uterine cervical neoplasms (63, 64, 66, 85). Furthermore, TLR9 is upregulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from patients with Hepatocellular carcinoma (HCC) (67), suggesting that TLR9 expression can be used as a molecular marker for cancer progression. Given the importance of identifying relevant genetic and biological markers related with Squamous Intraepithelial Cervical Lesion (SICL) and uterine cervical neoplasm progression, the aim of this work was to identify SNPs in the *TLR9* gene (-1486 T/C, -1237).

T/C, and 2848G/A) and evaluate its association with TLR9 expression in PBMCs from patients with SICL and uterine cervical neoplasm in a Mexican population.

Materials and Methods

Study population

A cross-sectional study was conducted with samples obtained from the biological sample bank constructed as described previously (98). The women who participated in this study were Mexican women who were seen at the Care Center for Women's Health in the State of Morelos, Mexico (Centro de Atención para la Salud de la Mujer del Estado de Morelos, México [CAPASAM]) between June 2008 and December 2011, and at the Gynecology Service of the at the National Cancer Institute (Instituto Nacional de Cancerología [INCAN]) in Mexico city between September 2010 and December 2011.

Women who accepted to participate in this study and met inclusion criteria (cytological, colposcopic, and histopathological diagnosis; age, ≥ 18 years and failing to initiate treatment) were asked to sign informed consent. Also, they were asked to respond to a questionnaire comprising items on sociodemographic and lifestyle factors. Women with autoimmune diseases, women having other Sexual Transmitted Diseases (STD) and women who had been previously treated were excluded from the study.

Uterine cervical neoplasms cases (aged 22–86 years) were women diagnosed with invasive Squamous Cell Carcinoma (SCC) or invasive Adenocarcinoma of the Cervix (ACC) (n = 172). Cases of low- and high- Squamous Intraepithelial Cervical Lesions (women aged 18–72 years) were classified as Squamous Intraepithelial Cervical Lesion (SICL, n = 194). This classification was assigned according to the diagnosis carried out in the corresponding Pathology Department. Women who were positive for HPV-PCR detection and do not have a squamous intraepithelial cervical lesion were classified as Non Cervical Lesion (NCL HPV⁺, n=131). Controls were women who were negative for HPV-PCR detection without SICL (NCL HPV⁻, n = 56) in order to evaluate the association of SNPs in TLR9 gene with HPV infection, SICL and uterine cervical neoplasm.

HPV typing was performed using PCR amplification with consensus primers MY09/11, L1C1/L1C2, and GP5/GP6, specific for the L1 capsid protein of HPV (98). HPV status was confirmed with the AnyplexTM II HPV HR Detection assay from Seegene[®], based on multiplex real-time PCR, TOCE and DPO primer pairs technology, according to the supplier's instructions (109).

This study was approved by the Bioethics and Research Committees of the National Institute of Public Health (Instituto Nacional de Salud Pública [INSP]) in Mexico. (INSP, CI: 694).

Samples

Sample processing has been described previously (98). Blood samples were collected by venous puncture in Vacutainer tubes containing EDTA (Becton Dickinson BD, Franklin Lakes, NJ, USA). PBMCs were purified by centrifugation in a Ficoll-Hypaque density gradient (Histopaque; Sigma Chemical Co.). Genomic DNA and RNA were extracted from PBMC with the TRIzol[®] extraction reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. DNA concentration and purity was determined utilizing the NanoDropTM 1000 Spectrometer (Thermo Scientific).

Complementary DNA synthesis (cDNA) was carried out with 1µg of total RNA in a 20 µl reaction. RNA was incubated with 1µl oligo dT (0.5µg/µl) at 65°C for 10 minutes; RT mix containing 4 µl of Buffer 5X First Strand BufferTM, 4 µl (2.5mM) of dNTPs, 2µl (0.1M) dTT, 0.2 µl (40U/µl) RNAse OUTTM Recombinant Ribonuclease Inhibitor, and 0.5µl (200U/µl) M-MLV Reverse TranscriptaseTM was added and reaction was incubated at 37°C for 60 min. cDNA integrity was evaluated by PCR amplification of the human housekeeping gene, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*G3PDH*) (110).

SNP selection and genotyping

SNPs were selected from the dbSNP database based on the following criteria: 1) Human SNPs validated by The 1000 Genome Project (n=183); 2) SNP with a Minor Allele Frequency (MAF) \geq 10% (n=4); 3) with a probable role in regulating the transcription of TLR9, or 4) previously reported evidence of its association with uterine cervical neoplasm in other populations (n=3). The SNPs selected and genotyped were the following: rs187084 (-1486T/C); rs5743836 (-1237T/C), and rs352140 (2848G/A).

Genotyping was performed with genomic DNA isolated from PBMCs using predesigned 5'endonulease assays (Taqman, Applied Biosystems, USA) in a 96-well StepOnePlus[™] instrument according to manufacturer's instructions (rs187084; assay c_230195_10); (rs5743836; assay c_32645383), and (rs352140; assay C_2301954_20). A total of 20ng of genomic DNA (gDNA) was utilized for each genotyping reaction. 10% of the samples were randomly selected and repeated to validate the results. For quality control (QC) we used a

call rate of 0.99 for all samples; samples were re-running if necessary. Genotyping analysis was performed independently in a blinded fashion by two researches.

Expression analysis

Real-Time PCR (RT-PCR) was performed in the 384-well-plate format on an Applied Biosystems Viia7 Real Time PCR System using TaqMan Gene Expression assays with FAM reporter dye at the 5' end of the TaqMan MGB probe and a nonfluorescent quencher at the 3' end. TLR9 expression was evaluated with a predesigned TaqMan assay (Hs00152973_m1) and TLR9 relative expression units (REU) were calculated relative to HPRT1 (Hypoxanthine Phosphotibosyltransferase-1) (Hs02800695_m1), since there was no statistically significant changes in HPRT1 expression among the study groups (111). For each amplification reaction, 1µl of a 1:10 dilution of total cDNA was used. The number of samples genotypified was not the same number of samples tested for expression and this was described in the text as an inadequate quality control (QC). Inadequate QC includes samples with HPRT1 expression below detection limit (4% of the total samples); samples with TLR9 expression below detection limit although HPRT1 expression was detectable (8% of the total samples). Samples were analyzed in duplicate. Relative expression was calculated with the $2^{-\Delta ct}$ method (77)

Statistical analysis

Differences in distribution of descriptive variables were evaluated using Chi-square test. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD) and categorical variables were expressed as percentages of total. Differences in the median values of TLR9 REU of NCL HPV⁺, SICL and uterine cervical neoplasms groups were evaluated by Kruskall-Wallis test, setting the NCL HPV⁻ group as the reference.

Tertiles of TLR9 expression were computed across the entire population and association analysis between low, medium and high TLR9 expression levels and NCL HPV^+ , with SICL, and with uterine cervical neoplasm was evaluated by multinomial logistic regression models.

Hardy–Weinberg equilibrium and LD were calculated using SNPSTATS program (<u>http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats</u>). Risk genotypes and alleles were determined as odds ratios (OR) and 95 % confidence intervals (95% CI) using multinomial logistic regression models by three inheritance models: codominant, dominant and recessive.

Differences in the median values of TLR9 REU stratified by the genetic variants of the associated SNP were evaluated by Kruskall-Wallis test. All models were adjusted by age, parity (defined as the number of times that every female has given birth to an infant, alive or dead) and Body Mass Index (BMI). Statistical analyses were performed using Stata/SE ver. 14 statistical software (STATA, Inc., College Station, TX, USA). A p value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

The general characteristics of the study population are described in Table 1.

Variable	NCL HPV ⁻ (<i>n</i> = 56)	NCL HPV ⁺ (<i>n</i> = 131)	SICL (<i>n</i> = 194)	UCN (<i>n</i> = 172)	<i>P</i> -value [*]
Age (y ⁾ , mean±DS	37.27 ± 11.02	36.13±11.75	35.39 ± 10.84	50.85 ± 13.07	0.0001 ^a
Body mass index [,] mean±DS	24.74± 5.02	24.82± 4.13	25.77 ± 3.99	26.66 ± 5.11	0.0002 ^a
Age at first sexual intercourse (years), mean±DS	20.14± 3.55	20.01± 3.91	17.92 ± 3.12	17.5 ± 2.96	0.0001 ^a
Number of lifetime sexual partners, mean±DS (range)	2.34±2.46 (1-17)	2.93±3.95 (1-30)	2.46±3.13 (1-30)	2.12±1.43 (1-10)	0.88 ^a
Parity, mean±DS (range)	1.78 ± 2.03 (0-11)	1.67 ± 1.86 (0-12)	3.27 ± 2.35 (0-15)	4.66 ± 2.92 (0-15)	0.0001 ^a
Condom use (%)	18.52	45.68	28.4	7.41	0.0001 ^b
High-risk HPV type ^{**} (%)	-	88.79	91.03	100	0.0001 ^b

Table 1. General characteristics of the study population.

HPV, Human Papillomavirus; NCL, Non-Cervical Lesion; SICL, Squamous Intraepithelial Cervical Lesion; UCN, Uterine Cervical Neoplasm; BMI, Body Mass Index. Values in bold denote a significant *p* values (*p* <0.05). * Uterine cervical neoplasm group compared with control group (NCL HPV⁻); **Includes HPV16 and HPV18 co-infections; ^aKruskal–Wallis test *p* value; ^b χ^2 test *p* value.

Mean values of the variables age, BMI, and parity were different in women with uterine cervical neoplasm in comparison in those without HPV infection; patients with uterine cervical neoplasm were, on average, older than controls, had a higher BMI, had their first sexual intercourse at a younger age and also had a higher number of children. Moreover, the proportion of women who used a condom (alone or in conjunction with other contraceptive methods) diminished in the uterine cervical neoplasm group. As expected, all uterine cervical neoplasm cases were positive for a High-risk HPV.

TLR9 mRNA was evaluated in PBMCs, normalized to the HPRT1 expression and stratified by diagnosis group. Results showed a significant increase of TLR9 expression in PBMCs of women diagnosed with SICL and uterine cervical neoplasm in comparison with TLR9 expression in NCL HPV⁻ group (Fig 1).



Fig 1. Relative expression of Toll-Like Receptor 9 (TLR9) increases in Uterine cervical neoplasms and Squamous Intraepithelial Cervical Lesion (SICL) compared with the control group. TLR9 expression levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were calculated relative to HPRT1. Graph represents the median value of relative expression units. Asterisks denote statistical significance (p < 0.05) for the Kruskal–Wallis test adjusted for multiple comparisons.

Considering the differences in the distribution of TLR9 expression, we performed multinomial logistic regression analysis to evaluate the association among different levels of TLR9 expression (stratified by tertiles of expression) with HPV infection, SICL, and

uterine cervical neoplasm. These analyses denoted a significant, high-magnitude positive association with the highest TLR9-expression tertile (>0.183 TLR9 REU) with SICL (OR, 6.04; 95% CI, 1.89–19.32) and with uterine cervical neoplasm (OR, 4.60; 95% CI, 1.38–15.38), Table 2.

Table 2. Association analysis for Toll-Like Receptor 9 (TLR9) Relative Expression Units (REU) with HPV infection, SICL and uterine cervical neoplasm stratified by tertiles of expression.

PBMC (<i>n</i> = 553)	HPV ⁻ /HPV ⁺ / SICL/ UCN	NCL HPV ⁺		SICL		UCN	
TLR9 REU	n=56/131/ 194/172	OR (95% CI) ^a	P- value	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> -value	OR (95% CI) ^a	P- value
< 0.0342	20/41/52/42 ^b	1		1		1	
0.0342-0.183	19/26/53/57 ^b	0.59(0.26-1.34)	0.211	0.90 (0.41-1.97)	0.792	1.33(0.58-3.02)	0.498
>0.183	4/29/76/45 ^b	3.15(0.96- 10.35)	0.058	6.04 (1.89-19.32)	0.002	4.60 (1.38-15.38)	0.013

TLR9, Toll-Like Receptor 9, HPV, Human Papillomavirus; NCL, Non-Cervical Lesion; SICL, Squamous Intraepithelial Cervical Lesion; UCN, Uterine Cervical Neoplasm; REU, Relative Expression Units. TLR9 REU in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) was calculated as relative to HPRT1 expression. Values in bold denote significant p values (p < 0.05). ^aAdjusted for age, parity, and Body Mass Index (BMI). ^bNumbers do not equal total sample size due to an inadequate QC;. OR, Odds Ratio; 95% CI, 95% Confidence Interval.

For the TLR9 SNP selection was conducted search in dbSNP a (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). We selected SNPs validated in 1000 genomes project with a Minor Allele Frequency (MAF) $\geq 10\%$ and with a previously reported role in HPV infection or uterine cervical neoplasm (rs187084, rs5743836 and rs352140). Genotype distributions of rs187084, rs352140 and rs5743836 were in Hardy-Weinberg equilibrium in study population (p=0.32, p=0.27 and p=0.86 respectively). Rs187084 and rs352140 were in linkage disequilibrium (correlation coefficient $r^2=0.88$), therefore multinomial logistic regression analysis was performed with SNPs rs187084 and rs5743836.

To evaluate the association of the selected TLR9 SNPs (rs187084 and rs5743836) with HPV infection, SICL, and uterine cervical neoplasm, a multinomial logistic regression

analysis was performed using the ancestral homozygote as reference in both cases (Ensembl 83 Release). This analysis revealed that only rs187084 was associated with HPV infection, SICL, and uterine cervical neoplasm in the study population (Table 3).

Table 3.Association of -1486T/C TLR9 SNP (rs187084) with HPV infection, SICL, and UCN										
Model	Genotype	NCL HPV+			SICL			UCN		
		OR (95% CI) ^a	P- value		OR (95% CI) ^a	P- value		OR (95% CI) ^a	P- value	
	C/C	1								
Codominant	T/C	0.98 (0 .45-2.10)	0.95		1.61 (0.76-3.38)	0.21		1.71(0.77-3.76)	0.185	
	T/T	3.21(1.10- 9.35)	0.032		4.34(1.52-12.41)	0.006		5.96(1.99-17.86)	0.001	
Dominant	C/C	1			1			1		
	T/C+TT	1.36 (0.66-2.82)	0.404		2.07 (1.02-4.23)	0.044		2.42 (1.14-5.15)	0.022	
Decessive	C/C+T/C	1			1			1		
Recessive	T/T	3.26(1.25-8.50)	0.016		3.16(1.24-8.01)	0.016		4.18 (1.59-10.99)	0.003	
	C (0.49)	1			1			1		
	T (0.51)	1.65(1.02-2.68)	0.042		1.90 (1.19-3.00)	0.006		2.25(1.38-3.68)	0.001	
NCL VPH- group was utilized as control group. Abbreviations: CC, cervical cancer; SIL, Squamous Intraepithelial Lesion; UCN, Uterine cervical neoplasm; BMI, Body Mass Index. Bold values denotes significant P-values (P<0.05). ^a Adjusted by age, parity and BMI.										

Specifically, we found that the TT genotype in -1486 TLR9 promoter position is significantly associated not only with uterine cervical neoplasm (OR, 5.96; 95% CI, 1.99–17.86), but also with SICL (OR, 4.34; 95% CI, 1.52–12.41) and HPV infection (OR, 3.21; 95% CI, 1.10–9.35) in co-dominant model (Table 3). The same trend was found when the analysis was performed by recessive and dominant model. Moreover, the associations were maintained when the analysis was carried out by allele: the T allele was associated with HPV infection (OR, 1.65; 95% CI, 1.02–2.68), SICL (OR, 1.90; 95% CI, 1.20–3.01) and uterine cervical neoplasm (OR, 2.25; 95% CI, 1.38–3.68) (Table 3).

Finally, no significant association among variants CC, TC and TT in -1486 locus and median TLR9 expression was found (Kruskall-Wallis test) (Fig 2).



Fig 2. Toll-Like Receptor 9 Relative Expression Units (TLR9 REU)-level distribution in the study groups by the genotype in the -1486 position of the TLR9 promoter. Median values of TLR9 REU in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) by genotypes CC, TC, and TT in position -1486 of the TLR9 promoter in the following: a) NCL HPV⁻ patients; b) NCL HPV⁺ patients; c) patients with Squamous Intraepithelial Cervical Lesion (SICL), and d) patients with Uterine cervical neoplasms. Relative Expression Units (REU) were calculated relative to HPRT1).

Discussion

TLR9 is critical to recognize nucleic acids of pathogens but recent evidences suggest an important role in cancer development, especially because of the involvement of oncogenic DNA viruses in this process; in 2008, 23% of new cases of cancer were attributable to infectious agents in less developed regions (78). Importantly, oncogenic DNA viruses as Merkel cell polyomavirus, Epstein–Barr virus, Hepatitis B virus, and HPV that can give

rise to Merkel cell carcinoma, lymphoma, hepatocellular carcinoma, cervical carcinoma, and head and neck carcinoma, respectively, modulate TLR9 expression (82, 112-114).

Hasan *et al.* have shown that E6 and E7 HPV16 and HPV38 inhibit TLR9 expression by different mechanisms in keratinocytes (82, 83). However, other studies have found that TLR9 expression increase in cervical samples of women with HPV persistent infections, SICL and uterine cervical neoplasm (63, 64, 66, 84, 85), suggesting that, in HPV-infection early stages, TLR9 is downregulated by E6 and E7 but, during progression to SICL and uterine cervical neoplasm, TLR9 expression increases, probably as an attempt to eliminate infection and transforming cells or as a result of cellular stress. Additionally, TLR9 is also increased in tumor cells of patients with other types of cancer, such as breast cancer, ovarian cancer, esophageal cancer, prostate cancer and also in serum of patients with non small cell lung carcinoma (NSCLC) (68, 86-88), in which the role of TLR9 in carcino- and angiogenesis has been principally associated with chronic inflammation.

In the current study, we showed a statistically significant increase of TLR9 expression in PBMCs of patients with SICL and uterine cervical neoplasm when compared with TLR9 expression of healthy donors (Fig 1). Specifically, there was a 2.54-fold significant increase in the median value of TLR9 REU in uterine cervical neoplasm and 3.62-fold in SICL in comparison with controls. In addition, we found a significant association among the higher tertile of TLR9 expression with SICL and uterine cervical neoplasm (Table 2). Comparatively another study reported a significant higher TLR9 expression in PBMCs from patients diagnosed with HCC, (positive for hepatitis virus B), in comparison with healthy controls (67). As mentioned before, patients with NSCLC have a higher TLR9 expression levels in serum when compared with healthy controls (68). These data suggest that TLR9 inhibition is necessary for HPV infection but TLR9 expression increases during cell transformation, not only in tumor cells but also in PBMCs.

The present work investigated the contribution of rs187084, rs5743836 and rs352140 to the uterine cervical neoplasm, SICL and HPV infection in a Mexican population. Previous studies in a Chinese and Polish populations have shown that TC and CC genotypes in - 1486 locus are associated with increased risk for uterine cervical neoplasm, respectively, however, we found that genotype TT is a variant associated with a increased risk for HPV infection, SICL and uterine cervical neoplasm in a Mexican population (Table 3). Differences in the analysis of genetic associations among populations are attributable to a different genetic admixture, to errors in sampling, to low statistical power, to heterogeneity in the population and confounding by gene-environment-interactions. Moreover, association studies must be interpreted carefully since the genotype and allele distributions of SNPs are different among populations. In this regard, meta-analysis studies have shown that results from SNP associations with cancer risk differ when analysis was stratified by race. (115-117).

Our results showed that genotype and allele frequencies of rs187084 have a similar distribution to that reported in the HapMap project (HapMap MXL data (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/) calculated for a population with Mexican ancestry in Los Angeles, USA. Here, we showed that the distribution of the variants CC, TC and TT in TLR9 -1486 locus was 0.32, 0.55 and 0.125 respectively; whereas the distribution reported in HapMap was 0.26, 0.52 and 0.22. Accordingly, the allele T is the MAF in both populations. In the other hand, the genotype and allele distribution of rs187084 in Mexican population is not comparable to that in Asian and European populations. For rs187084, Chen *et al.*, reported frequencies for CC, TC and TT genotypes of 0.15, 0.50 and 0.35; whereas Roszak *et al.*, reported values of 0.14, 0.44, and 0.42, respectively. Therefore, the frequencies are inversely distributed in comparison with our study population.

A limitation of our study is the sample size and further replication studies are required. However, OR values are consistent among groups, that is, the genotype TT is significantly associated with HPV infection, with SICL, and with uterine cervical neoplasm, even more, OR values increase with the severity of the disease (Table 2).

In silico analysis revealed that allele C in the -1486 locus generates an Sp1 transcription factor binding site (118), which could be relevant for the regulation of TLR9 expression. Nonetheless, the role of Sp1 in transcriptional regulation is complex, because Sp1 has been reported as an activator and as a repressor transcription factor. Interaction of Sp1 with Sp3 induces the recruitment of Histone Deacetylase 2 (HDAC2), repressing the expression of human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) in normal fibroblasts (95). Nevertheless, functional promoter analysis in B cells demonstrated that Sp1 binding to a reporter IL-10 promoter plasmid increases its transcriptional activity (119). Extensive analysis of transcription factors that bind TLR9 -1486 locus is required.

No significant difference was observed in TLR9 expression by genotype in the study population (Fig 2). However, this is probably a limitation of the sample number, given the observation that the median value of TLR9 REU is slightly higher for TC and TT genotypes compared with the CC genotype in the SICL group (Fig 2c). Also, there is evidence that TLR9 expression could be partially dependent on rs187084, as evaluated in patients with LOAD (Late Onset Alzheimer Disease) in Han Chinese population (120). In this study, the authors found that patients with LOAD who carried the genotype CC express more TLR9 than patients with the TT genotype in PBMC. Furthermore, analysis of promoter activity performed with reporter gene constructs that included three variants in the *TLR9* gene (rs187084, rs5743836, and rs352139) demonstrated that haplotypes (121). Moreover, Bharti *et al.* reported that PBMCs stimulated with H37Rv whole-cell lysates from patients with a TT genotype in TLR9 -1486 locus express more TNF and

Interferon gamma (IFNG) in comparison with PBMCs from patients with a TC/CC genotype (122), which probably reflects differences TLR9 mediated cytokine expression.

Although no significant association of rs5743836 with uterine cervical neoplasm was found, we cannot rule out that they are important for regulation of TLR9 expression. Variant C in the -1237 locus was found to generate an NF- κ B binding site (118). Also, this allele has been associated with higher expression of TLR9 compared with allele T in response to an IL-6 stimulus in a luciferase reporter system in B cells; moreover, IL-6 production is induced in response to CpG oligodeoxynucleotides in PBMCs, suggesting that there is a positive feedback loop between IL-6 and TLR9. In contrast, Trejo de la O et al. reported that biopsies from Helicobacter pylori-infected patients, carrying allele C in the TLR9 -1237 locus, expressed lower levels of TNF and IL-1 β in comparison with patients carrying allele T (37). In the same manner, H. pylori-infected patients carrying allele A in the TLR9 2848 locus, express lower levels of TNF and IL-1 β in comparison with patients carrying the G allele (123).

Further analyses are needed to identify the specific effect of relevant variants in TLR9 that could imply a risk for developing SICL and uterine cervical neoplasms. Also, it remains to be elucidated if the increased TLR9 expression in SICL and uterine cervical neoplasms correlate with the increased TLR9 expression in PBMCs of the same patients, which could provide a marker of cancer progression.

Conclusions

The findings of this work are: 1) TLR9 expression in PBMCs increases in SICL and in uterine cervical neoplasm in comparison with healthy donors; 2) there is a significant association of higher tertile-level expression of TLR9 with SICL and uterine cervical neoplasm, and 3) SNP -1486TC is significantly associated with HPV infection, SICL, and uterine cervical neoplasm in Mexican women.

Acknowledgments

The authors wish to thank all INCAN and CAPASAM staff members and patients who participated in this study and also the CISEI work team (Laboratory 4, ground floor). The authors wish to thank Maggie Brunner for manuscript assistance.

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree of Martínez-Campos Cecilia of the Doctoral Program in Public Health Sciences of the School of Public Health of Mexico.

References

1. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740-5. Epub 2000/12/29.

2. Rigby RE, Webb LM, Mackenzie KJ, Li Y, Leitch A, Reijns MA, et al. RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. The EMBO journal. 2014;33(6):542-58. Epub 2014/02/12.

3. Huang X, Yang Y. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. Expert opinion on therapeutic targets. 2010;14(8):787-96. Epub 2010/06/22.

4. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, McDonald J, Sattar Z, Cousins DJ, et al. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. The Journal of clinical investigation. 2009;119(2):387-98. Epub 2009/01/14.

5. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2007;178(5):3186-97. Epub 2007/02/22.

6. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. The Journal of experimental medicine. 2013;210(7):1369-87. Epub 2013/06/12.

7. Chen X, Wang S, Liu L, Chen Z, Qiang F, Kan Y, et al. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. DNA and cell biology. 2012;31(5):766-71. Epub 2011/11/09.

8. Roszak A, Lianeri M, Sowinska A, Jagodzinski PP. Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. Molecular biology reports. 2012;39(8):8425-30. Epub 2012/06/21.

9. Cannella F, Pierangeli A, Scagnolari C, Cacciotti G, Tranquilli G, Stentella P, et al. TLR9 is expressed in human papillomavirus-positive cervical cells and is overexpressed in persistent infections. Immunobiology. 2015;220(3):363-8. Epub 2014/12/03.

10. Fehri E, Ennaifer E, Ardhaoui M, Ouerhani K, Laassili T, Bel Haj Rhouma R, et al. Expression of Toll-like receptor 9 increases with progression of cervical neoplasia in Tunisian women--a comparative analysis of condyloma, cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2014;15(15):6145-50. Epub 2014/08/16.

11. Lee JW, Choi JJ, Seo ES, Kim MJ, Kim WY, Choi CH, et al. Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. Molecular carcinogenesis. 2007;46(11):941-7. Epub 2007/04/19.

12. Ghosh A, Dasgupta A, Bandyopadhyay A, Ghosh T, Dalui R, Biswas S, et al. A study of the expression and localization of toll-like receptors 2 and 9 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. Exp Mol Pathol. 2015;99(3):720-4. Epub 2015/11/17.

13. Xu N, Yao HP, Sun Z, Chen Z. Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. Acta pharmacologica Sinica. 2008;29(2):239-44. Epub 2008/01/25.

14. Torres-Poveda K, Burguete-Garcia AI, Cruz M, Martinez-Nava GA, Bahena-Roman M, Ortiz-Flores E, et al. The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. Infectious agents and cancer. 2012;7(1):32. Epub 2012/11/15.

15. Lee DH, Hwang NR, Lim MC, Yoo CW, Joo J, Kim JY, et al. Comparison of the performance of Anyplex II HPV HR, the Cobas 4800 human papillomavirus test and Hybrid Capture 2. Annals of clinical biochemistry. 2015. Epub 2015/10/22.

16. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome biology. 2002;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002/08/20.

17. Martinez-Nava GA, Torres-Poveda K, Lagunas-Martinez A, Bahena-Roman M, Zurita-Diaz MA, Ortiz-Flores E, et al. Cervical cancer-associated promoter polymorphism affects akna expression levels. Genes and immunity. 2015;16(1):43-53. Epub 2014/11/07.

18. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature protocols. 2008;3(6):1101-8. Epub 2008/06/13.

19. Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. Annals of global health. 2014;80(5):384-92. Epub 2014/12/17.

20. Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J, et al. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2010;185(11):6439-47. Epub 2010/10/29.

21. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, et al. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. PloS one. 2011;6(10):e26315. Epub 2011/11/03.

22. Shahzad N, Shuda M, Gheit T, Kwun HJ, Cornet I, Saidj D, et al. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. Journal of virology. 2013;87(23):13009-19. Epub 2013/09/27.

23. Pacini L, Savini C, Ghittoni R, Saidj D, Lamartine J, Hasan UA, et al. Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 and Implications for Cell Cycle Control. Journal of virology. 2015;89(22):11396-405. Epub 2015/09/05.

24. Hao Y, Yuan JL, Abudula A, Hasimu A, Kadeer N, Guo X. TLR9 expression in uterine cervical lesions of Uyghur women correlate with cervical cancer progression and selective silencing of human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins in vitro. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2014;15(14):5867-72. Epub 2014/08/02.

25. Zhang Y, Wang Q, Ma A, Li Y, Li R, Wang Y. Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. Oncology reports. 2014;31(5):2298-304. Epub 2014/03/22.

26. Lan F, Yue X, Ren G, Wang Y, Xia T. Serum toll-like receptors are potential biomarkers of radiation pneumonia in locally advanced NSCLC. International journal of clinical and experimental pathology. 2014;7(11):8087-95. Epub 2015/01/01.

27. Luo Y, Jiang QW, Wu JY, Qiu JG, Zhang WJ, Mei XL, et al. Regulation of migration and invasion by Toll-like receptor-9 signaling network in prostate cancer. Oncotarget. 2015;6(26):22564-74. Epub 2015/06/19.

28. Berger R, Fiegl H, Goebel G, Obexer P, Ausserlechner M, Doppler W, et al. Toll-like receptor 9 expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. Cancer science. 2010;101(4):1059-66. Epub 2010/02/17.

29. Loh M, Koh KX, Yeo BH, Song CM, Chia KS, Zhu F, et al. Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: variability in associations according to race. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2009;45(14):2562-8. Epub 2009/04/21.

30. Jin Y. Association of single nucleotide polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha with cervical cancer susceptibility. Cell Biochem Biophys. 2015;71(1):77-84. Epub 2014/07/30.

31. Sun Z, Cui Y, Jin X, Pei J. Association between IL-4 -590C>T polymorphism and gastric cancer risk. Tumour Biol. 2014;35(2):1517-21. Epub 2013/09/28.

32. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2006;364(1-2):303-7. Epub 2005/08/30.

33. Won J, Yim J, Kim TK. Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. The Journal of biological chemistry. 2002;277(41):38230-8. Epub 2002/08/02.

34. Larsson L, Johansson P, Jansson A, Donati M, Rymo L, Berglundh T. The Sp1 transcription factor binds to the G-allele of the -1087 IL-10 gene polymorphism and enhances transcriptional activation. Genes and immunity. 2009;10(3):280-4. Epub 2008/10/10.

35. Wang YL, Tan MS, Yu JT, Zhang W, Hu N, Wang HF, et al. Toll-like receptor 9 promoter polymorphism is associated with decreased risk of Alzheimer's disease in Han Chinese. Journal of neuroinflammation. 2013;10:101. Epub 2013/08/21.

36. Omar AH, Yasunami M, Yamazaki A, Shibata H, Ofori MF, Akanmori BD, et al. Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study. Malaria journal. 2012;11:168. Epub 2012/05/19.

37. Bharti D, Kumar A, Mahla RS, Kumar S, Ingle H, Shankar H, et al. The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis. Immunogenetics. 2014;66(12):675-81. Epub 2014/09/25.

38. Trejo-de la OA, Torres J, Sanchez-Zauco N, Perez-Rodriguez M, Camorlinga-Ponce M, Flores-Luna L, et al. Polymorphisms in TLR9 but not in TLR5 increase the risk for duodenal ulcer and alter cytokine expression in the gastric mucosa. Innate immunity. 2015;21(7):706-13. Epub 2015/05/23.

Role of TLR9 on oncogenic virus-produced cancer.

Martínez-Campos Cecilia¹, Burguete-García Ana I.¹ and Madrid-Marina Vicente¹

¹Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, Mexico. (Chronic Infectious Diseases and Cancer Division. Center for Research on Infectious Diseases. National Institute of Public Health).

Abstract

The recognition of nucleic acids trough TLR9, initiates signaling pathways that regulate the production of proinflammatory cytokines or type I IFNs, as well as many other necessary molecules for the initialization of the immune response. To emulate the recognition of DNA sequences through TLR9, the use of synthetic oligodeoxynucleotides (ODN) has been crucial. Furthermore, the administration of ODNs into mice has shown to confer protection against a wide range of viral, bacterial and parasitic pathogens. In contrast, oncogenic DNA viruses as HBV, EBV and HPV, inhibit the expression of TLR9, probably contributing to the establishment of chronic viral infections.

In this review we will focus on the TLR9 signals initiated by the recognition of the ODNs, the inhibition of TLR9 expression mediated by DNA oncogenic viruses and also, the expression of TLR9 as a relevant event in the progression to cancer, considering other functions of this receptor aside from viral recognition.

Introduction

Toll receptor was initially described in Drosophila as a protein involved in the dorsoventral development of the fruit fly. However, the homology of Toll receptor cytoplasmic region with the cytoplasmic region of the IL-1 receptor, the fact that both receptors activated Rel family proteins, Dorsal and NF κ B respectively and that Toll receptor was involved in the response against fungal infections, prompted to speculate that Toll receptor was involved in the immune response (124). These discoveries eventually led to identify for the first time the Toll receptors homolog (TLR; Toll-like Receptor) in mammals (125). In general, TLRs are Pattern Recognition Receptors (PRRs) that recognize Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) this recognition in turn, initiates signaling pathways that lead to the activation of transcription factors that regulate the expression of cytokines, chemokines, costimulatory and adhesion molecules required to eliminate pathogens. Among TLRs, highly relevant is TLR9, which belongs to a subgroup of TLRs that recognize nucleic acids (126). Canonically, TLR9 recognizes unmethylated CpG DNA sequences, but recent evidences have shown that TLR9 is able to recognize other types of nucleic acids, which means that it operates more sensitively than we previously thought.

TLR9 structure and ligand binding

TLR9 is a protein with an N-terminal ligand recognition domain shaped for a leucine-rich repeat domain (LRR), a helical transmembrane domain of 20 aminoacid residues and a cytoplasmic signaling domain that is a Toll/Interleukin (IL)-1R receptor (TIR) homology domain (126). In TLRs, LRR domain is a 22-29 residues in length that also contain hydrophobic residues and forms a loop structure that, when assemble in the full protein, tandem copies of LRRs adopt a solenoid structure in a curved configuration (horseshoe shape) which is constituted by 25 LRRs in TLR9 (127).

Since there are not crystallographic structures reported for TLR7, 8 and 9, it is not know the binding site of the ligand to the LRR domain. However, Wei et al., developed a three-dimensional structures of the LRR domain of TLR7, TLR8 and TLR9 based in homology modeling and they inferred that the ligand binding region in TLR9 is around de LRR 17 (128).

Analysis *in vivo* with single molecule fluorescence tools showed that TLR9 is predominantly localized in endosomal compartments and that it remains as homodimer before and after the stimulation with CpG-B ODN in HEK293 cells (129). The results obtained for Chen et al., suggest that it is necessary a structural change conformation in TLR9 for its activation and this conformational change occurs through the binding of CpG sequences (129).

To elucidate the activation of TLR9 due to the recognition of DNA sequences, have been used synthetic ODNs with a phosphorothioato (PS) backbone in order to improve the cell uptake and nuclease resistance (130). Nevertheless, this approach has probably shelved, in some extend, the understanding of the real effect after the recognition of the phosphodiester (PD) backbone ODN through TLR9. In this regard, a very elegant work by Haas et al., has shown that TLR9 recognizes DNA sugar 2' backbone deoxyribose ODN and this recognition drives the cytokine production in the same extent that PS ODN independently of CpG sequences (131). They reported that the addition of a 3'PD poly-G extension (24Gs) improves the cell uptake of the ODN and avoids the sensitivity to nucleases. Remarkably, 3'PD poly-G ODN induced TLR9 activation and cytokine production in a CpG sequence independent manner and that this activation is not an effect of the poly-G sequence.

Furthermore, the stimulus of a mice B cell line with two ODNs with the same sequence, but with a PS or PD backbone (1668), induced IL-6 production in different concentrations and

in a different magnitude (132). Inversion of the CpG sequence in the 1668 PS-ODN did not abrogate the IL-6 production in the same cells. Moreover, another study showed that a non-CpG PS-ODN induced the proliferation in human B cells and the secretion of IL-6 and IL-10 (133). Thus, CpG and non-CpG sequence are potent inductors of IL-6 and IL-10 in B-cells.

In the same way, De Jong *et al.*, reported that methylated CpG PS-ODNs (mCpG ODN) activated TLR9 signalling as well as unmethylated CpG PS-ODNs (134). Experiments performed showed that mCpG and CpG ODNs were taken up similarly by mice APCs and RAW264.7 cell line when delivered in lipid nanoparticles; that both kinds of ODNs colocalize with TLR9 in the late endosome of DCs derived from mice spleen regardless its methylation status and that both ODNs induced the production of IFN- γ , IL-6 and MCP-1. In the other hand, free mCpG ODN did not colocalize with TLR9 but empty lipid nanoparticles colocalized with TLR9, without inducing the production of cytokines (134). On the contrary, Coch *et al.*, reported that plasmacytoid DCs (pDCs) recognized self DNA complexed to cationic molecules in some extend, but there is a "preference" for unmethylated CpG DNA sequences. They showed that PD-ODN complexed to DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)]-*N*,*N*,*N*trimethlammonium propane methylsulfate) induced the production of IFN α and TNF in pDCs and that elimination of the CpG motif abolishes the IFN α production; besides, the stimulus with CpG methylated-ODN reduced the IFN- α production in these cells (135).

Interestingly, a recent work has shown that TLR9 is able to recognize DNA:RNA hybrids(136). Stimulation of plasmacytoid and conventional dendritic cells with a DNA:RNA hybrid containing a guanosine-uridine rich RNA strand motif induced the expression of CD40 and CD86 in both type of cells and induced the production of IFN- α and IL-6 in a TLR9-MyD88 dependent manner; this recognition occurs in the endosomal compartments (136) . Since ssDNA has no effect in stimulating cytokines, authors concluded that TLR9 senses intact DNA:RNA hybrid. In agreement with the work of Haas et al., these results may also suggest that duplex ODN with at least one DNA phosphodiester backbone could induce TLR9 signaling (131).

Together, these works reinforce the idea that endosomal localization of TLR9 avoids the recognition of self-DNA but the controversy about the selectivity of non methylated CpG DNA sequences versus methylated CpG DNA sequences remains. Differences in the level of cytokine production in different cells could be explained by the differential expression of TLR9 isoforms and the machinery inherent to each cell type. Regarding the TLR9 selectivity for the DAMPs, it seems that TLR9 can be considered a promiscuous molecule since it recognizes self DNA, foreign DNA, PS-ODN, PD-ODN and even DNA: RNA hybrids as well as CpG motifs or motifs different to CpG sequences (133-136).

TLR9 signaling

TLR9 is expressed in intracellular compartments in pDCs, monocytes, lymphocytes B, lymphocytes T ($CD4^+$ and $CD8^+$), endothelial cells, keratynocites and melanocytes (137-140); but also, it is expressed on the surface of tonsil and peripheral B lymphocytes, splenic DCs, gastric and intestinal cells (141-145).

TLR9 resides in the Reticulum Endoplasmic (RE) prior to stimulation and is translocated to the Golgi complex and lysosomes after the stimuli with ODNs (CpG or non CpG), where colocalizes with MyD88 (146-148). TLR9 is a 150KDa protein that suffers a proteolitic cleavage in the endolysosome generating an 80KDa protein and this modification is dependent o asparagine endopeptidase and cathepsin family members (149-151). The exit of TLR9 from ER to the endolysosome is dependent on the interaction with UNC93B1 (Unc-93 homolog B1), such that when UNC93B1 is not functional, there is no production of cytokines in response to CpG ODNs (152-154). Also, the trafficking of UNC93B1 is dependent on the adaptor proteins (AP) 1 and 2 through the carboxyl terminal tyrosinebased sorting motif (Yxx ϕ) (155).

TLR9 ligand binding induces two different signaling pathways that have common protein components, in both pathways TLR9 recruits the adaptor protein MyD88, which interacts with IRAK4 (IL-R associated kinase 4) through their Death Domains (DD) and activates IRAK; in turn, this induce the recruitment of TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) (44-47).

In the MAPKs pathway, TRAF6 is ubiquitinated by E1 and E2 (Ubc13/Uev1A), promoting the recruitment of TAB2 and TAB3 which mediate the activation of TAK1 (TGF Associated Kinase 1) (50, 51). TAK1 activates IKK β inducing the translocation of NF κ B to the nucleus and activates MKK3/6 leading to the activation of JNK-p38 kinase pathway (49, 50). Besides, activation of TRAF6 leads to the activation of IRF5, which in turn induces the expression of IL-6, IL12 and TNF (48).

In the type I IFNs pathway, PYKfive, the complex TRAF3, Adaptor protein-3 (AP-3) and IRF7 along with protein DOCK2 (which activates IKK α), osteopontin and viperin, are specific for the production of IFN α in plasmacytoid cells (52-56, 156, 157).

TLR9 expression in oncogenic DNA virus infection

Human Papillomavirus (HPV)

TLR9 activation in keratinocytes induces the expression of TNF, IL-6 and IL-8(61). However, Hasan *et al.*, demonstrated that E6 and E7 VPH16 inhibit the transcription of TLR9. In keratinocytes transfected with HPV16 E6 and E7, there is no secretion of IL-8 or MIP3a in response to CpG ODN (3). TLR9 inhibition mediated by E6 and E7 of HPV16

was confirmed in a C33 cell line infected with HPV16 quasivirions (158). Furthermore, TLR9 inhibition is mediated by the recruitment of a complex that includes the transcription factor NF-KB (p50-p65), the histone deacetylase HDAC1 and the demethylase JARID1B to the TLR9 promoter (158).

In the same sense, the beta HPV38, inhibits TLR9 expression as demonstrated in RPMI 8226 human myeloma cells and human foreskin keratinocytes (HFK) transiently transfected with HPV38 E6 and E7 (159). IL-8 and MIP3a secretion was undetectable in HFK expressing HPV38 E6 and E7 and stimulated with CpG ODN (159). Furthermore, Chromatin Immunoprecipitation analysis showed that an inhibitory complex formed by Δ Np73 α (p53 antagonist), (IKK β) and the polycomb protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH) is recruited to the promoter of TLR9 gene (159).

Although chronic infection HPV is associated with the development of epithelial lesions and cervical cancer, some works have evaluated the dynamics of TLR9 expression during the HPV infection and the progression of intraepithelial lesions to cervical cancer.

Daud *et al.*, found that TLR9 expression increased in women (American population) that cleared an HPV16 infection in a period of four months but TLR9 expression decreased in women with persistent infections (classified as two positive HPV16 result in a period of four months) (160). Remarkably, the TLR9 basal expression level was higher in samples from women with persistent infections compared with women that cleared the infection (160).

Evaluation of TLR9 expression in cervical cells from women positive for High (HR) and Low risk (LR) HPV showed that women positive for LR HPV had significant higher TLR9 levels in comparison with negative HPV samples, while TLR9 expression in HR HPV positive samples was marginally higher in comparison with the control group (Italian population) (161). Importantly, when the analysis was performed considering as a persistent infection the detection of HPV, 6-18 months before enrollment to the study, there was a significant increase in TLR9 expression in these samples in comparison with TLR9 levels in samples from women who had cleared the infection or samples from women who had an incident infection. These apparently contradictory results can be explained by the fact that the oncogenic DNA viruses such as HPV16, HBV and HSV-2, inhibit TLR9 expression in a transitory manner (5).

TLR9 protein was detected by immunohistochemistry in 53 samples from Tunisian women obtained by cervical biopsies, conization or hysterectomy. 5 cases of CIN I, 6 cases of CIN II, 7 cases of CIN III and 22 cases of cervical carcinoma were compared with 7 cases of condyloma and 6 samples of normal cervical squamous epithelium (62). Results showed an statistically significant increasing mean score of TLR9 immunostaining from CINs to cervical carcinoma in comparison with normal cervical squamous epithelium (62).

Another study performed in a Korean population showed a statistically significant increase of TLR9 expression in cervical carcinoma tissue in comparison with normal cervical epithelium (63). Furthermore, an increase in TLR9 expression was detected by immuno-

histochemistry in accordance with the severity of the disease, this is, low grade intraepithelial lesion<high grade intraepithelial lesion<invasive squamous cell carcinoma, finding that 70% of the invasive cell carcinoma has a moderate to strong immunoreactivity score for TLR9 (63). Likewise, assessment of TLR9 by immunostaining showed a higher TLR9 expression according to the severity of the disease; specifically, samples from tumor tissue from patients with SCC expressed more TLR9 than samples of patients with CIN III and CIN II in comparison with control samples (Hindu population; n=9) (64). Accordingly, a recent case-control study showed that TLR9 expression increases in women with cervical cancer (n=30) in comparison with controls (n=30) (Hindu population) (65). Moreover, high TLR9 expression level in PBMCs is associated with a greater risk for developing intraepithelial lesions and cervical cancer in a Mexican population (Martínez-Campos, unpublished), suggesting that the augment on TLR9 expression in PBMCs could be correlated with the augment of TLR9 expression in tumors.

These works together suggest that, although oncogenic HPV proteins inhibit TLR9 expression during infection, TLR9 increases during the progression to the cervical cancer. Importantly, TLR9 could represent a new biomarker for cervical cancer progression since changes in TLR9 can be tracked in periphery.

Hepatitis B Virus (HBV)

HBV is an oncogenic virus that diminished TLR9 expression in pDCs and B cells blocking IFN- α and IL-6 production (80). TLR9 protein was no detectable when assessed in PBMCs of 5 chronic HBV carriers and 6 HBV-associated Hepatocellular carcinoma (HCC) patients (Asian population), in comparison with TLR9 protein expression in controls (80). In accordance with this, TLR9 relative expression in PBMCs was significantly lower in patients with chronic HBV infections (n=60) in comparison with healthy donors (n=60) in an Iranian population (162).

Conversely, other studies have reported that TLR9 is overexpressed in tumor cells from HCC patients (163-165). Interestingly, Liu et al., found that TLR9 is activated in response to mitochondrial DNA (mtDNA) released during hypoxia and that this activation induces the proliferation of tumor cells (163).

Flow citometry analysis of TLR9 protein expression in PBMCs from Chinese patients (n=11) with HCC showed a higher level expression of TLR9 compared with TLR9 levels in healthy controls (n=11). Even more, TLR9 protein increases accordingly the grade of the severity disease (HCC>HBV related liver cirrhosis>chronic HBV infection>healthy donors) (67). Hence, as in the case of HPV and cervical cancer, HVB downregulates TLR9 during infection; however, TLR9 is overexpressed in tumor cells at least in part, because of the hypoxic conditions, suggesting that once the cell is not prone to be killed during the infection, TLR9 inhibition is not longer necessary.

Epstein Barr Virus (EBV)

In vitro, human B cells infected with EBV acquire the capacity of proliferate indefinitely generating the lymphoblastoid cell line (LCL). Evaluation of TLR9 in LCLs have been shown that this cell line have a lower TLR9 expression level than primary B cells without EBV infection, consequently, the production of TNF and IL-6 in LCLs is abolished when cells were stimulated with CpG ODN (166). EBV Latent Membrane Protein 1 (LMP1) is involved in the TLR9 abolishment in RPMI8226 cell and primary B cells infected with EBV in a promoter dependent manner. Furthermore, the downregulation of TLR9 involves the activation of the NF κ B transcription factor mediated by IKK α and IKK β , since the overexpression of dominant negative mutants of each of this proteins restored TLR9 promoter activity (166). Remarkably, LMP1 activates JNK1 and in turn a p73, which positively activate Δ Np73 α (167), suggesting that Δ Np73 α is recruited to the TLR9 promoter as in the case of HPV38 (159).

In the same line, another study reported that EBV downregulates TLR9 at mRNA and protein level and that early lytic protein BGLF5 contributes to this downregulation during a productive EBV infection (168).

EBV is associated with Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, post-transplant lymphoma, nasopharyngeal carcinoma and some forms of gastric carcinomas but TLR9 expression in patients with these types of cancer remains to be assessed.

Merkel cell Polyomavirus

Early proteins of Merkel cell Poliomavirus (MCPyV) inhibit TLR9 expression in a promoter dependent manner (81). Specifically, transient transfection experiments with a reporter TLR9 promoter plasmid showed that LT (Large T antigen) and sT (small T antigen) early expression MCPyV proteins, are the responsible of this inhibition; accordingly, knockdown of this proteins restored significantly the expression of TLR9 in MKL1 (MCPyV-positive MCC line) (81). In the same line, keratinocytes transduced with the early genes of MCPyV and stimulated with a CpG ODN, does not induce the secretion of IL-6, IL-8 and MIP3 α , as in the case of normal keratinocytes. In contradistinction to EBV, MCPyV did not abolish TLR9 expression through the NF κ B signaling pathway but inhibits the transcription of TLR9 through the downregulation of C/EBP α and C/EBP β (81). Moreover, evaluation of the regulation of TLR9 by other members of the Polyomavirus family, showed that BK polyomavirus and JC polyomavirus efficiently diminishes TLR9 expression, as shown in keratinocytes transduced with recombinant retroviruses expressing early proteins, LT and sT from the viruses mentioned before (81). As in the case of HPV and HBV infection, MCPvV proteins diminish TLR9 expression; however, based on the evidences discussed here, it is likely that TLR9 expression is augmented in tumor cells of Merkel cell carcinoma as a result, at least in part, of the hypoxic conditions in solid tumors.

TLR9 in cancer

Regulation of TLR9 expression has also been assessed in cancer unrelated to oncogenic virus. In this regard, two different TLR9 expression profiles have been reported in cancer, probably because of the variations in the stratification of the variables performed for the statistical analysis. For instance, assessment of TLR9 in serum of patients with breast cancer showed a reduction in TLR9 levels as the severity of the disease increased, when comparing the 60 cases of breast cancer with 60 samples of patients with benign breast disease and 60 samples of healthy controls in an Indian population (169). Similarly, higher TLR9 tumor expression in patients with renal cell carcinoma (Finnish population; n=138) was associated with a better prognosis compared with patients with lower TLR9 level expression when evaluated by immunohistochemistry (170).

On the contrary, a study in Austrian population reported that TLR9 expression in breast tumor correlates with Estrogen Receptor (ER) protein expression status. Although no significant differences were found, there was a trend that shown that TLR9 mRNA expression was higher in ER negative samples of patients with breast cancer (n=44) in comparison with TLR9 expression in ER positive samples of patients with breast cancer (n=79) and healthy controls (n=10) (88). Evaluation of TLR9 by stage of the breast cancer, showed higher TLR9 mRNA levels in samples of patients with tumor grade III (n=24) compared with healthy controls (n=10). A similar trend was found in ovarian cancer patients, showing that TLR9 expression was higher in ovarian tumor samples (n=56) in a stage III in comparison with non neoplastic samples (n=30) (88).

In the case of prostate cancer, TLR9 evaluation in samples from patients with prostate cancer and control samples from patients with benign prostate hyperplasia showed that TLR9 was significantly higher in patients with prostate cancer in comparison with controls (Finnish population). Although there was no TLR9 detection in stromal cells in samples of patients with benign prostatic hyperplasia, TLR9 was detected in stromal cells in samples from patients with prostate cancer (171). TLR9 stratification in "low expression" (n=47) and "high expression" (n=22) detected by immunohistochemistry in tumor samples from patients with prostate cancer showed that patients with high TLR9 protein expression have a higher probability of lymph node metastasis and a poor prognosis in a Chinese population (87).

Additionally, TLR9 is overexpressed in tumors from Chinese patients with glioma. Evaluation of TLR9 by immunohistochemistry in normal samples showed a low degree of TLR9 immunoreactivity in normal brain tissue (n=13) but TLR9 protein augments
significantly in a high grade glioma tumor tissue (n=128). Even more, a higher mean of progress free survival (from the date of the surgery to the first MRI-confirmed recurrence or death) was related with lower TLR9 protein expression (n=38) in comparison with the mean of progress free survival in patients with a higher TLR9 expression (n=31) (172).

Finally, a study assessed the TLR9 protein level in serum of 76 Chinese patients with Non Cell Small Lung Cancer (NCSLC), showing a statistically higher TLR9 level in serum from patients with NSCLC compared with TLR9 in serum of 50 healthy donors (68). Considering that changes in TLR9 expression could be detectable in PBMCs or serum in patients with cancer, these works suggest that TLR9 could be used as a biomarker for progression of many types of cancer.

TLR9, cell stress and invasion

The role of TLR9 during cell transformation is not well understood and remains to be elucidated if TLR9 itself promotes the cell transformation or TLR9 up-regulation in cancer is a consequence of cell transformation; evidences until now suggest both scenarios; some works have correlated the up-regulation of TLR9 by means of the cellular stress and many others have shown that TLR9 signals enhance proliferation and tumor cell invasion.

Regarding cell stress, experiments performed in mice showed that chronic physical stress augments the expression of TLR9 in macrophages, leading to the increased production of IL-1β, IL-10 and IL17 cytokines in plasma. Even more, TLR9 induces an enhanced corticosterone hormone (stress hormone) level, in comparison with corticosterone level in TLR9 knockout mice (173). (174). In the same system, TLR9 induces the expression of TNF, IL-4, IL6 and MCP-1 in splenocytic lymphocytes stimulated with Concanavaline A (Con A) (173). Therefore, chronic stress could be associated with immunosupression, imbalance of cytokine production and cancer development in a TLR9 mediated-way. Additionally, DNA damage and p53 expression regulate TLR9; particularly, chemotherapy agents as doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU), ionizing radiation (IR) and Ultraviolet (UV) light induce TLR9 expression in cancer cells in a p53 dependent manner (7, 8). Also, treatment of cancer cells with DNA derived from chemotherapy-killed cancer cells promotes proliferation and invasion (9).

In the other hand, Kirillov *et al.*, showed that prolonged stimulation of normal human fibroblasts (NHF) with TGF- β induces the expression of TLR9. Also, they found that a long CpG stimulus of NHF induces higher MMP-14 expression levels and an increased capacity of invasion in comparison with non stimulated NHFs. Interestingly, NHFs stimulated with CpG had a higher survival capacity under hypoxic conditions (175).

Glioma cell lines and tumor samples express TLR9 and showed a higher proliferation and invasion capability in response to CpG ODN. Whereas that the augment of TLR9 immunoreactivity in patients correlates with the glioma progression (172).

TLR9 expression is induced by hypoxia in glioblastoma cell lines D54MG and U373MG and this event correlate with an increased invasive capacity. Moreover, treatment with a TLR9 siRNA diminishes the invasive capacity of D54MG and U373MG cells and diminishes the expression of MMP2 (Matrix Metalloproteinase-2) and -9 (176).

In the same line, stimulation of breast cancer cells (MDA-MB-231) with CpG ODN induces its invasion capacity in a dose-dependent manner via activation of MMP13; interestingly, non-CpG ODN induced invasion almost in the same extent as CpG ODNs (177).

Results obtained by Tanaka *et al.*, evidenced the expression of TLR9 in the surface of HCC cell lines and suggested an increase of the cell proliferation when cells were stimulated with ODN CpG (178). Also, TLR9 was detectable in the cell surface of colon adenocarcinoma samples and the stimuli of the colon adenocarcinoma cell line SW480 with CpG ODN increased the viability of these cells (179).

These works showed that TLR9 is also activated by mitochondrial, tumor-derived and self-DNA; hence DNA recognition through TLR9 is not restricted to virus o bacterial genetic material. Furthermore, TLR9 up-regulation was associated with cell stress and its activation promotes cell proliferation and invasion.



when they are infected. Also, TLR9 is expressed in the cell surface of transformed cell and can be shed to plasma (B).

Conclusions

It is well accepted that TLR9 is a TLR that recognizes DNA and has a crucial role in initiating and enforcing immune response; such that, many oncogenic DNA virus have developed strategies to inhibit its expression. Nevertheless, TLR9 is associated with other cellular processes as cell stress, proliferation and invasion. Additionally TLR9 is involved in cellular processes not mentioned here, like cell energy modulation and autophagy, also related with the progression of cancer. The TLR9 regulation depends on many factors and it is not known if TLR9 expression is related with cancer as cause or as a consequence, probably both. Independently of the extensive roles of TLR9, the evaluation of TLR9 in precancerous lesions, in PBMCs and plasma could represent a new marker for the cancer progression. Certainly, an extensive research remains to be done.

References

1. Accardi R, Fathallah I, Gruffat H, Mariggio G, Le Calvez-Kelm F, Voegele C, Bartosch B, Hernandez-Vargas H, McKay J, Sylla BS, Manet E, and Tommasino M. Epstein - Barr virus transforming protein LMP-1 alters B cells gene expression by promoting accumulation of the oncoprotein DeltaNp73alpha. *PLoS Pathog* 9: e1003186.

2. Aggarwal R, Misra S, Guleria C, Suri V, Mangat N, Sharma M, Nijhawan R, and Minz R. Characterization of Toll-like receptor transcriptome in squamous cell carcinoma of cervix: A case-control study. *Gynecol Oncol* 138: 358-362, 2015.

3. Berger R, Fiegl H, Goebel G, Obexer P, Ausserlechner M, Doppler W, Hauser-Kronberger C, Reitsamer R, Egle D, Reimer D, Muller-Holzner E, Jones A, and Widschwendter M. Toll-like receptor 9 expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. *Cancer science* 101: 1059-1066, 2010.

4. **Botos I SD, Davies DR**. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure 2011 Apr 13;19(4):447-59*.

5. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, and Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 177: 265-275, 2007.

6. **Cannella F, Pierangeli A, Scagnolari C, Cacciotti G, Tranquilli G, Stentella P, Recine N, and Antonelli G**. TLR9 is expressed in human papillomavirus-positive cervical cells and is overexpressed in persistent infections. *Immunobiology* 220: 363-368.

7. Coch C BN, Wimmenauer V, Hartmann E, Janke M, Abdel-Mottaleb MM, Lamprecht A, Ludwig J, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. Higher activation of TLR9 in plasmacytoid dendritic cells by microbial DNA compared with self-DNA based on CpG-specific recognition of phosphodiester DNA. *J Leukoc Biol 2009 Sep;86(3):663-70.*

8. **Chen J NS, Vidi PA, Irudayaraj J.** Single molecule in vivo analysis of toll-like receptor 9 and CpG DNA interaction. *PLoS One 2011 Apr 4;6(4):e17991*.

9. Chockalingam A, Brooks JC, Cameron JL, Blum LK, and Leifer CA. TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol Cell Biol* 87: 209-217, 2009.
10. Daud, II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, and Moscicki AB. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer* 128: 879-886.

11. **de Jong SD BG, Wilson KD, Kazem M, Cullis P, Jefferies W, Tam Y.** The immunostimulatory activity of unmethylated and methylated CpG oligodeoxynucleotide is dependent on their ability to colocalize with TLR9 in late endosomes. *J Immunol 2010; 184:6092-6102.*

12. **Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, and Chen ZJ**. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103: 351-361, 2000.

13. **Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Rycyzyn MA, Mills J, Sarisky RT, and Mbow ML**. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 72: 7202-7211, 2004.

14. Eiro N, Altadill A, Juarez LM, Rodriguez M, Gonzalez LO, Atienza S, Bermudez S, Fernandez-Garcia B, Fresno-Forcelledo MF, Rodrigo L, and Vizoso FJ. Toll-like receptors 3, 4 and 9 in hepatocellular carcinoma: Relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. *Hepatol Res* 44: 769-778, 2014.

15. **Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M, and Barton GM**. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med* 208: 643-651, 2011.

16. **Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J, Manet E, Tommasino M, Sylla BS, and Hasan UA**. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunol* 185: 6439-6447.

17. **Fehri E, Ennaifer E, Ardhaoui M, Ouerhani K, Laassili T, Bel Haj Rhouma R, Guizani I, and Boubaker S**. Expression of Toll-like receptor 9 increases with progression of cervical neoplasia in Tunisian women--a comparative analysis of condyloma, cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 6145-6150.

18. **Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, and Kolb-Bachofen V**. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin Vaccine Immunol* 15: 138-146, 2008.

19. **Ghosh A, Dasgupta A, Bandyopadhyay A, Ghosh T, Dalui R, Biswas S, Banerjee U, and Basu A**. A study of the expression and localization of toll-like receptors 2 and 9 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Experimental and molecular pathology* 99: 720-724, 2015.

20. Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Maeda N, Ishikawa T, Hoshino K, Uruno T, Cao Q, Higashi S, Kawaguchi Y, Enjoji M, Takayanagi R, Kaisho T, Yoshikai Y, and Fukui Y. Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. *J Exp Med* 207: 721-730, 2010.

21. **Guerrier T, Pochard P, Lahiri A, Youinou P, Pers JO, and Jamin C**. TLR9 expressed on plasma membrane acts as a negative regulator of human B cell response. *J Autoimmun* 51: 23-29, 2014.

22. Haas T MJ, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, Wagner H. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity 2008 Mar;28(3):315-23*.

23. Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Hacker G, Mann M, and Karin M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439: 204-207, 2006.

24. Hasan UA BE, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol 2007 Mar* 1;178(5):3186-97.

25. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, Carreira C, Hussain I, Muller M, Taylor-Papadimitriou J, Picard D, Sylla BS, Trinchieri G, Medzhitov R, and Tommasino M. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* 210: 1369-1387.

26. Hayashi K, Sasai M, and Iwasaki A. Toll-like receptor 9 trafficking and signaling for type I interferons requires PIKfyve activity. *Int Immunol* 27: 435-445, 2015.

27. **Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, and Akira S**. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* 170: 3059-3064, 2003.

28. Hemmi H TO, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature 2000 Dec 7;408(6813):740-5*.

29. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh WC, and Taniguchi T. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15416-15421, 2004.

30. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, and Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168: 4531-4537, 2002.

31. Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, Hemmi H, Ohara O, Akira S, and Kaisho T. IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* 440: 949-953, 2006.

32. Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, and Chen ZJ. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15: 535-548, 2004.

33. Karki K, Pande D, Negi R, Khanna S, Khanna RS, and Khanna HD. Expression of serum tolllike receptor 9 and oxidative damage markers in benign and malignant breast diseases. *DNA and cell biology* 33: 630-636, 2014.

34. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, and Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452: 234-238, 2008.

35. **Kirillov V, Siler JT, Ramadass M, Ge L, Davis J, Grant G, Nathan SD, Jarai G, and Trujillo G**. Sustained activation of toll-like receptor 9 induces an invasive phenotype in lung fibroblasts: possible implications in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 185: 943-957, 2015.

36. Lan F, Yue X, Ren G, Wang Y, and Xia T. Serum toll-like receptors are potential biomarkers of radiation pneumonia in locally advanced NSCLC. *International journal of clinical and experimental pathology* 7: 8087-8095, 2014.

37. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, and Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5: 190-198, 2004.

38. Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocaru G, Shenouda S, Kagnoff M, Eckmann L, Ben-Neriah Y, and Raz E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8: 1327-1336, 2006.

39. Lee JW, Choi JJ, Seo ES, Kim MJ, Kim WY, Choi CH, Kim TJ, Kim BG, Song SY, and Bae DS. Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog* 46: 941-947, 2007.

40. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, and Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 173: 1179-1183, 2004.

41. Li H, Zhao J, Chen M, Tan Y, Yang X, Caudle Y, and Yin D. Toll-like receptor 9 is required for chronic stress-induced immune suppression. *Neuroimmunomodulation* 21: 1-7, 2014.

42. Li S, Strelow A, Fontana EJ, and Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5567-5572, 2002.

43. Liu Y, Yan W, Tohme S, Chen M, Fu Y, Tian D, Lotze M, Tang D, and Tsung A. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. *J Hepatol* 63: 114-121, 2015.

44. **Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, and Iwasaki A**. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198: 513-520, 2003.

45. Luo Y, Jiang QW, Wu JY, Qiu JG, Zhang WJ, Mei XL, Shi Z, and Di JM. Regulation of migration and invasion by Toll-like receptor-9 signaling network in prostate cancer. *Oncotarget* 6: 22564-22574, 2015.

46. **Medzhitov R JCJ**. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol 1998 Feb;10(1):12-5*.

47. **Medzhitov R P-HP, Janeway CA Jr.** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature 1997 Jul 24;388(6640):394-7*.

48. **Mempel M, Voelcker V, Kollisch G, Plank C, Rad R, Gerhard M, Schnopp C, Fraunberger P, Walli AK, Ring J, Abeck D, and Ollert M**. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol* 121: 1389-1396, 2003. 49. **Menendez D, Shatz M, Azzam K, Garantziotis S, Fessler MB, and Resnick MA**. The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLoS Genet* 7: e1001360, 2011.

50. Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E, Chen D, Shackley B, Harris KW, and Selander KS. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res* 4: 437-447, 2006.

51. Mohamed FE, Al-Jehani RM, Minogue SS, Andreola F, Winstanley A, Olde Damink SW, Habtesion A, Malago M, Davies N, Luong TV, Dhillon AP, Mookerjee RP, Dhar DK, and Jalan R. Effect of toll-like receptor 7 and 9 targeted therapy to prevent the development of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 35: 1063-1076, 2015.

52. Nojiri K, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Inagaki Y, Kusagawa S, Ogura S, Tanaka J, Yoneda M, Yamamoto N, Okano H, Takei Y, Ito M, Kasai C, Inoue H, and Takase K. The expression and function of Toll-like receptors 3 and 9 in human colon carcinoma. *Oncology reports* 29: 1737-1743, 2013.

53. Onji M, Kanno A, Saitoh S, Fukui R, Motoi Y, Shibata T, Matsumoto F, Lamichhane A, Sato S, Kiyono H, Yamamoto K, and Miyake K. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. *Nat Commun* 4: 1949, 2013.

54. **Pacini L, Savini C, Ghittoni R, Saidj D, Lamartine J, Hasan UA, Accardi R, and Tommasino M**. Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 and Implications for Cell Cycle Control. *J Virol* 89: 11396-11405.

55. **Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, and Ploegh HL**. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9: 1407-1414, 2008.

56. Pelka K, Phulphagar K, Zimmermann J, Stahl R, Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Spille JH, Labzin LI, Agrawal S, Kandimalla ER, Casanova JL, Hornung V, Marshak-Rothstein A, Honing S, and Latz E. Cutting edge: the UNC93B1 tyrosine-based motif regulates trafficking and TLR responses via separate mechanisms. *J Immunol* 193: 3257-3261, 2014.

57. **Rigby RE WL, Mackenzie KJ, Li Y, Leitch A, Reijns MA, Lundie RJ, Revuelta A, Davidson DJ, Diebold S, Modis Y, MacDonald AS, Jackson AP.** RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. *EMBO J 2014 Mar 18;33(6):542-58.*

58. **Roberts TL SM, Hume DA, Stacey KJ.** Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. *J Immunol 2005 Jan 15;174(2):605-8.*

59. Ronkainen H, Hirvikoski P, Kauppila S, Vuopala KS, Paavonen TK, Selander KS, and Vaarala MH. Absent Toll-like receptor-9 expression predicts poor prognosis in renal cell carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 30: 84, 2011.

60. Sajadi SM, Mirzaei V, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, Daredor HY, Hosseini SM, Moogooi M, Ravary A, Arababadi MK, and Kennedy D. Decreased expressions of Toll-like receptor 9 and its signaling molecules in chronic hepatitis B virus-infected patients. *Arch Pathol Lab Med* 137: 1674-1679, 2013.

61. Sandholm J, Tuomela J, Kauppila JH, Harris KW, Graves D, and Selander KS. Hypoxia regulates Toll-like receptor-9 expression and invasive function in human brain cancer cells in vitro. *Oncol Lett* 8: 266-274, 2014.

62. **Sasai M, Linehan MM, and Iwasaki A**. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* 329: 1530-1534, 2010.

63. Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Muller-Hermelink HK, and Eck M. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in Helicobacter pylori infection. *Clin Exp Immunol* 136: 521-526, 2004.

64. Sepulveda FE, Maschalidi S, Colisson R, Heslop L, Ghirelli C, Sakka E, Lennon-Dumenil AM, Amigorena S, Cabanie L, and Manoury B. Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity* 31: 737-748, 2009.

65. Sester DP NS, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ. Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J Immunol 2000 Oct 15;165(8):4165-73*.

66. Shahzad N, Shuda M, Gheit T, Kwun HJ, Cornet I, Saidj D, Zannetti C, Hasan U, Chang Y, Moore PS, Accardi R, and Tommasino M. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. *J Virol* 87: 13009-13019.

67. Shatz M, Menendez D, and Resnick MA. The human TLR innate immune gene family is differentially influenced by DNA stress and p53 status in cancer cells. *Cancer Res* 72: 3948-3957, 2012.

68. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MB, Kobayashi KS, Glimcher LH, and Cantor H. Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 7: 498-506, 2006.

69. Sugita K KK, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol* 2007 *Jan*;147(1):176-83.

70. Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, Mudd S, Mann N, Sovath S, Goode J, Shamel L, Herskovits AA, Portnoy DA, Cooke M, Tarantino LM, Wiltshire T, Steinberg BE, Grinstein S, and Beutler B. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7: 156-164, 2006.

71. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW, and Taniguchi T. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434: 243-249, 2005.

72. Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Uchida K, Kojima T, and Takei Y. Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 37: 805-814, 2010.

73. **Tuomela J, Sandholm J, Kaakinen M, Patel A, Kauppila JH, Ilvesaro J, Chen D, Harris KW, Graves D, and Selander KS**. DNA from dead cancer cells induces TLR9-mediated invasion and inflammation in living cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 142: 477-487, 2013.

74. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotani T, Kato H, Takeshita F, Matsuda M, Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Takeuchi O, and Akira S. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon-{alpha} induction. *J Exp Med* 201: 915-923, 2005.

75. Vaisanen MR, Vaisanen T, Jukkola-Vuorinen A, Vuopala KS, Desmond R, Selander KS, and Vaarala MH. Expression of toll-like receptor-9 is increased in poorly differentiated prostate tumors. *The Prostate* 70: 817-824, 2010.

76. van Gent M, Griffin BD, Berkhoff EG, van Leeuwen D, Boer IG, Buisson M, Hartgers FC, Burmeister WP, Wiertz EJ, and Ressing ME. EBV lytic-phase protein BGLF5 contributes to TLR9 downregulation during productive infection. *J Immunol* 186: 1694-1702, 2011.

77. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, Zoulim F, Tommasino M, Trepo C, Hasan U, and Chemin I. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 6: e26315.

78. Vollmer J WR, Jurk M, Samulowitz U, McCluskie MJ, Payette P, Davis HL, Schetter C, Krieg AM. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology 2004 Oct;113(2):212-23*.

79. Wang C, Cao S, Yan Y, Ying Q, Jiang T, Xu K, and Wu A. TLR9 expression in glioma tissues correlated to glioma progression and the prognosis of GBM patients. *BMC cancer* 10: 415, 2010.

80. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, and Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412: 346-351, 2001.

81. Wei T GJ, Jamitzky F, Heckl WM, Stark RW, Rössle SC. Homology modeling of human Tolllike receptors TLR7, 8, and 9 ligand-binding domains. *Protein Sci 2009 Aug;18(8):1684-91*.

82. Xiang Y, Yan H, Zhou J, Zhang Q, Hanley G, Caudle Y, LeSage G, Zhang X, and Yin D. The role of toll-like receptor 9 in chronic stress-induced apoptosis in macrophage. *PLoS One* 10: e0123447, 2015.

83. Xu N, Yao HP, Sun Z, and Chen Z. Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. *Acta pharmacologica Sinica* 29: 239-244, 2008.

84. Yu N, Zhang S, Zuo F, Kang K, Guan M, and Xiang L. Cultured human melanocytes express functional toll-like receptors 2-4, 7 and 9. *J Dermatol Sci* 56: 113-120, 2009.

85. Zannetti C, Parroche P, Panaye M, Roblot G, Gruffat H, Manet E, Debaud AL, Plumas J, Vey N, Caux C, Bendriss-Vermare N, and Hasan UA. TLR9 transcriptional regulation in response to double-stranded DNA viruses. *J Immunol* 193: 3398-3408, 2014.

Anexo I





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 <u>VOLUNTARIA</u> y por lo tanto, puede dejar de contestar alguna pregunta, suspender la entrevista o <u>retirarse</u> 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



Anexo II





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

NOMBRE CENTRO DE ATENCIÓN:	Centro	de	Atención	para	la	Salud	de	la	Mu	jer
de los Servicios de Salud del Estado de	Morelos									

No. HISTORIA CLÍNICA:
FECHA TOMA MTRA:
FECHA RECEPCION MTRA EN LAB:
CÓD. LAB:
DATOS PERSONALES:
NOMBRE:
EDAD:
FECHA NACIMIENTO:
TELEFONO CONTACTO:
DIRECCIÓN DOMICILIO:
ESTADO CIVIL:
CUESTIONARIO:
GRUPO ÉTNICO: Blanco 🗌 Indígena 🗌 Otro 🗌
NIVEL SOCIOECONÓMICO: Bajo 🗌 Medio Bajo 🗌 Medio 🗌 Medio Alto 🗌 Alto 🗌
ANTECEDENTES DT2: Si No
ANTECEDENTES HAS: Si No
TIPO DE CANCER:

NIVEL DE CONSANGUINIDAD:
ANTECEDENTES OBESIDAD: Si No
ANTECEDENTES CARDIOVASCULARES: Si No
ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES PARASITARIAS: Si 💭 No
ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES REUMÁTICAS O AUTOINMUNES: Si
ANTECEDENTES ETS: Si No ¿Cuál o (es)?
DISPAREUNIA: Si No
DISURIA: Si No
PRURITO: Si No
RESEQUEDAD VAGINAL: Si No
LEUCORREA: Si No
LAVADO DE GENITALES DESPUÉS DE RELACIONES SEXUALES: Si 🗌 No 🗌
OTROS SINTOMAS: Si No ¿Cuál o (es)?
EMBARAZO ACTUAL TOMA MX: Si No
PROCEDENCIA-NACIONALIDAD:
PROCEDENCIA-NACIONALIDAD PADRES PTE:
PROCEDENCIA-NACIONALIDAD ABUELOS:
GRUPO SANGUÍNEO:
OCUPACION:
NIVEL EDUCATIVO:
ANTECEDENTES DE TABAQUISMO: Si 🗌 No. de cigarrillos No 💭
TABAQUISMO ACTUAL: Si No. de cigarrillos No
ANTECEDENTES DE CONSUMO DE ALCOHOL: Si 🔲 No 🦳
CONSUMO ALCOHOL ACTUAL: Si 📃 No
EDAD MENARCA:
EDAD INICIO VSA:
No. PAREJAS SEXUALES:

EDAD PRIMER PARTO: MÉTODO PLANIF FLIAR: IMC: FECHA ÚLTIMA CITOLOGIA: FECHA ÚLTIMA CITOLOGIA: DX COLPOSCÓPICO: EXPLORACIÓN FÍSICA GINECOLÓGICA- opcional:
MÉTODO PLANIF FLIAR:
IMC:
FECHA ÚLTIMA CITOLOGIA: DX COLPOSCÓPICO: EXPLORACIÓN FÍSICA GINECOLÓGICA- opcional:
DX COLPOSCÓPICO:
EXPLORACIÓN FÍSICA GINECOLÓGICA- opcional:
ANTECEDENTES PCR HPV: Si No
RESULTADO DE CAPTURA DE HIBRIDOS-opcional:
RESULTADO DE CITOLOGÍA:
RESULTADO DE BIOPSIA:
FECHA TIPIFICACION VPH PREVIO:
ANTECEDENTES TTO GINECOLÓGICO:

EDAD PAREJA:	
ESTADO DE SALUD PAREJA:	
RESULTADO PCR HPV PROYECTO:	
FECHA ENTREGA DE RESULTADO AL SSM:	
NOMBRE DE ENTREVISTADOR:	

Anexo III

Procedimiento de llenado de Cuestionario y captura de datos

El profesional encargado de toma de muestra realizó un cuestionario de 42 preguntas estandarizado y validado sobre las características demográficas y socioeconómicas, los antecedentes ginecoobstétricos y la actividad sexual de las mujeres que firmaron la carta de consentimiento. Para evaluar el nivel socioeconómico se construyó un índice que incluyó las siguientes variables: número de contribuyentes al ingreso familiar; situación de la vivienda; materiales de construcción de la vivienda en piso, techo y muros de la vivienda; disponibilidad de cocina y de agua entubada; tratamiento del agua de consumo; forma de eliminación de excretas; disponibilidad de luz eléctrica y número de focos en la vivienda. El índice construido permitió clasificar a los participantes en dos niveles: bajo y medio. La información descrita en el cuestionario fue capturada por el investigador encargado y se generó la base de datos del estudio.

Procedimiento Toma de Muestra

A cada participante se le tomó una muestra sanguínea con material nuevo y estéril (6ml con anticoagulante-EDTA y 5ml sin anticoagulante). De la muestra de sangre sin anticoagulante se extrajo suero. La muestra de exudado de cérvix (citobrush) y biopsia según haya sido el caso, fue tomada por el ginecólogo colposcopista y colocada en un tubo con buffer de fosfatos (PBS 1X) para realizar la prueba de detección del VPH por PCR.

Procedimiento Transporte y almacenamiento de muestras

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

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

Luego de evaluar la integridad del ADN se realizó una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos que flanquean la región L1 de la cápside del VPH y que amplifican un fragmento de 450pb (MY09/MY11), 250pb (LIC1LIC2) y 150pb (GP5+/GP6+), según las indicaciones descritas en los cuadros 1 y 2. Se utilizaron como controles positivos las líneas celulares que expresan VPH-16 (SiHa), VPH-18 (HeLa) y como control negativo H₂O desionizada. El análisis de los productos de amplificación

se realizó mediante electroforesis en geles de acrilamida al 6%, teñidos con bromuro de etidio. El equipo utilizado fue es el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDropTM 1000. Aquellas muestras que amplificaron con los oligonucleótidos anteriormente mencionados, se digirieron con diferentes enzimas de restricción: para los oligonucléotidos (MY09/MY11) 450pb: (Dde1, BamH, Hae111, Hinf1, Pst1, Rsa1); para los oligonucléotidos (LIC1LIC2) 250pb: (Rsa1, Dde1, Hae111, Hinf1, Xba1, Acc1, Pst1) y para los oligonucleótidos (GP5+/GP6+) se esperó una banda de 150 pb.

GENES	C	DESNATUR	ALIZAC	IÓN	ALINEAMIENTO			EXTENSIÓN			
	T(°C)	Tiempo	T(°C)	Tiempo	T(°C)	Tiempo	T(°C)	Tiempo	T(°C)	Tiempo	No. de
		minuto		minuto		minutos		minutos		minuto	ciclos
		s		s						s	
GAPD	94	4	94	1	57	1	72	1	72	5	30
н											
L1C1	95	5	95	1	50	1.5	72	2	72	2	40
MY09	94	5	94	45seg	57	1	72	1.30	72	10	35
GP5	94	4	94	1	40	2	72	1.5	72	4	40

Cuadro 1. Condiciones de PCR para los oligonucleótidos GAPDH, L1C1, MY09 y GP5.

Cuadro 2. Concentraciones de reactivos para la reacción de PCR para los oligonucleótidos GAPDH, L1C1, MY09 y GP5.

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

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

Purificación de PBMCs

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

Extracción de ADN a partir de PBMCs

200 μ l de muestra (linfocitos resuspendidos en PBS) se mezclaron con 400 μ l de solución de lisis y se incubaron a 65°C por cinco minutos. Se adicionaron 600 μ l de cloroformo, se mezcló por inversión (3 a 5 veces) y se centrifugó la muestra a 10,000 rpm por dos minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó la solución de precipitación (720 μ l de H₂O con 80 μ l de solución concentrada). Se mezcló por inversión a temperatura ambiente por 1 a 2 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por dos minutos. La pastilla de ADN resultante se resuspendió en 100 μ l de NaCl al 1.2M y se homogenizó en vórtex. Se adicionó 300 μ l de etanol frío y se precipitó 10 minutos a -20 °C. Se centrifugó por 3 a 4 minutos a 10,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se centrifugó a 10,000 por tres minutos y se secó la pastilla. La pastilla fue resuspendida en 100 μ l de agua estéril.

Cuantificación del ADN

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

Anexo IV

Catálogo	ID	Descripción	Marca
4351368	Hs00152973_m1	Sonda de expresión para TLR9	Life Technologies
4351368	Hs99999901_s1	Sonda de expresión para 18S	Life Technologies
4351368	Hs02800695_m1	Sonda de expresión para HPRT	Life Technologies
4351368	Hs99999043_m1	Sonda de expresión para TNF	Life Technologies
4351368	Hs00961622_m1	Sonda de expresión para IL-10	Life Technologies
4351379	c_230195_10	Sonda de genotipificación para rs187084 (-1486 T/C)	Life Technologies
4351379	c_32645383_10	Sonda de genotipificación para rs5743836 (-1237 T/C)	Life Technologies
4351379	C_2301954_20	Sonda de genotificación (2848G/A)	Life Technologies
SEA709Hu	-	ELISA para TLR9 (Humano)	Cloud-Clone Corp
HSTA00D	-	ELISA para TNF (Humano)	R&D

Anexo V

Instituto Nacional de Salud Pública

No. de Ref. 814.

CI-231.

Cuernavaca, Mor., a 5 de junio del 2009.

Dr. Vicente Madrid Marina Responsable de Proyecto CISEI-INSP Presente

Por medio del presente informo a usted que se registró la aprobación de la Comisión de Bioseguridad del proyecto de investigación titulado: "Polimorfismos de la Región Reguladora del Gen de Interleucina-10 y su asociación con el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres procedentes del estado de Guerrero"; cumpliendo con los requisitos para la Aprobación definitiva de la Comisión de Investigación.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente

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

Ccp. Dra. Ma. de Lourdes García García. Directora Adjunta del CISEI.-Presente. Lic. Raúl Contreras Alcântara.- Director de Administración y Finanzas.- Presente. C.P. Raúl Figueroa Muñoz.- Subdirector de Apoyo Académico del CISEI.-Presente.

Av. Universidad No. 655			
Col. Santa María Ahuacatitlán		Tels	A1 (777) 3703002
62508 Cuernavaca, Morelos		. 0.51	01 (777) 3293079
México	e-mail:elazcano@insp.mx	Fax:	01 (777) 3111148



Comisión de Investigación

2014, AÑO DE OCTAVIO PAZ

Generación de conocimiento para el descuallo de políticas de solad No. de Proyecto 692

Cuernavaca, Mor., a 19 de agosto del 2014.

C. Cecilia Martínez Campos Programa de Doctorado en Salud Pública Área de Concentración en Enfermedades Infecciosas Presente

Por medio del presente informo a usted, que la Comisión de Investigación evaluó su proyecto de tesis titulado: "Evaluación de la asociación de polimorfismos de TLR9 con la espresión e TNF e IL-10 en Lesion Intraepitelial Escamosa (Bajo y alto grado) y cáncer cérvico uterino"; 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

c.c.p. Mtra. Lorena Castillo Castillo.- Jefe del Departamento de Asuntos Escolares INSP.- Presente ELP/MMB/nj

A. Anute Claudia Unibe

10-10-14 2:29 ptur . Alterios tas an older BM Oreada Lee Draw y Caracea Notecia Setto Mario Academica No DD Communica Networks Depart Communica 2012, SP 5000

www.insp.mx



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA COMITÉ DE BIOSEGURIDAD



CBI4-232.

Cuernavaca, Mor., a 24 de julio del 2014.

CB: 77

CECILIA MARTÍNEZ CAMPOS Tesista de Doctorado en Ciencias de la Salud Pública con área de concentración en Enfermedades Infecciosas ESPM-INSP Presente

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el protocolo del proyecto de investigación titulado: "Evaluación de la asociación de polímorfismos de TLR9 con la expresión de TNF e IL-10 en lesión intraepitelial escamosa (bajo y alto grado) y cáncer cervico uterino." el dictamen del Comité de Bioseguridad es: EXENTO DE REVISIÓN; debido a que no propone ninguna metodología en la que se manejen Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) ni CRETI, 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,

- All Marin

Dr. Salvador F. Villalpando Hernández Presidente del Comité de Bioseguridad-INSP

Col, Santa María Ahuacatilián 62508 Cuernavaca, Morelos, México

e-mail: svillalp@insp.mx

A. fruite claudia Unibe 10.10.14 2º 24 our .

Tel-Fax: 01 (777) 3293000 ext 7204 Secretaria Técnica: ext 1525 e-mail: alejondra.confreras@insp.mx



para el desanallo de políticos de salud

Ceneronión de conocimiento



Cuernavaca, Mor., 18 de julio, 2014 Cl: 694

Cecilia Martínez Campos

Doctorado en Ciencias en Salud Pública Área de concentración en Enfermedades Infecciosas Presente.

En relación a su proyecto titulado "EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE TLR9 CON LA EXPRESIÓN DE TNF E IL-10 EN LESIÓN INTRAEPITELIAL ESCAMOSA (BAJO Y ALTO GRADO) Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO" me complace informarle que los miembros del Comité de Ética le han otorgado el dictamen de:

Aprobado

Le informamos que esta aprobación tiene vigencia hasta el 17 de julio del 2015.

Renovación anual: Si su estudio se extiende por un periodo mayor, favor de presentar el formato de *Renovación anual* con 45 días de anticipación a su fecha de vencímiento. Favor de solicitar vía electrónica el formato correspondiente a este Comité. <u>Nota: Es responsabilidad de usted como Investigador/a</u> <u>Responsable de este proyecto solicitar la renovación anual de su estudio con suficiente anticipación.</u>

Consentimiento: Para obtener el consentimiento de los sujetos humanos de su estudio únicamente se deberán utilizar los materiales que han sido aprobados y sellados por este Comité.

Addenda/Modificaciones: Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a este Comité previo a su implementación, utilizando el sistema SIID.

Le agradecemos su cooperación y compromiso con la protección de los derechos de los sujetos humanos en la investigación.

Atentamente

Angélica Ángeles Llerenas

Presidente

ccp.~ Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl. - Coordinadora Doctorado en Ciencias en Enfermedades Infecciosas Mitro. Miguel Ángel Reyes - Depto. Asuntos Escolares

Avertata Sona et anti (5) Centrato, con Roca i Centrato, Licolo da Braca Anaziante (2000 Control, Electro Mesco control (777) 209-600 WEW WELSTINGS, 819-20

Bibliografía

1. Salud Sd. Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer cervico uterino. 2010.

2. Lewis MJ. Análisis de la situación del Cáncer Cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washington: Biblioteca sede OPS, 2004.

3. Hasan UA BE, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. J Immunol 2007 Mar 1;178(5):3186-97.

4. Hasan UA ZC, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, Carreira C, Hussain I, Müller M, Taylor-Papadimitriou J, Picard D, Sylla BS, Trinchieri G, Medzhitov R, Tommasino M. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. J Exp Med 2013 Jul 1;210(7):1369-87

5. Zannetti C, Parroche P, Panaye M, Roblot G, Gruffat H, Manet E, et al. TLR9 transcriptional regulation in response to double-stranded DNA viruses. J Immunol. 2014;193(7):3398-408. Epub 2014/09/07.

6. Huang X YY. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. Expert Opin Ther Targets 2010 Aug;14(8):787-96.

7. Menendez D, Shatz M, Azzam K, Garantziotis S, Fessler MB, Resnick MA. The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. PLoS Genet. 2011;7(3):e1001360. Epub 2011/04/13.

8. Shatz M, Menendez D, Resnick MA. The human TLR innate immune gene family is differentially influenced by DNA stress and p53 status in cancer cells. Cancer Res. 2012;72(16):3948-57. Epub 2012/06/08.

9. Tuomela J, Sandholm J, Kaakinen M, Patel A, Kauppila JH, Ilvesaro J, et al. DNA from dead cancer cells induces TLR9-mediated invasion and inflammation in living cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2013;142(3):477-87. Epub 2013/11/12.

10. Kumagai Y TO, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. Adv Drug Deliv Rev 2008 Apr 29;60(7):795-804.

11. Troutman TD, Bazan JF, Pasare C. Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. Cell Cycle. 2012;11(19):3559-67. Epub 2012/08/17.

12. Wang X LY. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? Acta Pharmacol Sin 2008 Nov;29(11):1275-88.

13. Urry Z XE, Richards DF, McDonald J, Sattar Z, Cousins DJ, Corrigan CJ, Hickman E, Brown Z, Hawrylowicz CM. Ligation of TLR9 induced on human IL-10 secreting Tregs by 1α ,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. J Clin Invest 2009 Feb;119(2):387-98.

14. GLOBOCAN. 2008.

15. Ditzian LR, David-West G, Maza M, Hartmann B, Shirazian T, Cremer M. Cervical cancer screening in low- and middle-income countries. Mt Sinai J Med. 2011;78(3):319-26. Epub 2011/05/21.

16. WHO. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. 2013.

17. Human Papillomavirus and Related Cancers in Mexico. 2010.

18. Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. Int J Infect Dis 2007;Nov(11):Suppl 2:S10-6.

19. Atilade AG, Walker PG. Epidemiology and natural history of preinvasive lesions of the cervix. Journal of Gynecologic Oncology 2007; 12:53-56.

20. Zheng ZM BC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. Front Biosci 2006 Sep 1;11:2286-302.

21. Bodily J LL. Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. Trends Microbiol 2011 Jan;19(1):33-9.

22. Cuzick J SP, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, van Ballegooijen M, van den Akkervan Marle E. A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. Br J Cancer 2000 Sep;83(5):561-5.

23. Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. Indian J Med Res 2009 Sep;130(3):266-76.

24. Doorbar J. The Papillomavirus life cycle. J Clin Virol 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15.

25. Tapia-Conyer R. SE, Kur P., Ruíz-Matus C, Velázquez O. et al. Cáncer Cervicouterino. El Manual de la Salud Pública 2006. p. 687-721.

26. Kanodia S FL, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. Curr Cancer Drug Targets 2007 Feb;7(1):79-89.

27. Horvath CA BG, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. Virol J 2010 Jan 20;7:11.

28. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond) 2006 May;110(5):525-41.

29. Lizano-Soberón M C-GAC-PA. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. Cancerología 4 (2009): 205-216.

30. Cattani P SA, D'Onghia S, Marchetti S, Santangelo R, Vellone VG, Zannoni GF, Fadda G. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. J Clin Microbiol 2009 Jul;47(7):2136-41.

31. Scheurer ME T-LG, Guillaud M, Follen M, Chen Z, Dillon LM, Adler-Storthz K. Correlation of human papillomavirus type 16 and human papillomavirus type 18 e7 messenger RNA levels with degree of cervical dysplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005 Aug;14(8):1948-52.

32. Coquillard G PB, Patterson BK. Quantification of intracellular HPV E6/E7 mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA. Gynecol Oncol 2011 Jan;120(1):89-93.

33. Yang YS S-MK, Darragh TM, Lai Y, Lin JH, Chang TC, et al. Direct human papillomavirus E6 whole-cell enzyme-linked immunosorbent assay for objective measurement of E6 oncoproteins in cytology samples. Clin Vaccine Immunol 2012 Sep;19(9):1474-9.

34. Evans MF PZ, Clark KM, Adamson CS, Ma XJ, Wu X, Wang H, Luo Y, Cooper K. HPV E6/E7 RNA in situ hybridization signal patterns as biomarkers of three-tier cervical intraepithelial neoplasia grade. PLoS One 2014 Mar 13;9(3):e91142.

35. Piersma S. Immunosupressive Tumor Microenvironment in Cervical Cancer Patients. Cancer Microenviron 2011 Dec;4(3):361-75

36. Woodman CB CS, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer 2007 Jan;7(1):11-22.

37. Hibma M. The immune response to papillomavirus during infection persistence and regression. Open Virol J 2012;6:241-8

38. Iwasaki A. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. Nat Rev Immunol 2010 Oct;10(10):699-711

39. Cho YS KJ, Cho M, Cho CW, Lee S, Choe YK, Kim Y, Choi I, Park SN, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. FEBS Lett 2001 Jul 20;501(2-3):139-45.

40. Bermúdez-Morales VH P-ZO, Alcocer-González JM, Moreno J, Madrid-Marina V. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. Mol Med Rep 2011 Mar-Apr;4(2):369-75.

41. Alcocer-González JM BJ, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P, Madrid-Marina V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. Viral Immunol 2006 Summer;19(3):481-91.

42. Peralta-Zaragoza O B-MV, 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 transforming growth factor beta1 promoter throughout Sp1 recognition sequence. Viral Immunol 2006 Summer;19(3):468-80.

43. Ewald SE LB, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM. The ectodomain of Tolllike receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. Nature 2008 Dec 4;456(7222):658-62.

44. Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNAdependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. J Immunol. 2003;170(6):3059-64. Epub 2003/03/11.

45. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(43):15416-21. Epub 2004/10/20.

46. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med. 2003;198(3):513-20. Epub 2003/08/06.

47. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(8):5567-72. Epub 2002/04/18.

48. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. Nature. 2005;434(7030):243-9. Epub 2005/01/25.

49. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature. 2001;412(6844):346-51. Epub 2001/07/19.

50. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell. 2000;103(2):351-61. Epub 2000/11/01.

51. Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, et al. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. Mol Cell. 2004;15(4):535-48. Epub 2004/08/26.

52. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotani T, Kato H, Takeshita F, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9- mediated interferon-{alpha} induction. J Exp Med. 2005;201(6):915-23. Epub 2005/03/16.

53. Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. Science. 2010;329(5998):1530-4. Epub 2010/09/18.

54. Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Maeda N, et al. Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation. J Exp Med. 2010;207(4):721-30. Epub 2010/03/17.

55. Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, et al. Specificity in Tolllike receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. Nature. 2006;439(7073):204-7. Epub 2005/11/25.

56. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MB, Kobayashi KS, Glimcher LH, et al. Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. Nat Immunol. 2006;7(5):498-506. Epub 2006/04/11.

57. Ma L ZG, Hua C, Li X, Zhao X, Sun L, Hou Y. Down-regulation of TLR9 expression affects the maturation and function of murine bone marrow-derived dendritic cells induced by CpG. Cell Mol Immunol 2009 Jun;6(3):199-205

58. Duramad O FK, Chang B, Chan JH, Gregorio J, Coffman RL, Barrat FJ. Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. J Immunol 2005 May 1;174(9):5193-200.

59. Qiao B LB, Yang X, Zhang H, Chu Y, Wang Y, Xiong S. Specific siRNA downregulated TLR9 and altered cytokine expression pattern in macrophage after CpG DNA stimulation. Cell Mol Immunol 2005 Apr;2(2):130-5.

60. Chockalingam A RWn, Hasan M, Ju CH, Leifer CA. Cutting edge: a TLR9 cytoplasmic tyrosine motif is selectively required for proinflammatory cytokine production. J Immunol 2012 Jan 15;188(2):527-30.

61. Sugita K KK, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. Clin Exp Immunol 2007 Jan;147(1):176-83.

62. Fehri E, Ennaifer E, Ardhaoui M, Ouerhani K, Laassili T, Bel Haj Rhouma R, et al. Expression of Toll-like receptor 9 increases with progression of cervical neoplasia in Tunisian women--a comparative analysis of condyloma, cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Asian Pac J Cancer Prev.15(15):6145-50. Epub 2014/08/16.

63. Lee JW, Choi JJ, Seo ES, Kim MJ, Kim WY, Choi CH, et al. Increased toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. Mol Carcinog. 2007;46(11):941-7. Epub 2007/04/19.

64. Ghosh A, Dasgupta A, Bandyopadhyay A, Ghosh T, Dalui R, Biswas S, et al. A study of the expression and localization of toll-like receptors 2 and 9 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. Experimental and molecular pathology. 2015;99(3):720-4. Epub 2015/11/17.

65. Aggarwal R, Misra S, Guleria C, Suri V, Mangat N, Sharma M, et al. Characterization of Tolllike receptor transcriptome in squamous cell carcinoma of cervix: A case-control study. Gynecol Oncol. 2015;138(2):358-62. Epub 2015/05/31.

66. Cannella F, Pierangeli A, Scagnolari C, Cacciotti G, Tranquilli G, Stentella P, et al. TLR9 is expressed in human papillomavirus-positive cervical cells and is overexpressed in persistent infections. Immunobiology. 2015;220(3):363-8. Epub 2014/12/03.

67. Xu N, Yao HP, Sun Z, Chen Z. Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. Acta pharmacologica Sinica. 2008;29(2):239-44. Epub 2008/01/25.

68. Lan F, Yue X, Ren G, Wang Y, Xia T. Serum toll-like receptors are potential biomarkers of radiation pneumonia in locally advanced NSCLC. International journal of clinical and experimental pathology. 2014;7(11):8087-95. Epub 2015/01/01.

69. Daud II SM, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. Int J Cancer 2011 Feb 15;128(4):879-86.

70. Lazarus R KW, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez F, Weiss ST. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. Genomics 2003 Jan;81(1):85-91.

71. Hamann L GC, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. Clin Chim Acta 2006 Feb;364(1-2):303-7

72. Ng MT VtHR, Crockett JC, Hope ME, Berry S, Thomson J, McLean MH, McColl KE, El-Omar EM, Hold GL. Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with Helicobacter pylori-induced gastric disease. Infect Immun 2010 Mar;78(3):1345-52.

73. Chen X WS, Liu L, Chen Z, Qiang F, Kan Y, Shen Y, Wu J, Shen H, Hu Z. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. DNA Cell Biol 2012 May;31(5):766-71.

74. Roszak A LM, Sowińska A, Jagodziński PP. Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. Mol Biol Rep 2012 Aug;39(8):8425-30.

75. Livak K, Marmaro J, Todd JA. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. Nat Genet 1995 Apr;9(4):341-2.

76. Higuchi R, Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. Biotechnology (N Y) 1992 Apr;10(4):413-7.

77. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8. Epub 2008/06/13.

78. Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. Annals of global health. 2014;80(5):384-92. Epub 2014/12/17.

79. Fathallah I PP, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J, Manet E, Tommasino M, Sylla BS, Hasan UA. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. J Immunol 2010 Dec 1;185(11):6439-47.

80. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, et al. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. PLoS One.6(10):e26315. Epub 2011/11/03.

81. Shahzad N, Shuda M, Gheit T, Kwun HJ, Cornet I, Saidj D, et al. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. J Virol.87(23):13009-19. Epub 2013/09/27.

82. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2007;178(5):3186-97. Epub 2007/02/22.

83. Pacini L, Savini C, Ghittoni R, Saidj D, Lamartine J, Hasan UA, et al. Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 and Implications for Cell Cycle Control. Journal of virology. 2015;89(22):11396-405. Epub 2015/09/05.

84. Hao Y, Yuan JL, Abudula A, Hasimu A, Kadeer N, Guo X. TLR9 expression in uterine cervical lesions of Uyghur women correlate with cervical cancer progression and selective silencing of human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins in vitro. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2014;15(14):5867-72. Epub 2014/08/02.

85. Fehri E, Ennaifer E, Ardhaoui M, Ouerhani K, Laassili T, Bel Haj Rhouma R, et al. Expression of Toll-like receptor 9 increases with progression of cervical neoplasia in Tunisian women--a comparative analysis of condyloma, cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2014;15(15):6145-50. Epub 2014/08/16.

86. Zhang Y, Wang Q, Ma A, Li Y, Li R, Wang Y. Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. Oncology reports. 2014;31(5):2298-304. Epub 2014/03/22.

87. Luo Y, Jiang QW, Wu JY, Qiu JG, Zhang WJ, Mei XL, et al. Regulation of migration and invasion by Toll-like receptor-9 signaling network in prostate cancer. Oncotarget. 2015;6(26):22564-74. Epub 2015/06/19.

88. Berger R, Fiegl H, Goebel G, Obexer P, Ausserlechner M, Doppler W, et al. Toll-like receptor 9 expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. Cancer science. 2010;101(4):1059-66. Epub 2010/02/17.

89. Campitelli M, Jeannot E, Peter M, Lappartient E, Saada S, de la Rochefordiere A, et al. Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients. PLoS One. 2012;7(8):e43393. Epub 2012/09/01.

90. Yang HJ, Liu VW, Tsang PC, Yip AM, Tam KF, Wong LC, et al. Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 2004;14(5):903-10. Epub 2004/09/14.

91. Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, Niruthisard S, Mutirangura A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. BMC Cancer. 2001;1:2. Epub 2001/03/13.

92. Shimada T, Yamaguchi N, Nishida N, Yamasaki K, Miura K, Katamine S, et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with HPV16 DNA-positive uterine cervical cancer. Jpn J Clin Oncol. 2010;40(5):420-4. Epub 2010/02/06.

93. Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002;11(1):3-6. Epub 2002/01/30.

94. Doetzlhofer A, Rotheneder H, Lagger G, Koranda M, Kurtev V, Brosch G, et al. Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. Mol Cell Biol. 1999;19(8):5504-11. Epub 1999/07/20.

95. Won J, Yim J, Kim TK. Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. J Biol Chem. 2002;277(41):38230-8. Epub 2002/08/02.

96. Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M, Sasagawa T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. Hum Pathol. 2004;35(11):1376-84. Epub 2005/01/26.

97. Li J, Cheng H, Zhang P, Dong Z, Tong HL, Han JD, et al. Prognostic value of combined serum biomarkers in predicting outcomes in cervical cancer patients. Clin Chim Acta. 2013;424:292-7. Epub 2013/07/16.

98. Torres-Poveda K, Burguete-Garcia AI, Cruz M, Martinez-Nava GA, Bahena-Roman M, Ortiz-Flores E, et al. The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. Infect Agent Cancer. 2012;7(1):32. Epub 2012/11/15.

99. Torres-Poveda K, Burguete-Garcia AI, Bahena-Roman M, Mendez-Martinez R, Zurita-Diaz MA, Lopez-Estrada G, et al. Risk allelic load in Th2 and Th3 cytokines genes as biomarker of susceptibility to HPV-16 positive cervical cancer: a case control study. BMC Cancer. 2016;16(1):330. Epub 2016/05/26.

100. Perez-Figueroa E, Sanchez-Cuaxospa M, Martinez-Soto KA, Sanchez-Zauco N, Medina-Sanson A, Jimenez-Hernandez E, et al. Strong inflammatory response and Th1-polarization profile in children with acute lymphoblastic leukemia without apparent infection. Oncol Rep. 2016;35(5):2699-706. Epub 2016/03/18.

101. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, et al. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. Clin Exp Immunol. 1997;109(3):458-63. Epub 1997/10/27.

102. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740-5. Epub 2000/12/29.

103. Rigby RE, Webb LM, Mackenzie KJ, Li Y, Leitch A, Reijns MA, et al. RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. The EMBO journal. 2014;33(6):542-58. Epub 2014/02/12.

104. Huang X, Yang Y. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. Expert opinion on therapeutic targets. 2010;14(8):787-96. Epub 2010/06/22.

105. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, McDonald J, Sattar Z, Cousins DJ, et al. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. The Journal of clinical investigation. 2009;119(2):387-98. Epub 2009/01/14.

106. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. The Journal of experimental medicine. 2013;210(7):1369-87. Epub 2013/06/12.

107. Chen X, Wang S, Liu L, Chen Z, Qiang F, Kan Y, et al. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. DNA and cell biology. 2012;31(5):766-71. Epub 2011/11/09.

108. Roszak A, Lianeri M, Sowinska A, Jagodzinski PP. Involvement of Toll-like Receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. Molecular biology reports. 2012;39(8):8425-30. Epub 2012/06/21.

109. Lee DH, Hwang NR, Lim MC, Yoo CW, Joo J, Kim JY, et al. Comparison of the performance of Anyplex II HPV HR, the Cobas 4800 human papillomavirus test and Hybrid Capture 2. Annals of clinical biochemistry. 2015. Epub 2015/10/22.

110. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome biology. 2002;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002/08/20.

111. Martinez-Nava GA, Torres-Poveda K, Lagunas-Martinez A, Bahena-Roman M, Zurita-Diaz MA, Ortiz-Flores E, et al. Cervical cancer-associated promoter polymorphism affects akna expression levels. Genes and immunity. 2015;16(1):43-53. Epub 2014/11/07.

112. Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J, et al. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2010;185(11):6439-47. Epub 2010/10/29.

113. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, Norder H, Protzer U, Hainaut P, et al. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. PloS one. 2011;6(10):e26315. Epub 2011/11/03.

114. Shahzad N, Shuda M, Gheit T, Kwun HJ, Cornet I, Saidj D, et al. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. Journal of virology. 2013;87(23):13009-19. Epub 2013/09/27.

115. Loh M, Koh KX, Yeo BH, Song CM, Chia KS, Zhu F, et al. Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: variability in associations according to race. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2009;45(14):2562-8. Epub 2009/04/21.

116. Jin Y. Association of single nucleotide polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha with cervical cancer susceptibility. Cell Biochem Biophys. 2015;71(1):77-84. Epub 2014/07/30.

117. Sun Z, Cui Y, Jin X, Pei J. Association between IL-4 -590C>T polymorphism and gastric cancer risk. Tumour Biol. 2014;35(2):1517-21. Epub 2013/09/28.

118. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2006;364(1-2):303-7. Epub 2005/08/30.

119. Larsson L, Johansson P, Jansson A, Donati M, Rymo L, Berglundh T. The Sp1 transcription factor binds to the G-allele of the -1087 IL-10 gene polymorphism and enhances transcriptional activation. Genes and immunity. 2009;10(3):280-4. Epub 2008/10/10.

120. Wang YL, Tan MS, Yu JT, Zhang W, Hu N, Wang HF, et al. Toll-like receptor 9 promoter polymorphism is associated with decreased risk of Alzheimer's disease in Han Chinese. Journal of neuroinflammation. 2013;10:101. Epub 2013/08/21.

121. Omar AH, Yasunami M, Yamazaki A, Shibata H, Ofori MF, Akanmori BD, et al. Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study. Malar J. 2012;11:168. Epub 2012/05/19.

122. Bharti D, Kumar A, Mahla RS, Kumar S, Ingle H, Shankar H, et al. The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis. Immunogenetics. 2014;66(12):675-81. Epub 2014/09/25.

123. Trejo-de la OA, Torres J, Sanchez-Zauco N, Perez-Rodriguez M, Camorlinga-Ponce M, Flores-Luna L, et al. Polymorphisms in TLR9 but not in TLR5 increase the risk for duodenal ulcer and alter cytokine expression in the gastric mucosa. Innate immunity. 2015;21(7):706-13. Epub 2015/05/23.

124. Medzhitov R JCJ. An ancient system of host defense. Curr Opin Immunol 1998 Feb;10(1):12-5.

125. Medzhitov R P-HP, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 1997 Jul 24;388(6640):394-7.

126. Hemmi H TO, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 2000 Dec 7;408(6813):740-5.

127. Botos I SD, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. Structure 2011 Apr 13;19(4):447-59.

128. Wei T GJ, Jamitzky F, Heckl WM, Stark RW, Rössle SC. Homology modeling of human Tolllike receptors TLR7, 8, and 9 ligand-binding domains. Protein Sci 2009 Aug;18(8):1684-91.

129. Chen J NS, Vidi PA, Irudayaraj J. Single molecule in vivo analysis of toll-like receptor 9 and CpG DNA interaction. PLoS One 2011 Apr 4;6(4):e17991.

130. Sester DP NS, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ. Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. J Immunol 2000 Oct 15;165(8):4165-73.

131. Haas T MJ, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, Wagner H. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. Immunity 2008 Mar;28(3):315-23.

132. Roberts TL SM, Hume DA, Stacey KJ. Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. J Immunol 2005 Jan 15;174(2):605-8.

133. Vollmer J WR, Jurk M, Samulowitz U, McCluskie MJ, Payette P, Davis HL, Schetter C, Krieg AM. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. Immunology 2004 Oct;113(2):212-23.

134. de Jong SD BG, Wilson KD, Kazem M, Cullis P, Jefferies W, Tam Y. The immunostimulatory activity of unmethylated and methylated CpG oligodeoxynucleotide is dependent on their ability to colocalize with TLR9 in late endosomes. J Immunol 2010; 184:6092-6102.

135. Coch C BN, Wimmenauer V, Hartmann E, Janke M, Abdel-Mottaleb MM, Lamprecht A, Ludwig J, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. Higher activation of TLR9 in plasmacytoid dendritic

cells by microbial DNA compared with self-DNA based on CpG-specific recognition of phosphodiester DNA. J Leukoc Biol 2009 Sep;86(3):663-70.

136. Rigby RE WL, Mackenzie KJ, Li Y, Leitch A, Reijns MA, Lundie RJ, Revuelta A, Davidson DJ, Diebold S, Modis Y, MacDonald AS, Jackson AP. RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. EMBO J 2014 Mar 18;33(6):542-58.

137. Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. Clin Vaccine Immunol. 2008;15(1):138-46. Epub 2007/11/06.

138. Yu N, Zhang S, Zuo F, Kang K, Guan M, Xiang L. Cultured human melanocytes express functional toll-like receptors 2-4, 7 and 9. J Dermatol Sci. 2009;56(2):113-20. Epub 2009/09/11.

139. Mempel M, Voelcker V, Kollisch G, Plank C, Rad R, Gerhard M, et al. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. J Invest Dermatol. 2003;121(6):1389-96. Epub 2003/12/17.

140. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol. 2002;168(9):4531-7. Epub 2002/04/24.

141. Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Rycyzyn MA, Mills J, Sarisky RT, et al. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. Infect Immun. 2004;72(12):7202-11. Epub 2004/11/24.

142. Guerrier T, Pochard P, Lahiri A, Youinou P, Pers JO, Jamin C. TLR9 expressed on plasma membrane acts as a negative regulator of human B cell response. J Autoimmun. 2014;51:23-9. Epub 2014/03/04.

143. Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Muller-Hermelink HK, et al. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in Helicobacter pylori infection. Clin Exp Immunol. 2004;136(3):521-6. Epub 2004/05/19.

144. Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. Nat Cell Biol. 2006;8(12):1327-36. Epub 2006/11/28.

145. Onji M, Kanno A, Saitoh S, Fukui R, Motoi Y, Shibata T, et al. An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing. Nat Commun. 2013;4:1949. Epub 2013/06/12.

146. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. Nat Immunol. 2004;5(2):190-8. Epub 2004/01/13.

147. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. J Immunol. 2004;173(2):1179-83. Epub 2004/07/09.

148. Chockalingam A, Brooks JC, Cameron JL, Blum LK, Leifer CA. TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. Immunol Cell Biol. 2009;87(3):209-17. Epub 2008/12/17.

149. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogyo M, Barton GM. Nucleic acid recognition by Tolllike receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. J Exp Med. 2011;208(4):643-51. Epub 2011/03/16. 150. Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, Ploegh HL. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. Nat Immunol. 2008;9(12):1407-14. Epub 2008/10/22.

151. Sepulveda FE, Maschalidi S, Colisson R, Heslop L, Ghirelli C, Sakka E, et al. Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. Immunity. 2009;31(5):737-48. Epub 2009/11/03.

152. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing tolllike receptors to endolysosomes. Nature. 2008;452(7184):234-8. Epub 2008/02/29.

153. Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, et al. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. Nat Immunol. 2006;7(2):156-64. Epub 2006/01/18.

154. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. J Cell Biol. 2007;177(2):265-75. Epub 2007/04/25.

155. Pelka K, Phulphagar K, Zimmermann J, Stahl R, Schmid-Burgk JL, Schmidt T, et al. Cutting edge: the UNC93B1 tyrosine-based motif regulates trafficking and TLR responses via separate mechanisms. J Immunol. 2014;193(7):3257-61. Epub 2014/09/05.

156. Hayashi K, Sasai M, Iwasaki A. Toll-like receptor 9 trafficking and signaling for type I interferons requires PIKfyve activity. Int Immunol. 2015;27(9):435-45. Epub 2015/05/01.

157. Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, Hemmi H, et al. IkappaB kinasealpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. Nature. 2006;440(7086):949-53. Epub 2006/04/14.

158. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. J Exp Med.210(7):1369-87. Epub 2013/06/12.

159. Pacini L, Savini C, Ghittoni R, Saidj D, Lamartine J, Hasan UA, et al. Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 and Implications for Cell Cycle Control. J Virol.89(22):11396-405. Epub 2015/09/05.

160. Daud, II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. Int J Cancer.128(4):879-86. Epub 2010/05/18.

161. Cannella F, Pierangeli A, Scagnolari C, Cacciotti G, Tranquilli G, Stentella P, et al. TLR9 is expressed in human papillomavirus-positive cervical cells and is overexpressed in persistent infections. Immunobiology.220(3):363-8. Epub 2014/12/03.

162. Sajadi SM, Mirzaei V, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, Daredor HY, Hosseini SM, et al. Decreased expressions of Toll-like receptor 9 and its signaling molecules in chronic hepatitis B virus-infected patients. Arch Pathol Lab Med. 2013;137(11):1674-9. Epub 2013/10/31.

163. Liu Y, Yan W, Tohme S, Chen M, Fu Y, Tian D, et al. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. J Hepatol. 2015;63(1):114-21. Epub 2015/02/15.

164. Mohamed FE, Al-Jehani RM, Minogue SS, Andreola F, Winstanley A, Olde Damink SW, et al. Effect of toll-like receptor 7 and 9 targeted therapy to prevent the development of hepatocellular carcinoma. Liver Int. 2015;35(3):1063-76. Epub 2014/07/06.

165. Eiro N, Altadill A, Juarez LM, Rodriguez M, Gonzalez LO, Atienza S, et al. Toll-like receptors 3, 4 and 9 in hepatocellular carcinoma: Relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. Hepatol Res. 2014;44(7):769-78. Epub 2013/06/08.

166. Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J, et al. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. J Immunol.185(11):6439-47. Epub 2010/10/29.

167. Accardi R, Fathallah I, Gruffat H, Mariggio G, Le Calvez-Kelm F, Voegele C, et al. Epstein -Barr virus transforming protein LMP-1 alters B cells gene expression by promoting accumulation of the oncoprotein DeltaNp73alpha. PLoS Pathog.9(3):e1003186. Epub 2013/03/22.

168. van Gent M, Griffin BD, Berkhoff EG, van Leeuwen D, Boer IG, Buisson M, et al. EBV lyticphase protein BGLF5 contributes to TLR9 downregulation during productive infection. J Immunol. 2011;186(3):1694-702. Epub 2010/12/31.

169. Karki K, Pande D, Negi R, Khanna S, Khanna RS, Khanna HD. Expression of serum toll-like receptor 9 and oxidative damage markers in benign and malignant breast diseases. DNA and cell biology. 2014;33(9):630-6. Epub 2014/06/07.

170. Ronkainen H, Hirvikoski P, Kauppila S, Vuopala KS, Paavonen TK, Selander KS, et al. Absent Toll-like receptor-9 expression predicts poor prognosis in renal cell carcinoma. Journal of experimental & clinical cancer research : CR. 2011;30:84. Epub 2011/09/21.

171. Vaisanen MR, Vaisanen T, Jukkola-Vuorinen A, Vuopala KS, Desmond R, Selander KS, et al. Expression of toll-like receptor-9 is increased in poorly differentiated prostate tumors. The Prostate. 2010;70(8):817-24. Epub 2010/01/08.

172. Wang C, Cao S, Yan Y, Ying Q, Jiang T, Xu K, et al. TLR9 expression in glioma tissues correlated to glioma progression and the prognosis of GBM patients. BMC cancer. 2010;10:415. Epub 2010/08/11.

173. Li H, Zhao J, Chen M, Tan Y, Yang X, Caudle Y, et al. Toll-like receptor 9 is required for chronic stress-induced immune suppression. Neuroimmunomodulation. 2014;21(1):1-7. Epub 2013/10/02.

174. Xiang Y, Yan H, Zhou J, Zhang Q, Hanley G, Caudle Y, et al. The role of toll-like receptor 9 in chronic stress-induced apoptosis in macrophage. PLoS One. 2015;10(4):e0123447. Epub 2015/04/18.

175. Kirillov V, Siler JT, Ramadass M, Ge L, Davis J, Grant G, et al. Sustained activation of toll-like receptor 9 induces an invasive phenotype in lung fibroblasts: possible implications in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Pathol. 2015;185(4):943-57. Epub 2015/02/11.

176. Sandholm J, Tuomela J, Kauppila JH, Harris KW, Graves D, Selander KS. Hypoxia regulates Toll-like receptor-9 expression and invasive function in human brain cancer cells in vitro. Oncol Lett. 2014;8(1):266-74. Epub 2014/06/25.

177. Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E, et al. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. Mol Cancer Res. 2006;4(7):437-47. Epub 2006/07/20.

178. Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K, et al. Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. Int J Oncol. 2010;37(4):805-14. Epub 2010/09/03.

179. Nojiri K, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Inagaki Y, Kusagawa S, et al. The expression and function of Toll-like receptors 3 and 9 in human colon carcinoma. Oncology reports. 2013;29(5):1737-43. Epub 2013/03/08.