



**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN REGULADORA DE
LOS GENES DE CITOCINAS Th2 y Th3 CON INFECCIÓN PERSISTENTE POR
EL VPH EN MUJERES MEXICANAS.**

**Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud en
Enfermedades Infecciosas**

**JOCSAN ALEJANDRO FLORES POLANCO
Generación 2016-2018**

**Directora de Tesis: Dra. Kirvis Janneth Torres Poveda
Asesor de Tesis Dr. Vicente Madrid Marina
Asesora) de Tesis Dra. Gabriela Martínez Nava**

Cuernavaca, Mor. Julio de 2018

“Aprendí que el coraje no era la ausencia de miedo, sino el triunfo sobre él. El valiente no es el que no siente miedo, sino el que vence ese temor.”

Nelson Mandela

DEDICATORIA

A Dios por permitirme recorrer un nuevo camino y sobre todo por la fuerza que me dio para dar cada paso.

A mi madre que con su sola presencia siempre me inspiro fuerza y valor para continuar firme en mi sueño.

A mi hermana, mi hermano y mi sobrino que siempre han estado ahí para impulsarme y motivarme a seguir avanzando.

A Diego por estar en cada circunstancia y momento que viví desde que inicie este camino.

A mi padre por ser mi ejemplo de perseverancia y compromiso.

A mis amigas; Liz y Karen que siempre estuvieron junto a mí para extenderme su mano.

A la Dra. Kirvis Janeth por confiar en mí para desarrollar este proyecto y por su incansable apoyo, orientación y guía durante mi estancia en el Instituto.

Al Dr. Vicente Madrid por abrirme la puerta de su grupo de investigación.

A mis amigas; Fabi, Moni y Fer que me ofrecieron su amistad incondicional y siempre recibí su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

ÍNDICE	PÁGINA
1. Resumen	9-10
2. Introducción	11-12
3. Planteamiento del problema y/o pregunta(s) de investigación	13
4. Marco teórico	14
Epidemiología	14
Agente infeccioso	15
Genoma viral	15
Ciclo de replicación	15
Fases de infección por VPH	16-17
Infección persistente por el VPH	18
Factores de riesgo para infección persistente por el VPH	18-20
Expresión de citocinas en infección por VPH en cérvix	20-21
Polimorfismos de citocinas en infección por VPH	21-24
5. Justificación	25
6. Hipótesis	26
7. Objetivos (general y específicos)	26
8. Material y métodos	27
Diseño del estudio	27
Población de estudio y tamaño de muestra del presente proyecto de tesis	28
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para el presente proyecto de tesis	29
Llenado de cuestionario y captura de datos en el estudio basal de la cohorte	29
Procedimiento de toma de muestra en el estudio basal y primera toma de seguimiento	30
Procedimiento de transporte y almacenamiento de muestras en el estudio basal y primera toma de seguimiento	30

Operacionalización de la variables del presente estudio	31-34
Metodología experimental, objetivo número 1	34
Detección de VPH por Seegene	34
Definición de casos de persistencia y eliminación viral	35
Extracción de ARN de exudado de cérvix	35
Cuantificación de ARN de exudado de cérvix	36
Síntesis de Ácido Desoxirribonucleico complementario (cDNA)	36
Análisis de la expresión del ARNm para cada una de las citocinas a nivel del cérvix	37
Objetivo número 2	38
Objetivo número 3	38
Purificación de células mononucleares de sangre	38
Extracción de ADN de CMSP	39
Cuantificación del ADN extraído de CMSP	39
Criterios para la selección de SNP's a evaluar	40
Discriminación Alélica	40
Objetivo número 4	41
9. Resultados	43
Características generales de la población	43
Genotipificación	45
Persistencia de VPH	48-51
Niveles de expresión del ARNm de citocinas a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH	52-55
Análisis de los polimorfismos en región promotora -590 IL-4, -573 IL-6, -592,-819,-1082IL-10, -509 TGF- β 1, -380 TNF- α y -1615 IFN- γ	56-61
10. Discusión	62
Factores de riesgo asociados a infección por el VPH a nivel del Cérvix	62

Persistencia del VPH en el primer año de seguimiento de la cohorte	63
Eliminación del VPH en el primer año de seguimiento de la cohorte	64
Niveles de expresión del ARNm de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH	64-72
Asociación de los polimorfismos en región promotora -590IL-4, -573IL-6, -592, -819, -1082IL-10, -509TGF- β 1, -308TNF- α y -1615IFN- γ .	72-83
11. Conclusiones	84
12. Limitaciones del estudio	85
13. Consideraciones éticas y de bioseguridad	86
14. Recursos humanos, materiales y financiamiento	87
15. Bibliografía	88
16. Anexos	97
Anexo 1. Consentimiento informado	97-99
Anexo 2. Cuestionario	100-103
Anexo 3. Carta de aprobación del comité de Investigación del proyecto madre	104
Anexo 4. Carta de aprobación del comité de ética en investigación del proyecto madre	105
Anexo 5. Carta de aprobación de bioseguridad del proyecto madre	106
Anexo 6. Carta de aprobación del comité de ética en investigación del proyecto actual	107
Anexo 7. Carta de aprobación del comité de bioseguridad del proyecto actual	108
Anexo 8. Carta de aprobación del comité de investigación del proyecto actual	109

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	PÁGINA
Figura 1. Fases de infección por el VPH	17
Figura 2. Factores etiológicos para la infección persistente por el VPH	20
Figura 3. Expresión de citocinas ante infección incidente por el VPH y en CaCU.	21
Figura 4. Diagrama consort	42
Figura 5. Distribución de genotipos de VPH por riesgo en toma basal	45
Figura 6. Distribución de genotipos de VPH por riesgo en primer año de seguimiento.	46
Figura 7. Prevalencia de VPH por genotipo en toma basal	46
Figura 8. Prevalencia de VPH por genotipo en primer año de Seguimiento	47
Figura 9. Persistencia genotipo específico de VPH al primer año de seguimiento de la cohorte	48
Figura 10. Eliminación genotipo específico de VPH al primer año de seguimiento de la cohorte	49
Figura 11. Incidencia genotipo específico de VPH en primer año de Seguimiento	49
Figura 12. Persistencia general de VPH en la población de estudio	50
Figura 13. Eliminación general de VPH en la población de estudio	51
Figura 14. Expresión de citocinas en casos de persistencia de VPH	52
Figura 15. Expresión de citocinas en casos de eliminación de VPH	53
Cuadro 1. Operacionalización de las variables	31
Cuadro 2. Características generales de la población de estudio	43
Cuadro 3. Análisis entre persistencia del VPH y genotipo de VPH por riesgo	50
Cuadro 4. Análisis entre persistencia del VPH y genotipo de VPH por riesgo	51
Cuadro 5. Diferencia estimada de medias de cada citocina	55
Cuadro 6. Análisis de asociación de los SNPs con persistencia por VPH	57

RESUMEN

En lesiones precancerosas del cérvix y en cáncer cervicouterino (CaCU) se ha identificado un estado de inmunosupresión, caracterizado por un aumento de la expresión de las interleucinas tipo II (IL-4, IL-10, supresoras de la respuesta inmune celular) y una concomitante reducción de las interleucinas tipo I (IL-2, INF- γ), el cual favorece la persistencia de la infección por el VPH.

Recientemente nuestro grupo de investigación publicó la asociación de polimorfismos de la región promotora de citocinas Th2 y Th3 como factores de riesgo para el desarrollo de CaCU. Esto ha permitido postular un perfil genético de respuesta inmune (Th2-Th3), implicado en la susceptibilidad a CaCU. Sin embargo, este perfil fue definido en estudio transversal y se requiere de un estudio de cohorte para definir si este perfil genético favorece la persistencia viral. Así, en la presente investigación se analizó la asociación de polimorfismos de la región reguladora de los genes -590C>T (IL-4), -573G>C (IL-6), -592C>A (IL-10), -819C>T (IL-10), -1082A>G (IL-10), -509C>T (TGF- β 1), -308G>A (TNF- α) y -1615C>T (IFN- γ) con el fenotipo de persistencia de VPH en cérvix en el primer año de seguimiento de una cohorte de mujeres VPH positivas.

Este estudio está anidado al proyecto de investigación titulado: “Las citocinas inmunosupresoras Th2 y Th3 como predictores de persistencia viral y progresión a lesión pre-maligna en cérvix en mujeres infectadas con VPH-AR: estudio de cohorte”, en el cual se cuenta con un estudio basal donde se definieron grupos de seguimiento por tres años de mujeres VPH positivas y que fueron evaluadas a los 12 meses para determinar persistencia de infección por VPH. Dicho proyecto cuenta con la aprobación de las comisiones de ética en investigación, investigación y bioseguridad del INSP y con financiamiento por parte del Fondo Sectorial en Salud de CONACyT.

En la presente propuesta de investigación se realizó la evaluación de los polimorfismos descritos a través de discriminación alélica con sondas Taqman en muestras de CMSP del banco de biológicos construido en la cohorte donde esta anidado este estudio y se realizó análisis bivariado y de regresión logística para determinar la asociación estadística de estos polimorfismos con los fenotipos de persistencia y eliminación de VPH ajustando por posibles confusores, observando que ser portador del polimorfismo -573G>C (IL-6), -380G>A (TNF- α) o 1615C>T (IFN- γ) es un factor de riesgo para persistencia de infección por el VPH, mientras que ser portador del polimorfismo -590 C>T (IL-4) confiere protección contra persistencia de infección de VPH. Las pacientes portadoras del polimorfismo -509C>T (TGF- β 1) mostraron protección contra la eliminación del VPH y los polimorfismos -592C>A, -819C>T y -1082A>G (IL-10) no mostraron significancia estadística para los fenotipos de persistencia o eliminación de VPH.

Las asociaciones encontradas al primer año de seguimiento para los polimorfismos -573G>C (IL-6), -380G>A (TNF- α) o 1615C>T (IFN- γ) sugieren que estos tres SNPs son potenciales predictores de mayor riesgo para infección persistente del VPH. Lo que podría formar parte de marcadores pronósticos de persistencia del VPH que permita identificar a mujeres con potencial de infección persistente y progresión a lesión premaligna con el objetivo de disminuir la sobrecarga asistencial actual de diagnóstico y tratamiento y mejorar la estrategia de prevención del CaCU.

INTRODUCCIÓN

La prevalencia a nivel mundial de infección por virus de papiloma humano (VPH) en mujeres sin anomalías de cuello uterino es de 11 a 12%. Asimismo, se conoce que existe una distribución de VPH edad específico con un pico en mujeres menores de 25 años y un rebote en mujeres mayores de los 45 años. Los principales genotipos de VPH en el mundo y México para infecciones persistentes a nivel de cérvix son el 16 y 18, lo que explica la relación de la carga de infección por VPH y CaCU. (1,2)

El agente causal es el Virus de Papiloma Humano (VPH), el cual no está envuelto y cuya cápside está compuesta por 72 capsómeros y presenta las proteínas estructurales L1 y L2 que recubren su genoma, el cual se compone por una doble cadena de ADN de 7200 a 8000 pares de bases. Se sabe que el genoma comprende tres regiones de lectura encargadas de sintetizar proteínas necesarias para su ciclo de replicación. Actualmente se considera que las infecciones por VPH tienden a revertir como consecuencia de una respuesta adecuada por parte del sistema inmune; sin embargo, hay infecciones que no son eliminadas totalmente lo que lleva a una persistencia viral. (3,4)

Existen diferentes factores de riesgo relacionados con la persistencia de la infección por VPH dentro de los que destacan: las infecciones por genotipos oncogénicos; el número de parejas sexuales donde a mayor número, mayor exposición a genotipos de VPH que facilitan la co-infección y pueden desencadenar persistencia viral; la edad; el tabaquismo; el uso de anticonceptivos orales y, finalmente, una respuesta inmune baja. Por su parte, en un estudio reciente de nuestro grupo evaluando lesiones escamosas intraepiteliales (LEI) y cáncer cervicouterino (CaCU) se propuso que existe un estado de inmunosupresión a nivel del cérvix, caracterizada por el aumento de la expresión de las citocinas tipo II (IL-4, IL-10, etc.) y una reducción de las citocinas tipo I (IL-2, INF- γ). Asimismo se sugiere que este perfil de expresión es regulada por

polimorfismos de la región promotora de los genes que codifican para estas citocinas y que favorecen estados de persistencia viral, además de que oncoproteínas del VPH pueden regular a su vez la expresión de ciertas citocinas en el microambiente del cérvix, como IL-10 y TGF- β 1. (4) Sin embargo, es necesario validar si estos polimorfismos reportados como asociados en estudios transversales para LEI y CaCU, pueden condicionar la persistencia del VPH en estudios longitudinales y si la persistencia del VPH es causa o consecuencia de la desregulación inmune a nivel del cérvix.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La gran mayoría de las mujeres infectadas por algún tipo de HPV oncogénico a nivel del cérvix nunca presentan CaCU, debido a que una respuesta inmune adecuada es capaz de controlar la infección por el VPH (Virus del Papiloma Humano) y evitar la progresión a lesión precancerosa. En lesiones precancerosas del cérvix y en cáncer cervicouterino (CaCU) se ha sugerido la presencia de un estado de inmunosupresión local, caracterizado por un aumento de la expresión de las interleucinas tipo II (IL-4, IL-10, supresoras de la respuesta inmune celular) y una concomitante reducción de las interleucinas tipo I (IL-2, INF- γ), el cual favorece la persistencia de la infección por el VPH.

Investigaciones recientes sugieren la asociación de polimorfismos de la región promotora de citocinas Th2 y Th3 como factores de riesgo para el desarrollo de CaCU. Esto ha permitido postular un perfil genético de respuesta inmune (Th2-Th3), implicado en la susceptibilidad a CaCU. Sin embargo, se requiere de estudios longitudinales para confirmar si polimorfismos de la región reguladora de los genes -590C>T (IL-4), -573G>C (IL-6), -592C>A (IL-10), -819C>T (IL-10), -1082A>G (IL-10), -509C>T (TGF- β 1), -308G>A (TNF- α) and -1615C>T (IFN- γ) se asocian como biomarcadores inmunológicos de persistencia de infección por el VPH en cérvix.

¿Existe asociación de la expresión del ARNm de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ a nivel de cérvix en fenotipos de persistencia y eliminación viral?

¿Existe asociación de los polimorfismos en la región reguladora de los genes IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ con infección persistente por VPH?

MARCO TEÓRICO

EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia mundial reportada para la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) en mujeres que no presentan patología a nivel de cérvix es de 11 a 12%, se conoce que las tasas más altas se presentan en el África subsahariana con un 24%, seguido de Europa del este y América latina con 21% y 16% respectivamente; sin embargo, esta prevalencia muestra un aumento en relación al grado de lesión a nivel de cérvix. Existe una prevalencia alta de variantes del VPH 16 y 18 con potencial oncogénico lo que explica la prevalencia de la infección por este agente y el cáncer. Un estudio publicado en el año 2014 menciona que la distribución VPH edad específico muestra un aumento en edades jóvenes en comparación de edades avanzadas; así mismo, se reporta que los genotipos de VPH más prevalentes son el VPH 16 (3.2%), VPH 18 (1.4%), VPH 52 (0.9%), VPH 31 (0.8%) y VPH 58 (0.7%). (1)

En México, un estudio publicado en 2015 reporta que la prevalencia de VPH tipo específico en mujeres con citología normal es de 6.2% para VPH 16, 5.4% para VPH 59, 2.6% para VPH 18 y 1.8% para VPH 31, esto es de gran importancia debido a que el VPH 16 se encuentra en 57% de los casos de cáncer cervicouterino (CaCU). Un metaanálisis evaluó la prevalencia de VPH en el centro, norte, y sur de México a partir de 8706 casos. En esta revisión se identificaron con mayor frecuencia los genotipos 16, 58, 18 y 33 del VPH en el norte de México, en el centro del país se registran los genotipos 16, 18, 45 y 58 del VPH, mientras que en la región sur los genotipos 16, 18, 31 y 58 del VPH. Estos datos son de gran importancia para el diseño de políticas encaminadas a prevenir la infección por VPH a nivel poblacional. (2)

AGENTE INFECCIOSO

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, mide 55nm, es un virus no envuelto, presentan una cápside compuesta por 72 capsómeros (de los cuales 60 son hexámeros y 12 pentámeros), en la cual se encuentran las proteínas estructurales L1 y L2 que recubren al genoma del virus. El genoma del VPH está compuesto por una doble cadena de ADN de 7200 a 8000 pares de bases, se conocen más de 10 marcos de lectura abiertos (ORFs) y por lo general una de sus hebras es transcripcionalmente activa. (3)

Genoma Viral

Diversos estudios describen el genoma del VPH dividido en tres regiones, la primera de ellas conocida como región temprana (E: Early) encargada de codificar para los genes E1-E8 que participan en la replicación y mantenimiento del genoma del virus; la segunda, conocida como región tardía (L: Late) que codifica para proteínas estructurales de la cápside L1 y L2 y la tercera, región larga de control (LCR: Long Control Region) en la que se encuentran los sitios que regulan la transcripción y replicación del genoma viral. Se conocen más de 200 genotipos del VPH de los cuales 18 son clasificados como “alto riesgo” por su gran potencial oncogénico. Es bien conocido que los genotipos 16y 18 del VPH se relacionan con más del 75% de los casos de CaCU. (5)

Ciclo de replicación

El virus ingresa por una micro lesión presente en las células basales del epitelio, a su ingreso se activa un mecanismo de endocitosis que utiliza clatrininas y heparán sulfato reguladas por la proteína estructural L2. El genoma del virus permanece como un elemento extracromosomal llamado episoma, la replicación de su material genético se da en el interior de las células basales y parabasales con el objetivo de mantener 50 a 100 copias de su genoma. Tanto la proteína E1 como

E2 se expresan para conservar el genoma viral en forma episomal, lo que facilita la adecuada segregación del material genético durante la división celular. En el proceso de división de las células infectadas, una de las células hijas permanece a nivel basal y la otra inicia la diferenciación dirigiéndose a la parte superior del epitelio. (5)

En un subgrupo de células pertenecientes a las capas superiores del epitelio se lleva a cabo la amplificación del genoma viral y es en esta etapa necesaria la activación del promotor dependiente de la diferenciación, presente en el ORF de E7, para poder aumentar los niveles de E1, E2, E4 y E5, proteínas virales fundamentales para la replicación. Finalmente, una vez que el genoma viral ha sido amplificado, las proteínas de la cápside L1 y L2 se acumulan en la superficie del epitelio para poder realizar el ensamblaje. Al ser un virus no lítico, las partículas virales son liberadas hasta que alcanzan la superficie por medio de la interacción de E4 que se encarga de desestabilizar los filamentos de citoqueratina. (5)

FASES DE INFECCIÓN POR VPH

Las fases de la infección por VPH se presentan en la Figura 1.

Infección activa: Es un reflejo de la expresión controlada y regulada de proteínas virales en aquellas células que presentan integración del genoma viral. Tanto la amplificación del genoma viral en las capas medias del epitelio, como la expresión de las proteínas L1 y L2 en la superficie, facilitan el ensamblaje y su posterior liberación. Mientras las células basales mantienen el genoma viral en forma episomal para generar un número de copias bajo y por lo tanto una expresión baja del virus, las células de la superficie sin inhibición de E6 y E7 entran en el ciclo celular; los linfocitos T se encuentran en reposo y las células de Langerhans en la parte inferior del epitelio permiten la infección. (1)

Regresión inmune: Caracterizada por la presentación del antígeno al sistema inmunológico con la participación de las células de Langerhans, seguida de acumulación de Linfocitos CD4+ y CD8+ en el interior y alrededor de la lesión.(1)

Latencia: En esta etapa se presenta una proliferación de células basales que contienen al genoma del virus, con expresión anormal de los genes virales y diversos cambios en la expresión de los genes en las células basales, responsables de un número de copias bajo del genoma a nivel de la lesión. Así mismo, la replicación del VPH puede persistir largo tiempo debido al largo periodo de vida de las células madre. (1)

Reactivación de la latencia: Un mecanismo esencial para el mantenimiento del genoma viral en estado latente es la respuesta adecuada del sistema inmune con la presencia de linfocitos T circulantes en el epitelio, que evitan la expresión extensa del genoma del VPH; por lo que un estado de inmunosupresión podría generar un aumento en el número de copias relacionadas con lesiones a nivel de cérvix. (1)

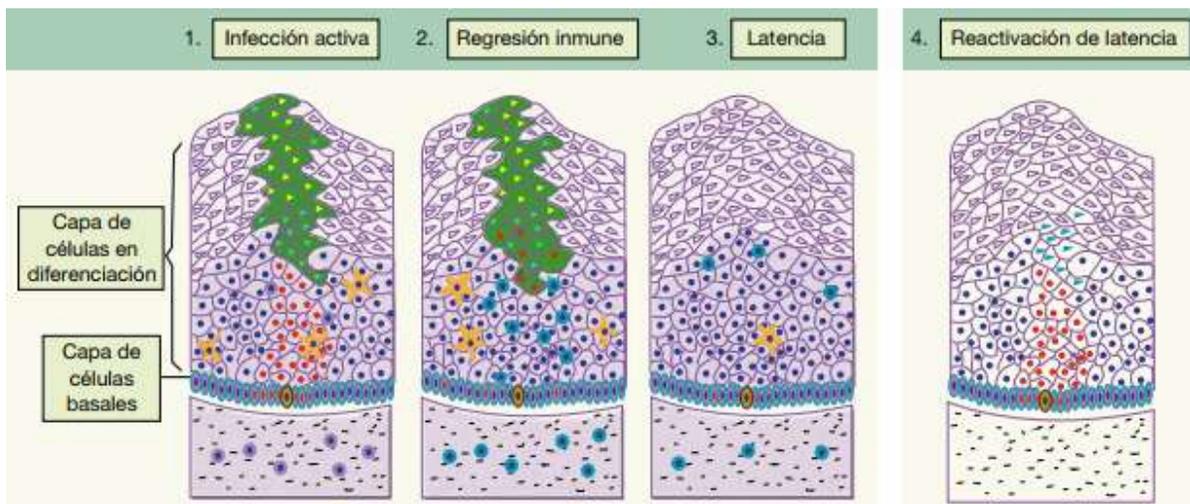


Figura 1. Fases de infección por el VPH. Adaptada de Maglennon GA et al. Torres-Poveda KJ, Cruz-Valdez A, Madrid-Marina V. Epidemiología del cáncer cervicouterino. Gac Mex Oncol. 2014;13(4):4-17.

INFECCIÓN PERSISTENTE POR EL VPH

Durante el período de latencia, el VPH puede evadir la respuesta inmune y establecerse una infección persistente, en este contexto es esencial la ausencia de viremia acompañada de niveles de expresión de proteínas virales bajos lo que favorece la ausencia de inflamación y resulta en inactivación del sistema inmune; sin embargo, en las situaciones en donde se presenta una respuesta inmune por parte del hospedero esta es generalmente baja debido a que el virus se limita a las células basales del epitelio, en donde la expresión de proteínas virales es mínima. Aunado a esto, al ser un virus no lítico favorece una respuesta inmune baja que permite la persistencia viral, por lo tanto la respuesta inmune se activará únicamente en presencia de lesiones de grados superiores. (4,6)

FACTORES DE RIESGO PARA INFECCIÓN PERSISTENTE POR EL VPH

Un artículo publicado en 2017 sobre los factores de riesgo para la infección persistente de VPH refiere que existen diversos factores asociados con este estado, destacan el **tabaquismo**; uso de **anticonceptivos orales** debido a que disminuye la viscosidad del moco a nivel del cérvix lo que favorece la persistencia de la infección por este agente; el **comportamiento sexual** que tiene un papel fundamental dado que a mayor número de parejas sexuales mayor exposición al virus y a su vez mayor riesgo de co-infección por múltiples genotipos de VPH. Por otro lado la **edad** es fundamental ante una infección persistente debido a que la respuesta del sistema inmunológico muestra más eficacia en edades jóvenes que en edades avanzadas, por lo que es frecuente que una infección con un **genotipo oncogénico** suela revertir en edades inferiores a 35 años y persistir en edades superiores a esta. (6,7) (Figura 2)

Sistema inmune: Generalmente el sistema inmune produce una respuesta adecuada ante la infección por VPH, que controla e interrumpe su evolución; sin embargo, algunas infecciones no son eliminadas totalmente lo que lleva a

persistencia viral y a un aumento del riesgo de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado que pueden evolucionar a CaCU. Se estima que hasta el 90% de las infecciones por el VPH a nivel del cérvix pueden eliminarse por una respuesta inmune adecuada en mujeres jóvenes. (7)

Está documentado que la respuesta inmune es esencial ante la incidencia y progresión de infecciones por el VPH, con un aumento en los casos en personas inmunodeprimidas; no obstante, el ciclo de replicación del propio virus es por sí mismo un mecanismo de evasión de la respuesta inmune ya que como se mencionó, la infección y multiplicación del genoma viral se da principalmente en los queratinocitos en forma episomal, con la expresión de proteínas estructurales solo en capas superficiales del epitelio; así mismo la muerte de los queratinocitos se da en forma natural por lo que no se genera una señal de alarma o de estrés celular, sumado a esto el VPH no presenta efectos citopáticos por lo que las señales de inflamación no son suficientes para generar una respuesta inmune altamente eficaz. (8)

Aún y en ausencia de lisis celular o activación de células del sistema inmune una infección persistente por VPH, debería de inducir la expresión de interferón (IFN) tipo 1 y en consecuencia el bloqueo de la evolución de la infección al inhibir la síntesis de proteínas, la angiogénesis y la activación de una respuesta específica; sin embargo, el VPH suprime la activación del gen que codifica para el IFN tipo 1 al inhibir su expresión a través de las oncoproteínas E6 y E7, lo que permite el establecimiento de una infección persistente con diversidad de efectos en las células infectadas. Por otro lado, se ha documentado que así como la respuesta inmune innata juega un papel relevante como primera barrera en el control de una infección por VPH, una respuesta inmune adaptativa eficiente caracterizada por la expresión de moléculas de la respuesta inmune celular y humoral es fundamental para evitar el establecimiento de la persistencia viral. (7,8)

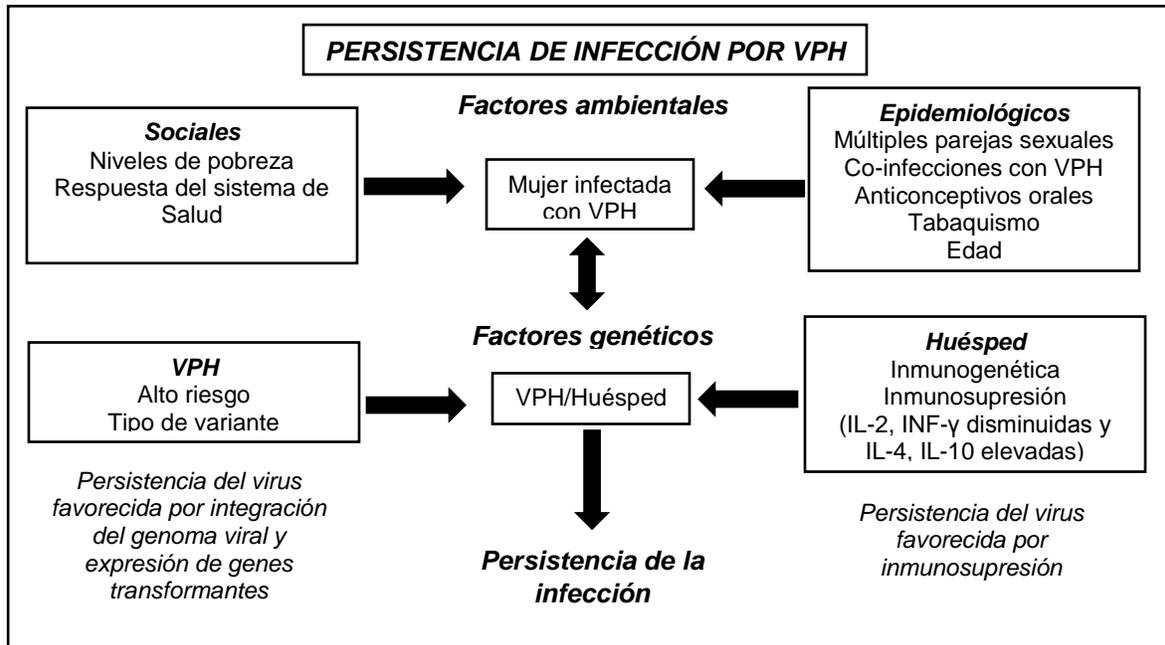


Figura 2. Factores etiológicos para la infección persistente por el VPH. Adaptada de Torres-Poveda KJ, Burguete A, Bermúdez VH, Madrid-Marina V. La infección por el virus del Papiloma humano y cáncer cervicouterino: una perspectiva de salud pública. Revista de Investigación Clínica 2008, 60 (5): 414-420.

EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN INFECCIÓN POR VPH EN CÉRVIX

En lesiones precancerosas del cérvix y CaCU se ha identificado un estado de inmunosupresión, caracterizado por un aumento de la expresión de las interleucinas tipo II (IL-4, IL-10) y una concomitante reducción de las interleucinas tipo I (IL-2, Interferón gamma (INF- γ)). Existe un cambio a un perfil de expresión predominante de citocinas Th2 en la evolución hacia CaCU, evidenciado por aumento en la concentración de citocinas Th2 en suero, a su vez existe una disminución en las cadenas CD3 zeta en linfocitos T infiltrantes de tumor a medida que la lesión progresa, esto ha sido explicado por la reducción de citocinas Th1 en etapas finales de la lesión y enfermedad. Así mismo, hay estudios que demuestran una respuesta inmune deteriorada inducida por IL-10 y TGF- β 1 implicada en persistencia de la infección por VPH y la evolución a CaCU. (4) (Figura 3)

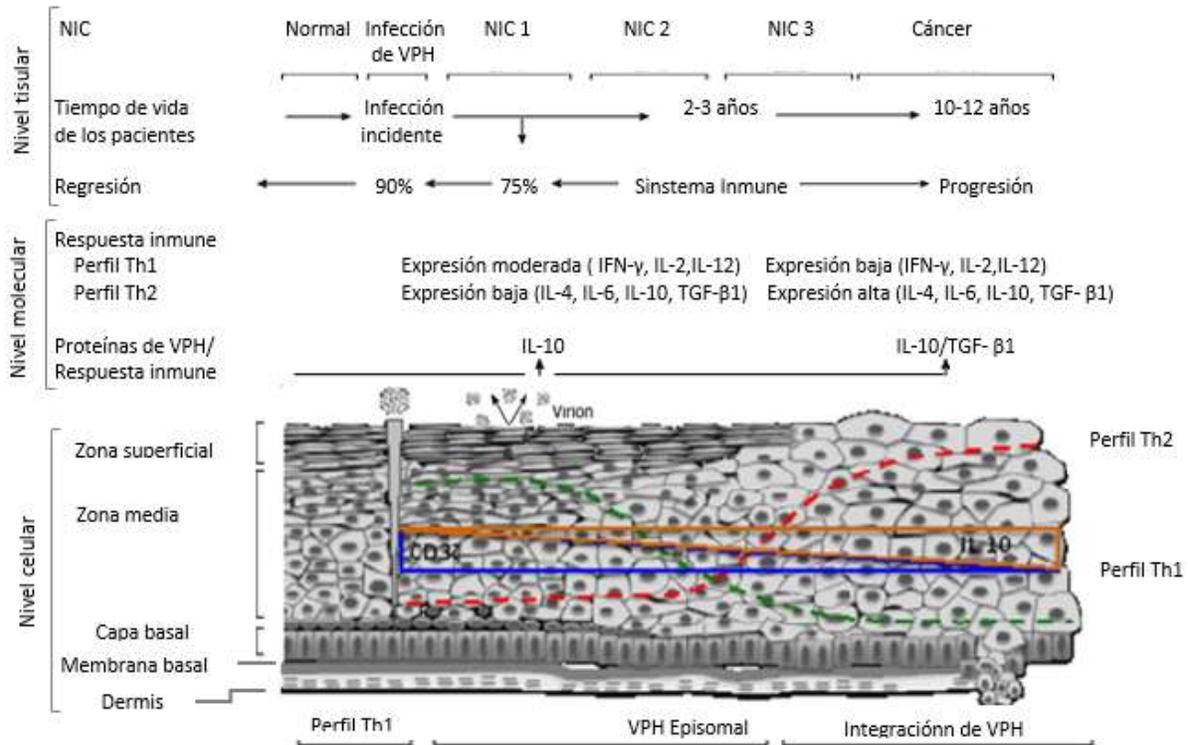


Figura 3. Expresión de citocinas ante infección incidente por el VPH y en CaCu. Adaptada de Torres-Poveda K. Role of IL-10 and TGF-β1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. World J Clin Oncol [Internet]. 2014;5(4):753. Available from: <http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v5/i4/753.htm>.

Se ha documentado que desde el inicio de la infección existe una expresión aumentada de la citocina inmunosupresora IL-10 a nivel de cérvix, la cual va aumentando a medida que la lesión es mayor, por lo que los niveles más altos son en estadios de cáncer. En resumen, cada uno de los elementos mencionados son fundamentales para una respuesta inmune deteriorada que permite la persistencia de la infección por VPH, la integración del genoma viral a las células sanas del epitelio, evolucionando a una transformación y finalmente a una inmortalización celular. (4)

POLIMORFISMOS DE CITOCINAS EN INFECCIÓN POR VPH

Un estudio publicado en 2016 reconoce la importancia del papel funcional de ciertas citocinas como parte del sistema inmune en la fisiopatología del CaCu, al mismo tiempo que reporta la asociación de diferentes polimorfismos en las

regiones promotoras de genes que codifican para ciertas citocinas y que regulan su expresión tanto a nivel local como sistémico. Los principales polimorfismos evaluados son polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por su sigla en inglés) presentes en la región reguladora de los genes IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ que representan una carga alélica de riesgo para CaCU. (9)

En el estudio realizado por Torres Poveda y col., se reconoce que el SNP -590C>T de IL-4 (rs2243250) influye en el riesgo de CaCU, dado que el alelo T del SNP se asocia con aumento de la actividad transcripcional de este gen in vitro, así mismo se propone que debido a que el SNP se localiza dentro de la región 5'UTR del gen, la presencia del SNP impacta en la transcripción y estabilización del ARNm. De manera específica se conoce que el SNP -590C>T de IL-4 es una transición (C/T), reconocido como marcador genético en cáncer oral, así como se ha reportado que el aumento de IL-4 desestabiliza la homeostasis del sistema inmune ejerciendo efectos inhibidores sobre la expresión y liberación de citocinas proinflamatorias. (9)

Para IL-6, estudios previos reportan que el genotipo C/C del SNP -573G>C (rs1800796) presente en la región promotora del gen de IL-6 se asocia con mayor frecuencia con CaCU comparado con el genotipo heterocigoto G/C. Este SNP es una transversión, un cambio de G por C reportado como factor de riesgo para cáncer de pulmón. En casos de CaCU la expresión alta de IL-6 por efectos paracrinos y autocrinos se asocia de manera directa con crecimiento de células tumorales, además de que IL-6 estimula la angiogénesis en tumores, por lo tanto los niveles de expresión de IL-6 se consideran como un criterio de gravedad o mal pronóstico en cáncer. (9–11)

Por otro lado, IL-10 ha sido una de las citocinas mayormente estudiadas, recientemente se han publicado estudios que demuestran diversos sitios polimórficos con relevancia funcional en la expresión de este gen. En la región promotora de IL-10 se reconocen tres SNP que han sido ampliamente estudiados,

los SNPs -1082 A>G, -819 C>T y -592 C>A, que promueven la transcripción del ARNm de IL-10 y la expresión in vitro de IL-10. El SNP ubicado en la posición de la región promotora -592 (rs1800872) es una transversión (un cambio de C/A), en una región conocida como potenciadora negativa, lo que quiere decir que la presencia del SNP (una mayor frecuencia del alelo A), estimula la transcripción de este gen y se relaciona con mayor riesgo de CaCU. (9,12,13)

En cuanto al SNP -819 que es un transición C>T (rs1800871) en la región promotora del gen de IL-10, se ha asociado con un riesgo reducido de cáncer gástrico en asiáticos; sin embargo, el mecanismo de influencia de este SNP en la carcinogénesis no se conoce aún.(14) Finalmente el SNP -1082 (rs1800896) de IL-10 se reconoce como una transición (A/G) y es catalogado como el polimorfismo de IL-10 más estudiado, está asociado a la alta o baja expresión de IL-10 en donde la variante A aumenta dos veces más la transcripción de este gen en comparación con la variante G. Mientras en países como Japón y Zimbabwe se ha demostrado la asociación de este polimorfismo con CaCU, en población mexicana no existe aún evidencia de esta asociación. (9,14,15)

Así mismo, el TGF- β 1 ha sido otra de las citocinas estudiadas en CaCU que junto a IL-10 ejercen una función inmunosupresora del sistema inmune, el SNP -509 (rs1800469) es una transición (C/T). Este SNP a la fecha tiene dos reportes de asociación con CaCU, el genotipo TT de este SNP se ha asociado con la etapa II de este cáncer y se ha reportado una interacción con el status de fumador en el incremento del riesgo de CaCU. (9,16)

Otro polimorfismo ampliamente estudiado es el SNP -308 (rs1800629) de TNF- α el cual es una transición (G/A). Torres Poveda y col., no encontraron asociación con el riesgo de CaCU al igual que un estudio en población africana y caucásica, a pesar de que este SNP ha sido relacionado con cáncer en diferentes meta-análisis; por lo que el efecto controversial de este SNP en la susceptibilidad CaCU

se debe con una probabilidad alta a diferencias raciales y del background genético de las poblaciones estudiadas. (9)

Por último, otro de los polimorfismos evaluados es el SNP (rs2069705) en la posición -1615 de la región promotora de IFN- γ , la citocina más importante en el control de una infección viral, este SNP es un cambio de C> T asociado con disminución de riesgo para CaCU (efecto protector) y de riesgo aumentado para cáncer de mama y Lupus eritematoso sistémico. (10,18)

JUSTIFICACIÓN

La prevalencia a nivel mundial del VPH en mujeres con citología normal es aproximadamente de 10%, lo cual indica que es una de las ITS más comunes. El VPH 16 es el genotipo más común y contribuye con 50%-55% de los casos de CaCU. En México la prevalencia de VPH 16 es de 6.2%, es el genotipo más común y contribuye con 57% de los casos de CaCU.

Los métodos moleculares para el diagnóstico de infección por VPH son una herramienta clave para una detección temprana de la infección por este agente y prevención de CaCU. El estudio de polimorfismos que regulan la expresión de citocinas propuestas como biomarcadores inmunológicos asociados a CaCU, con un abordaje longitudinal en un estudio de cohorte de persistencia de infección por VPH en cérvix, permitirá disponer de marcadores pronóstico de persistencia y eliminación de infección por VPH, que puedan utilizarse para seleccionar mujeres con potencial de persistencia viral y progresión a lesión premaligna en cérvix y así evitar la sobrecarga asistencial actual de su diagnóstico o tratamiento y mejorar la estrategia de prevención del CaCU.

HIPÓTESIS

Existe asociación de los polimorfismos de la región reguladora de los genes de citocinas Th2 y Th3 con infección persistente por VPH a nivel del cérvix en mujeres mexicanas.

OBJETIVOS (general y específicos)

Objetivo general:

Evaluar la asociación de los niveles de expresión y los polimorfismos de la región reguladora de los genes IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ con la infección persistente por VPH a nivel del cérvix en mujeres mexicanas.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la expresión del ARNm de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación viral.
2. Establecer la asociación de la expresión del ARNm de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ a nivel de cérvix con persistencia y eliminación viral.
3. Evaluar las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de la región reguladora de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ en casos de persistencia y eliminación viral.
4. Establecer la asociación de polimorfismos de la región reguladora de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ con persistencia y eliminación viral.

MATERIAL Y METODOS

Diseño del estudio

Se trata de un estudio de cohorte dinámica en mujeres VPH positivas sin lesión premaligna en cérvix. La población de la cohorte fueron mujeres mayores de 30 años que acudieron al Centro de Atención para la Salud de la Mujer-CAPASAM de los Servicios de Salud del Estado de Morelos para revisión ginecológica y que se encontraban incluidas en el proyecto de investigación titulado: “Las citocinas inmunosupresoras Th2 y Th3 como predictores de persistencia viral y progresión a lesión pre-maligna en cérvix en mujeres infectadas con VPH-AR: estudio de cohorte”.

a. Criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta para el estudio basal, generación de grupos de riesgo e inicio de cohorte

- Mujer mayor de 30 años
- Residencia permanente en Morelos por más de cinco años
- Autorización de participación en el estudio mediante firma consentimiento informado
- Cuestionario completo
- Donación de muestra basal sanguínea y de exudado de cérvix

b. Criterio de exclusión que se tuvieron en cuenta para el estudio basal, generación de grupos de riesgo e inicio de cohorte

- Prueba de embarazo positiva

c. Criterio de eliminación que se tuvieron en cuenta para el estudio basal, generación de grupos de riesgo e inicio de cohorte

- Mujer a quién le sea diagnosticado algún cuadro de inflamación crónica o enfermedad autoinmune al inicio y durante el seguimiento
- Mujer que haya sido vacunada

- Mujer que haya recibido tratamiento inmunosupresor en los seis meses previos

Aquellas mujeres que cumplieron los criterios de inclusión, se invitaron a participar en el estudio en los primeros seis meses de la primera etapa del proyecto.

Los casos que aceptaron participar en el estudio firmaron carta de consentimiento (Anexo 1) y se les solicitó responder al cuestionario aplicado por el profesional encargado de la toma de muestras, de igual manera el profesional especializado del CAPASAM tomó una muestra sanguínea y finalmente se solicitó una muestra de exudado de cérvix tomada por el ginecólogo colposcopista.

Población de estudio y tamaño de muestra del presente proyecto de tesis

Con un poder estadístico de 90% y un nivel de confianza del 95%, el tamaño de muestra de los grupos de riesgo seguidos en la cohorte con una pérdida estimada de 20% durante seguimiento, se calculó teniendo en cuenta el valor sérico promedio (pg/ml) con su respectiva desviación estándar de cada una de las citocinas a evaluar como marcadores inmunológicos, obtenidos en un estudio transversal previo en pacientes sin lesión en cérvix VPH positivas y mujeres con lesión premaligna VPH positivas.

Para la realización de este proyecto de tesis se contó con muestras de 267 mujeres incluidas en el estudio basal donde se definieron los grupos de seguimiento de mujeres VPH positivas y con la primera toma de seguimiento de la cohorte a los 12 meses posterior a la toma basal.

Las pacientes fueron localizadas por teléfono y se invitaron a acudir al CAPASAM para cada una de las tomas de muestras sanguíneas y de cérvix programadas. Se registró el status de las variables de antecedentes ginecoobstétricos y de

comportamiento sexual que pudieran haber cambiado en el tiempo como estatus marital, número de parejas sexuales, entre otras.

En la primera toma de seguimiento se realizó colposcopia, citología, prueba molecular de VPH y medición de biomarcadores a nivel sistémico y en cérvix (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ).

Los desenlaces a evaluar en este proyecto de tesis fueron infección incidente por VPH-tipo específico así como persistencia y eliminación viral en el primer año de seguimiento de la cohorte, con los siguientes criterios:

Criterios para el presente proyecto de tesis

Criterios de inclusión

- Mujer con muestras de cérvix y sanguíneas en estudio basal y muestreo de seguimiento a los 12 meses.
- Muestras de cérvix y sanguíneas que tengan ADN íntegro.

Criterios de exclusión

- Datos y cuestionarios incompletos.

Criterios eliminación

- Pérdida de seguimiento a los 12 meses.
- Falta de segunda muestra.

Llenado de cuestionario y captura de datos en el estudio basal de la cohorte

El profesional encargado de toma de muestra luego de tener el consentimiento firmado por el participante, realizó un cuestionario de 42 preguntas sobre características demográficas e historia reproductiva en un tiempo aproximado de 15 minutos (Anexo 2). La información descrita en el cuestionario fue capturada por

el investigador encargado y se generó la base de datos del estudio. El software utilizado fue Stata 14.

Procedimiento toma de muestra en el estudio basal y primera toma de seguimiento

A cada participante que haya firmado consentimiento informado y se le haya realizado el cuestionario, se le tomó muestra sanguínea por parte del profesional especializado encargado, un tubo de 7ml tapa roja (sin anticoagulante) y se extrajo el suero. El ginecólogo colposcopista de CAPASAM tomó muestra de exudado del canal endocervical con un cepillo (citobrush) en un tiempo aproximado de 10 minutos y se colocó en un tubo con medio de conservación. Adicionalmente el ginecólogo hizo el diagnóstico colposcópico al momento de la consulta, tomó muestra para citología o Papanicolaou y fue enviada para su análisis patológico por la Unidad de Patología del Centro de Atención para la Salud de la Mujer de los Servicios de Salud de Morelos. Los riesgos y molestias potenciales durante la toma de muestra se describen en el consentimiento informado.

Procedimiento de transporte y almacenamiento de muestras en el estudio basal y primera toma de seguimiento

Las muestras rotuladas correctamente fueron transportadas a -4°C al laboratorio 4 planta baja del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública. Las muestras sanguíneas fueron procesadas el mismo día de la toma. A partir de la muestra sin anticoagulante se realizó la extracción de suero. Se almacenaron dos alícuotas de suero a -70°C. Las muestras de exudado de cérvix se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. Los bancos de muestras se ubicaron en refrigeradores de propiedad del laboratorio 4 planta baja del CISEI. El manejo de los bancos de muestras fue responsabilidad de los investigadores del proyecto.

Operacionalización de las variables del presente estudio

La operacionalización de las variables se describe en el cuadro 1.

VARIABLES DEPENDIENTES O DESENLACE: persistencia viral y eliminación viral.

VARIABLES INDEPENDIENTES: Edad, número de parejas sexuales, edad menarca, edad inicio vida sexual, nivel socioeconómico, paridad, tabaquismo y genotipo viral.

VARIABLES EXPOSICIÓN: Genotipos de polimorfismos de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ y niveles de expresión en cérvix de los biomarcadores inmunológicos IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ .

Cuadro 1. Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo	Unidad de Medición	Escala de medición
Persistencia viral	Presencia del mismo genotipo viral en una infección para un periodo de seguimiento.	Detección del mismo genotipo viral en dos o más intervalos consecutivos.	Cualitativa	Genotipo de VPH	Nominal dicotómica
Eliminación viral.	Ausencia del genotipo viral presente en una infección previa.	Detección negativa del mismo genotipo en un intervalo consecutivo, que siga una toma positiva (primer resultado negativo de PCR después de una infección incidente).	Cualitativa	Genotipo de VPH	Nominal dicotómica
Infección incidente por VPH-tipo	Primera infección a nivel de cérvix por un genotipo de	Primer resultado positivo de VPH tipo específica después de un resultado	Cualitativa	Genotipo	Nominal

específico	VPH diferente al detectado en el estudio basal.	negativo para el mismo tipo de VPH en el estudio basal.		de VPH	dicotómica
Edad	Tiempo que ha vivido una persona.	Mujeres mayores de 30 años	Cuantitativa Continua	Años	De razón
Número de parejas sexuales	Número de personas con las que se ha tenido actividad sexual.	Número de parejas sexuales que ha tenido la paciente.	Cuantitativa Discreta	Número de parejas	De razón
Edad menarca	Edad de primera menstruación en una mujer	Año de vida en la que se presentó la primera menstruación en las pacientes del estudio.	Cuantitativa Continua	Años	De razón
Edad de inicio vida sexual	Edad en la que se tiene sexualmente activa	Año de la vida en la que se tiene primera relación sexual.	Cuantitativa Continua	Años	De razón
Nivel socioeconómico	Medida total económica y sociológica combinada con su preparación laboral, y la posición económica y social individual o familiar en relación a otras personas, basada en sus ingresos, educación, y empleo.	Estrato socioeconómico al que pertenecen las pacientes.	Cualitativa ordinal	Alto Medio Bajo	Ordinal
Paridad	Clasificación de una mujer por el número de niños nacidos vivos y de nacidos muertos con más de 28 semanas de gestación.	Número total de embarazos de las pacientes del estudio.	Cuantitativa discreta	Número de hijos	De razón
		<i>Antecedentes de tabaquismo:</i> evaluado en las pacientes del	Cualitativa Dicotómica	Ausente Presente	Nominal

Tabaquismo	Adicción al tabaco, provocada principalmente por nicotina.	estudio considerando años previos de consumo de tabaco y número de cigarrillos al día	Cuantitativa discreta	Años de consumo	Ordinal
		<i>Tabaquismo actual:</i> Hábito de fumar actual evaluado en las pacientes del estudio considerando número de cigarrillos al día	Cuantitativa discreta	Número de cigarros al día	Ordinal
			Cualitativa Dicotómica	Ausente Presente	Nominal
			Cuantitativa discreta	Número de cigarros al día	Ordinal
Anticoncepción hormonal	Los métodos hormonales o anticonceptivos hormonales son varios métodos que liberan hormonas habitualmente estrógeno y progesterona impidiendo que se produzca el embarazo.	Uso o no de tratamiento hormonal en las pacientes que participan en el estudio.	Cualitativa Politómica	Tipo de método	Nominal
Genotipo viral	Información genética que diferencia a los tipos virales de la familia de VPH.	Tipo de VPH presente en las infecciones persistentes.	Cualitativa	Genotipo de VPH	Nominal
Carga viral en cérvix	Cuantificación de la infección por virus que se calcula por estimación de la cantidad de partículas virales en cérvix.	Número de partículas virales de VPH a nivel de cérvix.	Cuantitativa continua	Número de copias virales	Ordinal

Genotipos de polimorfismos de citosinas		Genotipos de polimorfismos de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ .	Cuatitativa Discreta 0=heterocigoto alelo 1 (Aa) 1=homocigoto alelo 1(AA) 2=homocigoto alelo 2 (aa)	Nominal	Genotipo de polimorfismo
Niveles de expresión en cérvix de los biomarcadores.		Expresión en cérvix de los biomarcadores inmunológicos IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ .	Cuantitativa ordinal	URE (Unidades relativas de expresión)	Número de unidades relativas de expresión con respecto al gen endógeno HPRT1

Metodología experimental

Para el objetivo número 1:

- Evaluar la expresión del ARNm de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación viral.

Para determinar los casos de persistencia y eliminación viral se hizo la detección molecular de VPH, para ello a partir de la muestra de exudado de cérvix tomada en un vial ThinPrep se realizó la detección de VPH por la metodología de Seegene.

Detección de VPH por Seegene

La detección de HPV28 de AnyplexTM II es un ensayo de PCR en tiempo real multiplex que permite la amplificación, detección y diferenciación simultáneas de ácidos nucleicos diana de 19 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) y 9 tipos de VPH de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) como Control Interno (IC).

Definición de casos de persistencia y eliminación viral

Una vez detectado e identificado el genotipo de VPH en las muestras de exudado de cérvix tomadas en la primera etapa de seguimiento, se comparó con el genotipo identificado en la muestra basal correspondiente, estableciendo como persistencia de infección a la presencia del mismo genotipo en la toma basal y en la primera toma de seguimiento, y como eliminación viral cuando el genotipo detectado en la toma basal, no se haya detectado en la tipificación de VPH de la primera toma de seguimiento o el genotipo presente en la primera toma de seguimiento haya sido distinto al detectado en la toma basal.

Extracción de ARN de exudado de cérvix

Del citobrush en vial con buffer se realizó extracción del ARN por la metodología de trizol. Por cada seis millones de células o de 50 a 100 mg de muestra, se agregó 1ml de Trizol. Se homogeneizó la muestra y se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente. Se agregó 200µl de cloroformo por cada mililitro de Trizol, se mezcló e incubó de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm, 15 minutos a 8°C o 10 minutos a 4°C. La fase superior correspondiente a ARN se transfirió a un tubo donde se añadió 500 µl de isopropanol, se mezcló e incubó a -20°C por 15 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm, 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se lavó el paquete de ARN con 1ml de etanol al 75%, se mezcló y centrifugó a 10,000 rpm, siete minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20µl de agua libre de RNasas y DNasas. Se calentó a 65°C por 10 minutos, se cuantificó el ARN y se almacenó a -80°C hasta su uso en los ensayos de RT-PCR tiempo real para el análisis de expresión del ARNm de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF-β1, TNF-α e IFN-γ.

Cuantificación de ARN de exudado de cérvix

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

Síntesis de Ácido Desoxirribonucleico complementario (cDNA)

La síntesis de cDNA se llevó a cabo con 1 µg de ARN junto con los siguientes reactivos. El ARN se mezcló con 1 µl de oligo dT (0.5µg), esta mezcla se llevó a un volumen final de 9.5 µl. Posteriormente los reactivos se incubaron 10 minutos a 70°C. Pasado el tiempo de incubación se retiraron y se incubaron en hielo, posteriormente se mezclaron con una segunda mezcla de reactivos: buffer 5X (invitro gen), dNTPs 2.5mM, Inhibidores de RNasas 20u/µl (invitro gen) y la enzima reversa transcriptasa 200u/µl, (volumen total de la reacción 20 µl). Esta mezcla se incubó a 37 °C por una hora.

La reacción de PCR se llevó a cabo para un volumen de reacción de 25ul conteniendo 1ul de cDNA, 0.2 mM de dNTPs, 15 pmol de cada oligonucleótido, 2.5ul de buffer de reacción y 1U de Taq DNA polimerasa recombinante. El gen constitutivo de GAPDH (250pb), fue usado para verificar la integridad del ADN. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Mastercycler PCR gradient (Eppendorf, Germany) bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 60°C y un minuto a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se corrieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% y se visualizaron con luz ultravioleta luego de teñir el gel con bromuro de etidio.

Las sondas de expresión para el análisis de expresión de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ a nivel del cérvix, se obtuvieron de Applied Biosystems para el análisis por PCR tiempo real. El gen HPRT1 (hipoxantina fosforibosil transferasa) se usó para normalizar la cantidad de ARNm presente en cada muestra para el análisis de las citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ . La reacción de PCR por tiempo real se realizó adicionando 2ul de cada cDNA a un volumen final de reacción de 10ul, conteniendo 5ul de Master Mix para expresión, 0.4ul de sonda y 2.6ul de agua libre de DNAsas grado molecular. Los ciclos de amplificación se realizaron en el equipo VIA-VII de Applied Biosystems, Foster City, bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 94°C, 40 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 54°C y un minuto y 30 segundos a 72°C, con una extensión final de 15 minutos a 72°C.

Análisis de la expresión del ARNm para cada una de las citocinas a nivel del cérvix

El nivel de expresión de ARNm para los genes estudiados en los casos con persistencia viral, se calculó mediante cuantificación relativa con el método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 69 y se graficó como unidades relativas de expresión (URE) de cada gen respecto al gen endógeno (actina). Las muestras se analizaron por duplicado.

La evaluación de la expresión del ARNm de cada una de las citocinas a nivel de cérvix en mujeres con persistencia viral vs eliminación viral se realizó usando la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney. Todos los análisis se llevaron a cabo mediante el programa STATA versión 14 (StataCorp, Collage Station, TX, EUA) para Windows.

Para el objetivo número 2

- Establecer la asociación de la expresión del ARNm de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación viral.

Se realizó un análisis descriptivo de las características sociodemográficas de la población de estudio, antecedentes gineco-obstétricos y variables relacionadas con el estilo de vida de la población de estudio. Se compararon las variables relevantes entre mujeres con persistencia y eliminación viral, usando la prueba de χ^2 o Kruskal Wallis para las variables categóricas y continuas, respectivamente.

Para establecer la asociación de la expresión del ARNm en los casos de persistencia y eliminación viral se utilizó regresión lineal ajustada por las variables estadísticamente significativas y el CT de la toma basal expresada en URE.

Para el objetivo número 3:

- Evaluar las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de la región reguladora de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ en casos de persistencia y eliminación viral.

Purificación de células mononucleares de sangre periférica

Se realizó a partir de muestra de sangre total anticoagulada, la cual se diluyó 1:1 en PBS previamente estéril. Por cada 4 ml de sangre diluida en PBS se adicionó 3 ml de ficoll. La sangre diluída con PBS se vertió cuidadosamente al tubo que contenía ficoll para formar el gradiente. Se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la capa de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se realizó un lavado de las CMSP con PBS estéril, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y la pastilla de CMSP resultante se dividió en dos alícuotas (tubos 1.5ml): una se resuspendió en PBS (300ul) y la otra en Tri-pure (1000ul). Ambas alícuotas se almacenaron a -

20°C. Por cada mililitro de sangre se obtuvo aproximadamente 800 mil a 1 millón de CMSP.

Extracción de ADN de CMSP

200µl de muestra (CMSP resuspendidas en PBS) se mezclaron con 400ml de solución de lisis y se incubaron a 65°C por cinco minutos. Se adicionaron 600ml 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 (720ml de H₂O con 80ml 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 100ml de NaCl al 1.2M y se homogenizó en vórtex. Se adiciono 300 ml de etanol frío y se precipito 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 100ml de agua estéril.

Cuantificación del ADN extraído de CMSP

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

Criterios para la selección de SNPs a evaluar

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) fueron seleccionados con los siguientes criterios: 1) SNP`s validados por frecuencia o por el proyecto HAPmap. 2) SNP`s en región promotora para los cuales se ha publicado alguna evidencia científica de su papel potencial en la regulación transcripcional de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ . Para la selección se usó el programa Ensembl disponible en la página electrónica <http://www.ensembl.org/index.html>. 3) SNP`s en el promotor de los genes que codifican para IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ localizados en sitios de unión de factores de transcripción que puedan influenciar potencialmente en la actividad transcripcional de dichas citocinas y reportados en la base de datos SNPper, disponible en URL: <http://snpper.chip.org>. Las sondas Taqman que se usarón para la genotipificación fueron: (-590C>T (IL-4) rs2243250, -573G>C (IL-6) rs1800796, -592C>A (IL-10) rs1800872, -819C>T (IL-10) rs1800871, -1082A>G (IL-10) rs1800896, -509C>T (TGF- β 1) rs1800469, -308G>A (TNF- α) rs1800629 y -1615 C>T (IFN- γ) rs2069705).

Discriminación Alélica

Ocho SNP`s (-590C>T (IL-4), -573G>C (IL-6), -592C>A (IL-10), -819C>T (IL-10), -1082A>G (IL-10), -509C>T (TGF- β 1), -308G>A (TNF- α) y -1615 C>T (IFN- γ) presentes en la región promotora de sus respectivos genes, fueron genotipificados por discriminación alélica basada en el ensayo 5`-nucleasa, con la tecnología de PCR en combinación con sondas Taqman fluorogénicas en el equipo de PCR en tiempo real VIA VII de Applied Biosystems. Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 5ul conteniendo 25ng de ADN, 1X de Master Mix para genotipificación (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 900nM de cada sonda. Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 92°C y un minuto a 60°C. Se realizó una pre-lectura de la fluorescencia basal y la fluorescencia final medida inmediatamente después de la reacción de PCR. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado y los alelos

fueron asignados usando el software SDS 2.1 (Applied Biosystems). El control de calidad para los resultados de genotipificación se realizó con controles sin muestra problema y controles del homocigoto común y el menos frecuente, en adición, se re-analizaron las muestras con resultados indeterminados.

Para el objetivo número 4

- Establecer la asociación de polimorfismos de la región reguladora de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ en casos de persistencia y eliminación viral.

El análisis estadístico de los datos de genotipificación de los polimorfismos a evaluar para cada citocina, se llevó a cabo mediante el estudio de la distribución de las frecuencias, tanto genotípicas como alélicas para cada uno de los polimorfismos. La distribución observada para cada SNP`s en toda la población de estudio se comparó con la esperada por medio de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo de controles (mujeres con eliminación viral). Tanto para el análisis entre mujeres con persistencia y eliminación viral, se realizó un análisis bivariado y de regresión logística considerando el modo de heredabilidad (codominante, recesivo y dominante), ORs fueron obtenidos con sus respectivos intervalos de confianza (IC) 95% para cada una de las variantes genotípicas posibles. La variante de referencia fue el homocigoto de la variante más común. Potenciales confusores para persistencia viral fueron incluidos en el modelo multivariado. Todos los análisis se llevaron a cabo mediante el programa STATA versión 14 (StataCorp, Collage Station, TX, EUA) para Windows.

Diagrama consort

Se muestra la dinámica del tamaño de la muestra observada tanto en la toma basal como al año de seguimiento. **(Figura 4)**

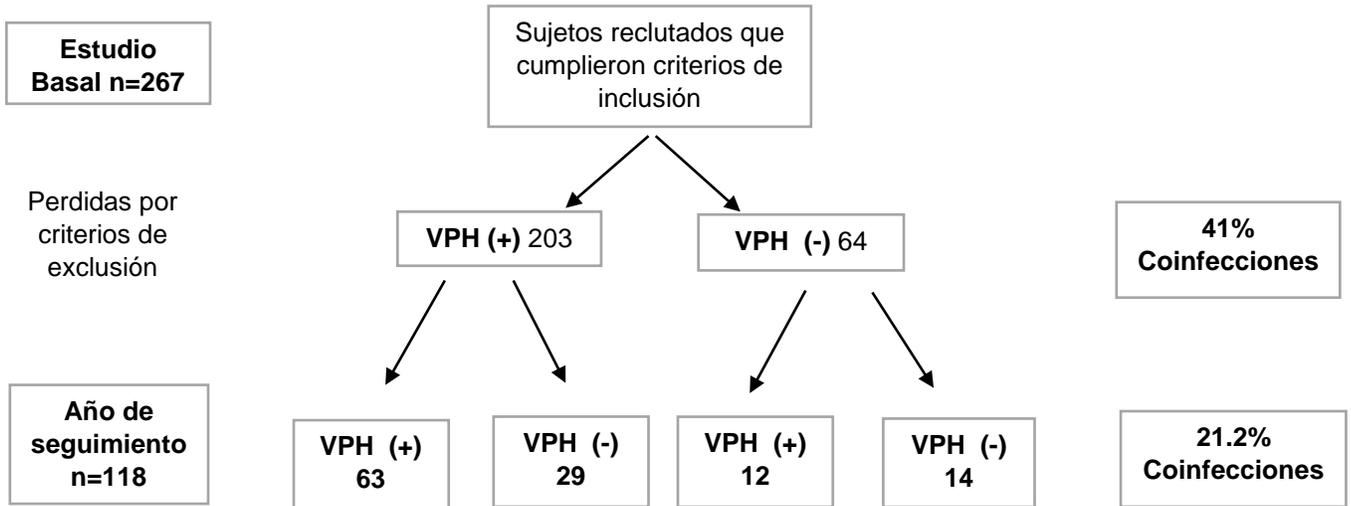


Figura 4. Diagrama consort

RESULTADOS

I. Características generales de la población

Las características sociodemográficas y antecedentes ginecoobstetricos de la población de estudio se presentan en la **Cuadro 2**. Los casos de mujeres positivas al VPH reportaron una edad menor que las mujeres negativas al VPH (37 años contra 40 años), mayor exposición actual al tabaco (16.75% contra 4.69%), mayor uso de métodos anticonceptivos y mayor carga viral (35517.25 copias contra 0 copias). Hubo diferencias significativas entre los grupos para las variables tabaquismo actual, consumo menor de cuatro cigarros/día, uso de DIU y uso de inyecciones hormonales ($p < 0.05$)

Cuadro 2. Características generales de la población de estudio (n=267)			
Característica	VPH positiva (n=203)	VPH negativa (n=64)	pValue&
Edad*			0.069
Media	37	40	
Nivel socioeconómico +			
Bajo	40.39	50	0.176
Medio Bajo	24.63	21.88	0.653
Medio	34.48	28.13	0.345
Medio Alto	0.49	0	0.574
Alto	0	0	
Tabaquismo +			
Antecedente	19.70	10.94	0.108
Actual	16.75	4.69	0.015
< 4 cigarros/día	15.27	4.69	0.027
>5 cigarros/día	1.97	0	0.258
Edad menarca*			0.529
Media	12	12	
IVSA*			0.860
Media	17	17	
No. Parejas sexuales +			0.258
1 a 3	80.79	90.63	
4 a 6	16.26	9.38	
7 a 9	0.99	0	
>10	1.97	0	

Cuadro 2. Características generales de la población de estudio (continuación) (n=267)			
Característica	VPH positiva (n=203)	VPH negativa (n=64)	pValue&
Paridad +			0.344
0	9.85	4.69	
1 a 3	47.78	53.13	
4 a 6	33.5	39.06	
7 a 9	7.88	3.13	
Anticoncepción hormonal+			
Ninguno	25.62	31.25	0.376
Oclusión tubarica bilateral	34.98	42.19	0.297
DIU cobre/hormonal	21.18	9.38	0.033
Implante	5.91	1.56	0.159
Hormonales orales	0.49	1.56	0.387
Inyecciones hormonales	3.45	9.38	0.055
Parche	0	1.56	0.074
Condón	8.37	3.13	0.154
Vasectomía	0.99	0	0.425
Tratamiento previo +			0.595
	63.38	56.25	
Tipo de tratamiento +			0.840
Ninguno	36.62	43.75	
Electrocirugía	18.31	18.75	
Crioterapia	45.07	37.5	

*Variables continuas: se muestra la media. (U Mann whitney)

+Variables categóricas: expresadas en porcentajes. (X2)

VPH positiva versus VPH negativa. & p value <0.05

II. Genotipificación

En la genotipificación se utilizó la metodología de Seegene Anyplex™ II HPV28 que detecta simultáneamente 19 HPV de alto riesgo y 9 HPV de bajo riesgo utilizando la tecnología DPO™ y el método de análisis de curva de fusión de la tecnología TOCE™.

Las muestras se clasificaron con base al riesgo del VPH, considerando como negativas; aquellas muestras sin presencia de VPH, bajo riesgo; aquellas muestras con VPH de bajo riesgo y de alto riesgo; muestras con VPH de alto riesgo.

En la toma basal se observó que el 23.97% de las muestras fueron negativas a la presencia de VPH, mientras que el 9.73% presentó VPH de Bajo Riesgo y el 65.91% de estas fueron detectadas con VPH de alto riesgo, siendo este grupo el de mayor prevalencia (**Figura 5**).

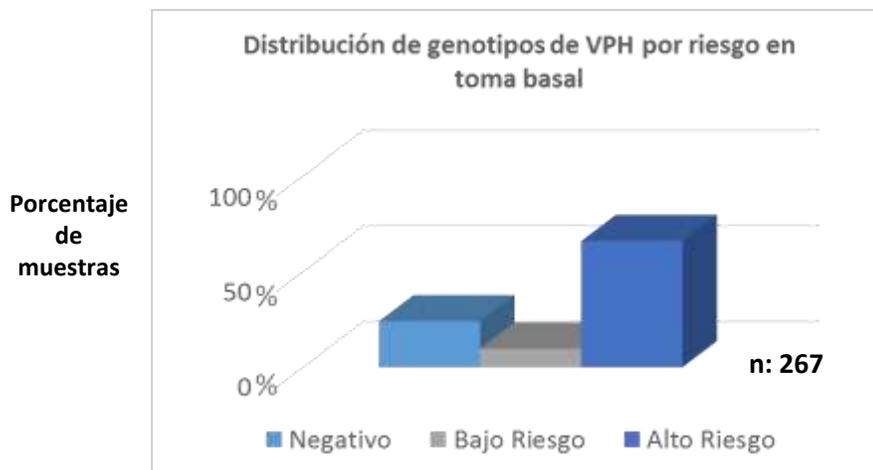


Figura 5. Distribución de genotipos de VPH por riesgo en toma basal

En la toma del primer año de seguimiento el 34.51% de los casos fueron negativos a la presencia de VPH, mientras que el 12.38% presentó VPH de Bajo Riesgo y el 53.59% VPH de alto riesgo, siendo nuevamente este el genotipo de mayor prevalencia (**Figura 6**).

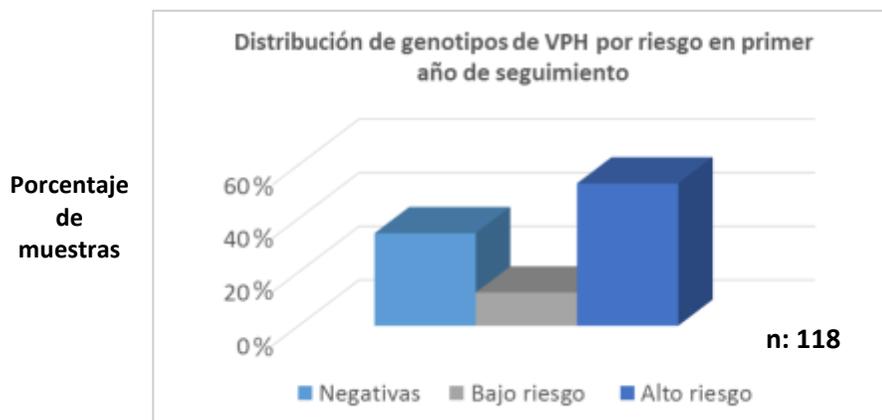


Figura 6. Distribución de genotipos de VPH por riesgo en primer año de seguimiento

En el estudio basal, posterior al análisis por genotipo de riesgo, se evaluó la frecuencia en los casos positivos por genotipo viral en donde se pudo observar que el VPH 53 tuvo la mayor prevalencia con 14%, seguida del VPH 31 y VPH 58 con un 12% respectivamente, siendo estos los más prevalentes y de gran importancia debido a su clasificación como genotipos de alto riesgo (**Figura 7**).

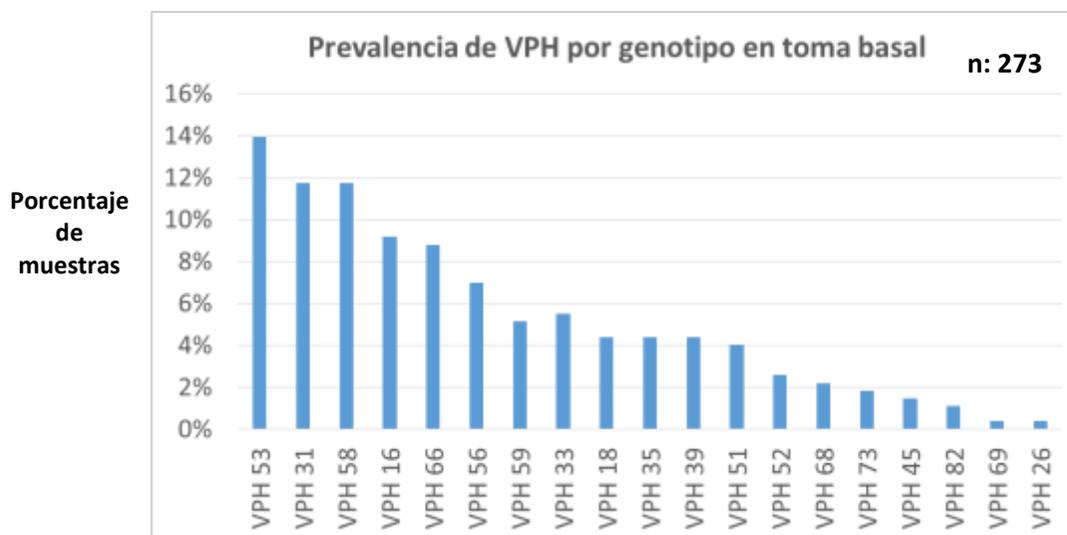


Figura 7. Prevalencia de VPH por genotipo en toma basal

En el primer año de seguimiento, el genotipo de VPH 58 muestra la mayor prevalencia con un 17.73%, seguido del genotipo 66 con el 10.4% y el genotipo 39

y 16 con 9.40%. En comparación con el estudio basal el genotipo 58 sigue siendo uno de los tipos virales más prevalentes para ambos periodos **(Figura 8)**.

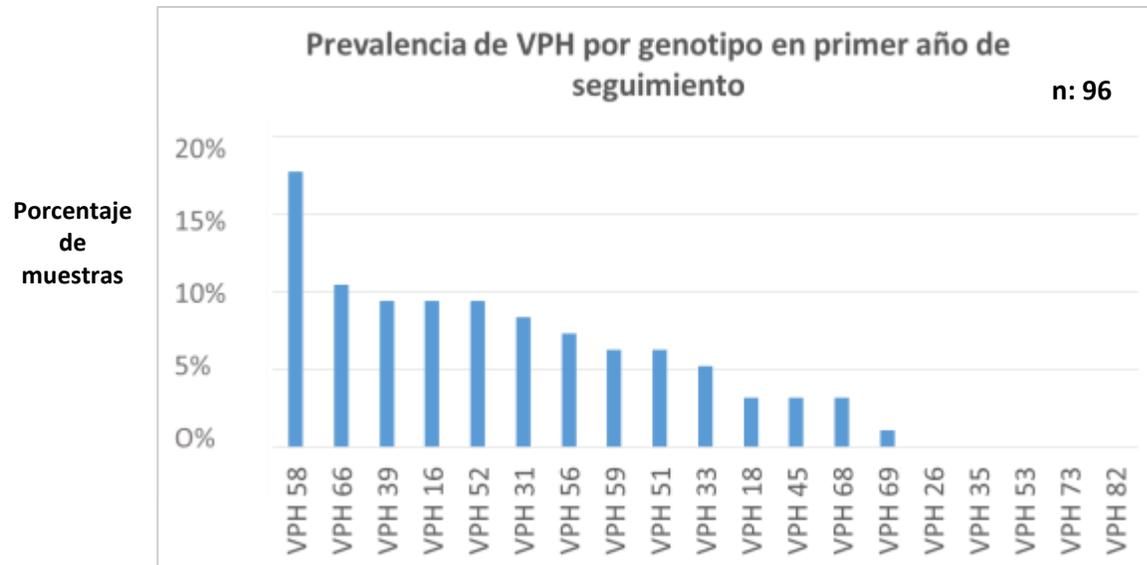


Figura 8. Prevalencia de VPH por genotipo en primer año de seguimiento

III. Persistencia de VPH

Para la estimación de la persistencia por tipo viral (presencia del mismo genotipo viral en dos tomas consecutivas) dentro del estudio, se tomó como referencia los 96 genotipos de VPH detectados en las 118 muestras tomadas en el primer año de seguimiento comparándolos con los genotipos de las mismas muestras en la estudio basal, obteniendo que el genotipo de VPH 58 presentó la mayor persistencia con un 5%, seguido de los genotipos virales 16, 31, 66, 56 con una persistencia del 3% (**Figura 9**).

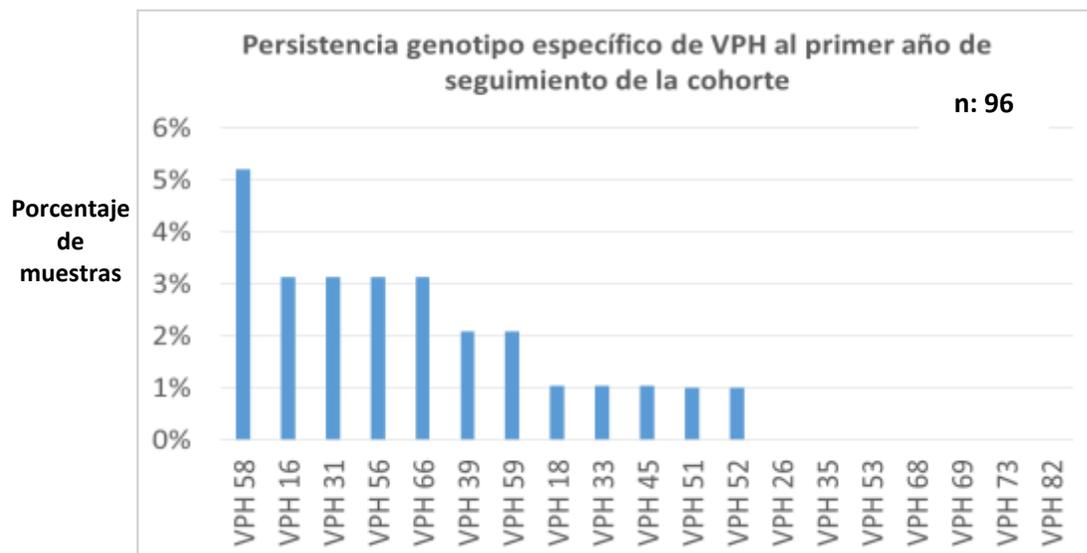


Figura 9. Persistencia genotipo específico de VPH al primer año de seguimiento de la cohorte

Para la estimación de la prevalencia de eliminación por genotipo de VPH al año de seguimiento, se observó que el genotipo de VPH 53 tuvo la prevalencia mayor de eliminación con un 20%, seguido del VPH 58 con 14% y el 31 con 10% (**Figura 10**).

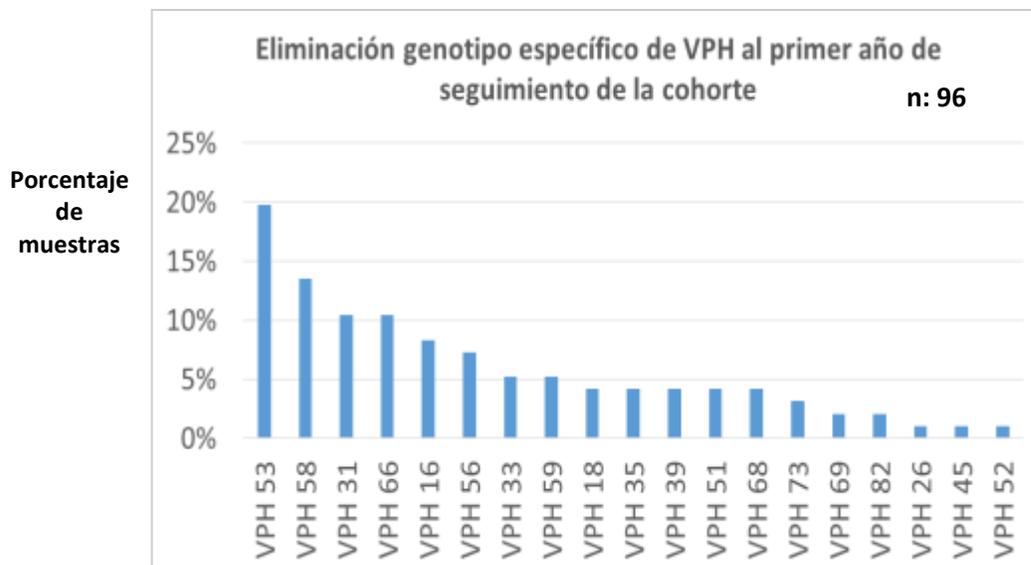


Figura 10. Eliminación genotipo específico de VPH al primer año de seguimiento de la cohorte

Finalmente, se evaluó la incidencia por genotipo de VPH al año de seguimiento, encontrándose que el genotipo 58 fue uno de más incidentes con un 21.12%, mientras que el genotipo de VPH 39 y 52 mostraron una incidencia del 11. 26% (Figura 11).

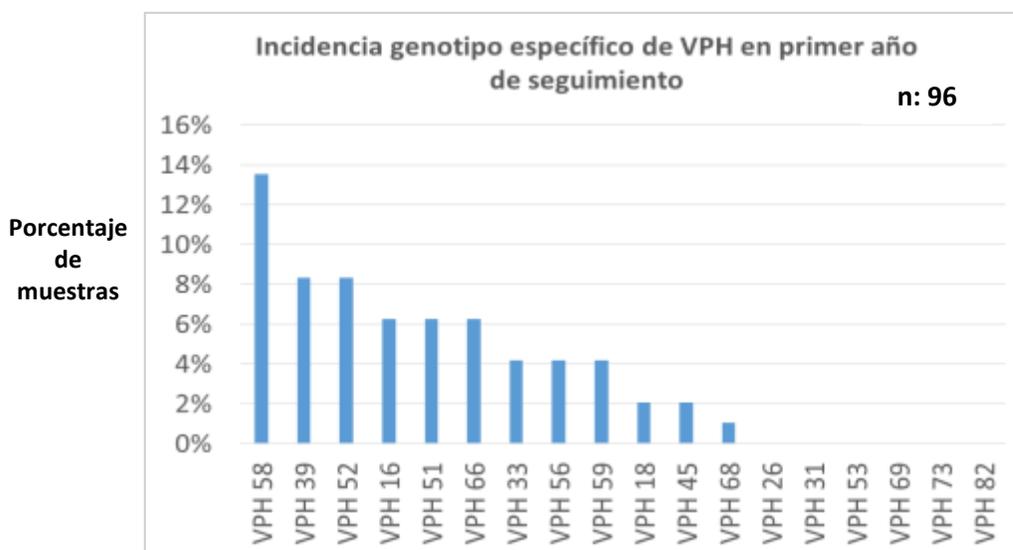


Figura 11. Incidencia genotipo específico de VPH en primer año de seguimiento

Posterior al análisis de persistencia por genotipo de VPH, se evaluó la persistencia general (por mujer en seguimiento en la cohorte), considerando como caso persistente a aquella paciente con por lo menos un mismo genotipo viral en la

toma del estudio basal y en la toma del primer año de seguimiento. La persistencia de VPH general en la población fue del 18.65 % mientras que el 81.36 % de la población no mostró persistencia viral (**Figura 12**).

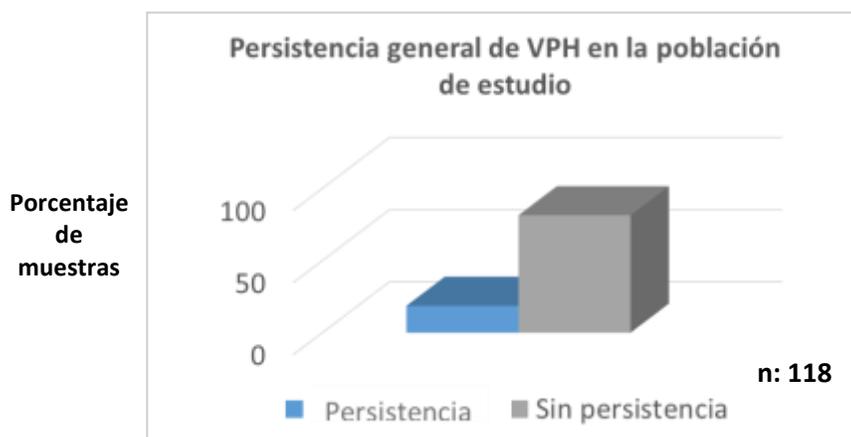


Figura 12. Persistencia general de VPH en la población de estudio

Al realizar un análisis bivariado entre la variable persistencia de VPH y genotipo de VPH por riesgo se encontró significancia estadística con un valor de $p < 0.008$ (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Análisis entre persistencia del VPH y genotipo de VPH por riesgo (n=118)			
Característica	Persistencia (n=22)	Sin persistencia (n=96)	pValue&
Genotipo de VPH por riesgo+			0.008
VPH bajo riesgo	0	25.93	
VPH alto riesgo	100	74.07	

+Variable categórica (X2), & p value <0.05
Los valores están expresados en porcentajes

Al estimar la eliminación de VPH general en la población se observó que el 72% de la población eliminó al menos un genotipo de VPH detectado en la toma del estudio basal al año de seguimiento, mientras que en el 27.9% de la población con toma de seguimiento, no hubo eliminación viral (**Figura 13**).

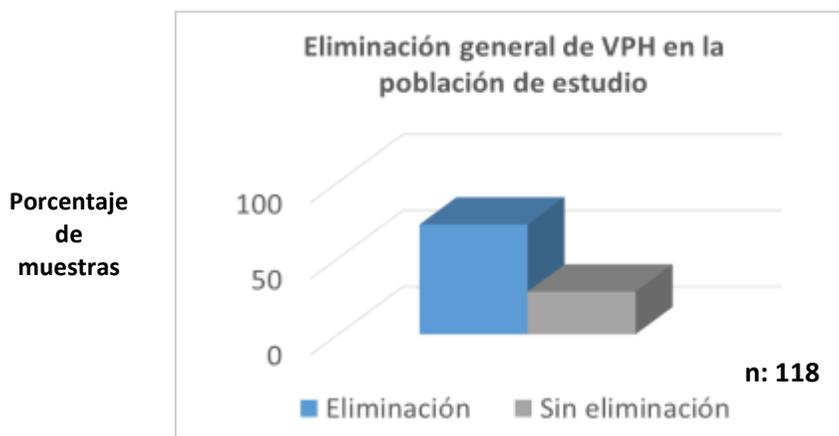


Figura 13. Eliminación general de VPH en la población de estudio

Al realizar un análisis bivariado relacionando la eliminación de VPH al año de seguimiento con la variable genotipo de VPH por riesgo no se encontró significancia estadística. **(Cuadro 4).**

Cuadro 4. Análisis entre eliminación del VPH y genotipo de VPH por riesgo (n=118)			
Característica	Persistencia (n=22)	Sin persistencia (n=96)	pValue&
Genotipo de VPH por riesgo +			0.826
VPH bajo riesgo	18.97	16.67	
VPH alto riesgo	81.03	83.33	

+Variable categórica (X2), & p value <0.05
Los valores están expresados en porcentajes

IV. Niveles de expresión del ARNm de citocinas a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH

Los niveles de expresión del ARNm de IL- 4, IL-6, IL- 10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ normalizados con actina a nivel de cérvix, expresados en unidades relativas de expresión (URE) en casos con persistencia y sin persistencia de VPH se muestran en la figura 13. Los niveles promedio de expresión del ARNm de IL- 4, IL-6, TNF- α e IFN- γ relativo a actina fueron más altos en los casos de persistencia de VPH (12.8, 10.72, 9.66 y 12.48 respectivamente), mientras que los niveles promedio de expresión del ARNm de IL- 10 y TGF- β 1 relativo a actina fueron mayores en los casos sin persistencia de VPH (10.83 y 5.95). Sin embargo, al evaluar la diferencia de medianas de los Δ de expresión de cada citocina en cérvix de los casos con toma de muestra al año de seguimiento que presentaron o no persistencia del VPH mediante la prueba U Mann whitney, sin encontrar diferencias significativamente significativas para ninguna de las citocinas (**Figura 14**).

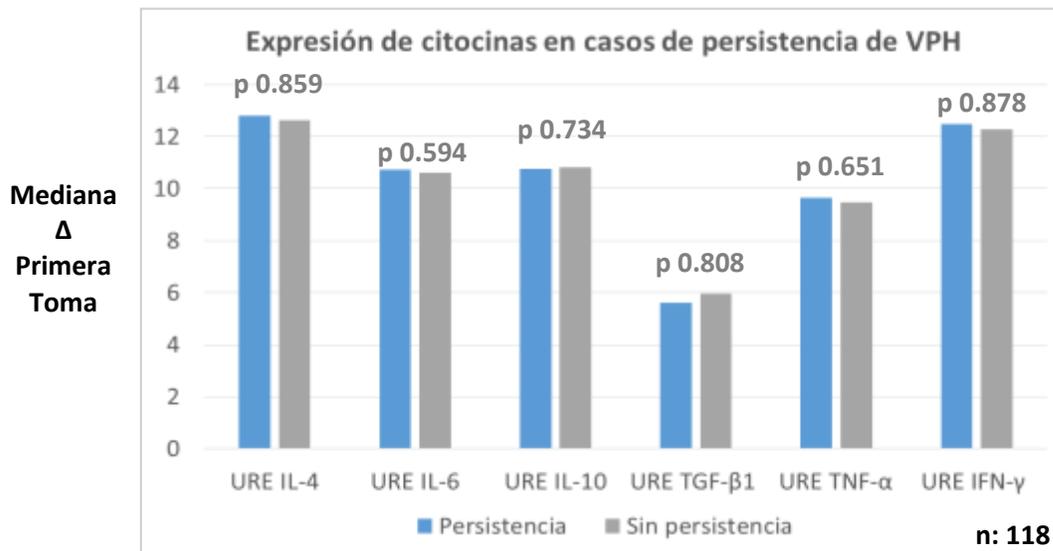


Figura 14. Expresión de citocinas en casos de persistencia de VPH

Los niveles de expresión del ARNm de IL- 4, IL-6, IL- 10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ normalizados con actina a nivel de cérvix expresados en unidades relativas de expresión (URE) en casos con eliminación y sin eliminación del VPH al año de seguimiento se muestran en la Figura 14. Los niveles promedio de expresión del

ARNm de IL-6, IL- 10, TGF- β 1 y TNF- α relativo a actina fueron más altos en los casos con eliminación del VPH (10.95, 11.16, 6.71 y 9.71 respectivamente), mientras que los niveles promedio de expresión del ARNm de IL-4 e IFN- γ relativo a actina fueron mayores en los casos sin eliminación del VPH (12.5 y 11.62).

Nuevamente se utilizó la prueba de U Mann whitney para evaluar la diferencia de medianas de los Δ de expresión de cada citocina en cérvix de los casos con toma de muestra al año de seguimiento que presentaron o no eliminación del VPH, sin encontrar significancia estadística. **(Figura 15).**

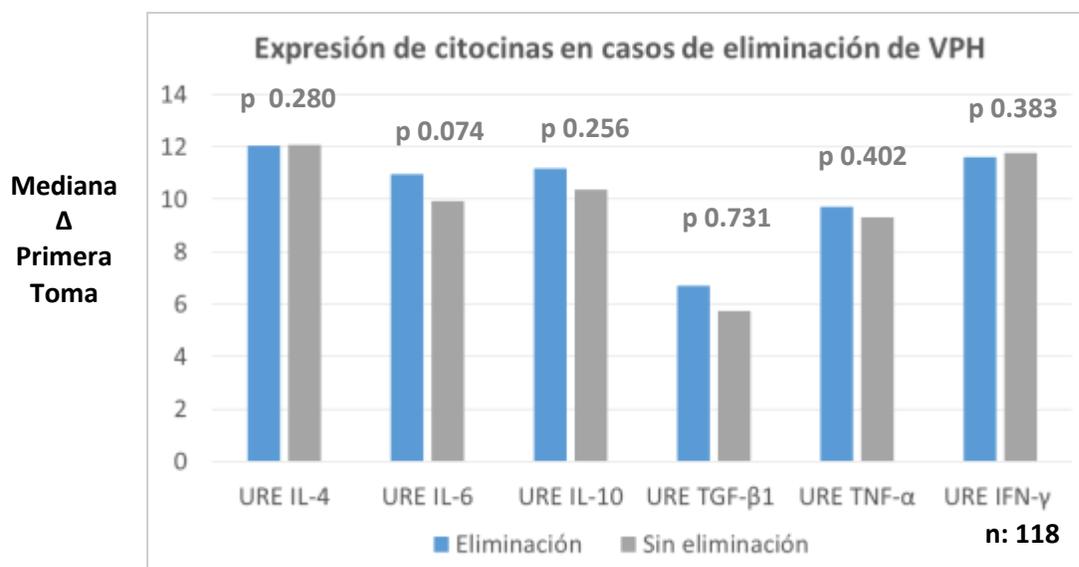


Figura 15. Expresión de citocinas en casos de eliminación de VPH

Al evaluar la asociación entre el nivel de expresión del ARNm de IL-4 a nivel de cérvix con persistencia del VPH, la diferencia estimada de medias de URE entre las mujeres con persistencia de VPH y sin persistencia fue de 0.35 URE más en los casos con persistencia de VPH, mientras que para los casos con eliminación del VPH la diferencia estimada de medias de URE entre el grupo con eliminación y sin eliminación fue de 1.13 URE más en los casos con eliminación de VPH a nivel de cérvix. Para el caso de IL-10, la diferencia estimada de medias de URE entre el grupo con persistencia del VPH fue de -0.25 URE a nivel de cérvix con respecto a los casos sin persistencia del VPH, mientras que para los grupos con eliminación

del VPH fue de 0.73 URE más con respecto al grupo sin eliminación del VPH. Para TGF- β 1, la diferencia estimada de medias de URE entre el grupo con persistencia del VPH fue de -0.37 a nivel de cérvix y para el grupo con eliminación del VPH fue de 0.23 URE más con respecto al grupo sin eliminación viral. Al evaluar TNF- α la diferencia estimada de medias de URE entre el grupo con persistencia del VPH fue de 0.25 URE a nivel de cérvix, mientras que para el grupo con eliminación del VPH fue de 0.41 URE con respecto al grupo de no eliminación. Finalmente al evaluar los niveles de IFN- γ la diferencia estimada de medias de URE entre el grupo con persistencia fue de 0.32 unidades a nivel de cérvix más y para de 1 URE para los casos con eliminación del VPH respecto a los casos sin eliminación al año de seguimiento.

IL-6 presentó una diferencia estimada de medias de URE entre el grupo con persistencia del VPH de 0.15 unidades a nivel de cérvix con respecto al grupo sin persistencia, mientras que para el grupo con eliminación del VPH fue de 1.16 URE (IC 95% 0.149-2.183 $p < 0.025$), estos últimos datos fueron estadísticamente significativos e indican que las pacientes que tuvieron eliminación del VPH al año de seguimiento expresaron 1.16 más unidades relativas de expresión de IL-6 en comparación con las mujeres que no tuvieron eliminación de VPH (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Diferencia estimada de medias URE de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ en persistencia y eliminación de VPH al año de seguimiento de la cohorte

URE	Grupo	Coefficiente β^{**} (IC 95%)	pValue&
IL-4*	Persistencia	0.35 (-1.090-1.791)	0.630
	Eliminación	1.13 (-.101-2.379)	0.072
IL-6*	Persistencia	0.15(-1.040-1.345)	0.801
	Eliminación	1.16(0.149-2.183)	0.025
IL-10*	Persistencia	-0.25(-1.122-1.071)	0.963
	Eliminación	0.73(-0.215-1.679)	0.129
TGF-β1*	Persistencia	-0.37(-1.559-0.816)	0.536
	Eliminación	0.23(-0.785-1.292)	0.630
TNF-α*	Persistencia	0.25(-0.954-1.471)	0.673
	Eliminación	0.41(-0.642-1.472)	0.438
IFN-γ*	Persistencia	0.32(-1.019-1.664)	0.635
	Eliminación	1.00(-0.152-2.158)	0.089

*Variables continuas: se muestra, coeficientes β de regresión lineal, IC y & p value <0.05

**Coeficientes β de regresión lineal ajustado por edad y método de anticoncepción por inyecciones hormonales

URE: Unidades relativas de expresión

V. Análisis de los polimorfismos en región promotora -590 IL-4, -573 IL-6, -592,-819,-1082 IL-10, -509 TGF- β 1, -380 TNF- α y -1615 IFN- γ

Las frecuencias genotípicas y alélicas para los SNP's de la región reguladora de los genes -590C>T (IL-4), -573G>C (IL-6), -592C>A (IL-10), -819C>T (IL-10), -1082A>G (IL-10), -509C>T (TGF- β 1), -380G>A (TNF- α) y -1615C>T (IFN- γ) en los casos con persistencia del VPH versus sin persistencia se presentan en el **Cuadro 6.**

Al evaluar la asociación de los polimorfismos analizados con el riesgo de persistencia del VPH, razones de momios (Odd Ratios) fueron estimadas a través de regresión logística ajustada por edad y uso de inyecciones hormonales. Se observó que el único SNP que mostró significancia estadística con persistencia del VPH fue el polimorfismo -590 (IL-4), el genotipo heterocigoto C>T tuvo un OR de 0.22 (IC 95% 0.062- 0.838 $p<0.026$) y el genotipo homocigoto T>T tuvo un OR de 0.16 (IC 95% 0.044-0.651 $p<0.010$), al evaluar el modelo codominante. Sin embargo, la razón de momios refirió protección ante la persistencia de VPH. Al evaluar el modelo dominante se encontró un OR de 0.19 (IC 95% 0.060-0.653 $p<0.008$), refiriendo nuevamente significancia estadística con protección ante persistencia del VPH.

Al evaluar la asociación por alelos se encontró que los únicos SNPs que demostraron significancia estadística para el riesgo de persistencia del VPH fueron los polimorfismos -573G>C (IL-6), -380G>A (TNF- α) y -1615C>T (IFN- γ); el alelo C de riesgo del SNP -573G>C (IL-6) tuvo un OR de 2.80 (IC 95%, 1.058-7.450 $p<0.038$), el alelo de riesgo A del SNP -380G>A (TNF- α) un OR de 3.96 (IC 95%, 1.079-14.581 $p<0.038$) y el alelo de riesgo T del SNP -1615C>T (IFN- γ) un OR de 2.98 (IC 95%, 1.094-8.146 $p<0.033$).

Cuadro 6.							
Análisis de asociación de los SNPs (-590 IL-4, -573 IL-6, (-592.-819,-1082) IL-10, -509 TGF-β1,-380 TNF-α , -1615 IFN-γ) de su región promotora con Persistencia de VPH.							
(IL-4 -590 C/T)				(IL-6 -573 G/C)			
Genotipo	n(%)Persistencia/(%)S in Persistencia (n=22/96)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Persistencia/(%) Sin Persistencia (n=22/96)	RMa (IC95%)	Valor p*
Modelo Codominante				Modelo Codominante			
C/C	7(31.8)/12(12.5)	1		G/G	10(45.5)/35(36.5)	1	
C/T	9(40.9)/43(44.7)	0.22(0.062- 0.838)	0.026	G/C	10(45.5)/46(47.9)	0.71(0.264-1.919)	0.502
T/T	6(27.2)/41(42.7)	0.16(0.044-0.651)	0.01	C/C	1(4.5)/15(15.6)	0.48(0.092-2.553)	0.395
Modelo Dominante				Modelo Dominante			
C/C	7(31.8)/12(12.5)	1		G/G	10(45.5)/35(36.5)	1	
C/T + T/T	15(68.2)/84(87.5)	0.19(0.060-0.653)	0.008	G/C + C/C	12(54.5)/61(63.5)	0.66(0.256-1.700)	0.39
Modelo Recesivo				Modelo Recesivo			
C/C + C/T	16(72.7)/55(57.3)	1		G/G + G/C	20(90.9)/81(84.3)	1	
T/T	6(27.2)/41(42.7)	0.47(0.170-1.334)	0.158	C/C	2(9.0)/15(15.6)	0.58(0.119-2.829)	0.502
Alelos				Alelos			
C	6(27.2)/42(43.75)	1		G	8(36.3)/60(62.5)	1	
T	16(72.7)/54(56.2)	2.03(0.723-5.700)	0.179	C	14(63.6)/36(37.5)	2.80(1.058-7.450)	0.038
p EHW**			0.889	p EHW**			0.985
(IL-10 -592 C/A)				(IL-10 -819 C/T)			
Genotipo	n(%)Persistencia/(%)S in Persistencia (n=22/96)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Persistencia/(%) Sin Persistencia (n=22/96)	RMa (IC95%)	Valor p*
Modelo Codominante				Modelo Codominante			
C/C	6(27.2)/22(22.9)	1		C/C	6(27.2)/22(22.9)	1	
C/A	11(50)/48(50.0)	0.89(0.289-2.741)	0.841	C/T	11(50)/48(50)	0.89(0.289-2.741)	0.841
A/A	5(22.7)/26(27.0)	0.82(0.215-3.186)	0.78	T/T	5(22.7)/26(27.0)	0.82(0.215-3.186)	0.79
Modelo Dominante				Modelo Dominante			
C/C	6(27.2)/22(22.9)	1		C/	6(27.2)/22(22.9)	1	
C/A + A/A	16(72.7)/74(77.0)	0.79(0.302-2.505)	0.80	C/T + T/T	16(72.7)/74(77.0)	0.87(0.302-2.505)	0.797
Modelo Recesivo				Modelo Recesivo			
C/C + C/A	17(77.3)/70(72.9)	1		C/C + C/T	17(77.2)/70(72.9)	1	
A/A	5(22.7)/26(27.0)	0.89(0.283-2.805)	0.85	T/T	5(22.7)/26(27.0)	0.89(0.283-2.805)	0.845
Alelos				Alelos			
C	10(45.4)/52(54.1)	1		C	10(45.4)/51(54.1)	1	
A	12(54.5)/44(45.8)	1.32(0.517-3.408)	0.56	T	12(54.5)/44(45.8)	1.32(0.517-3.408)	0.555
p EHW**			0.986	p EHW**			0.986

Razones de Momios ajustadas por edad y uso de inyecciones hormonales (anticonceptivo)

** Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg en controles.

*Valor p<0.05

Cuadro 6. Continuación							
Análisis de asociación de los SNPs (-590 IL-4, -573 IL-6, (-592.-819,-1082) IL-10, -509 TGF-β1, -380 TNF-α, -1615 IFN-γ) de su región promotora con Persistencia de VPH.							
(IL-10 -1082 A/G)				(TGF-β1 -509 C/T)			
Genotipo	n(%)Persistencia/(%)S in Persistencia (n=22/96)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Persistencia/(%)S in Persistencia (n=22/96)	RMa (IC95%)	Valor p*
Modelo Codominante				Modelo Codominante			
A/A	13(59.0)/57(59.3)	1		C/C	6(27.2)/18(18.8)	1	
A/G	6(27.2)/35(36.4)	0.74(0.255-2.146)	0.581	C/T	11(50)/50(52.0)	0.65(0.208-2.087)	0.479
G/G	3(13.6)/4(4.2)	3.24(0.635-16.574)	0.157	T/T	5(22.7)/28(29.2)	0.48(0.125-1.832)	0.283
Modelo Dominante				Modelo Dominante			
A/A	6(27.2)/22(22.9)	1		C/C	6(27.2)/18(18.8)	1	
A/G + G/G	16(72.7)/74(77.0)	0.99(0.386-2.584)	0.999	C/T + T/T	16(72.7)/78(81.3)	0.58(0.198-1.749)	0.341
Modelo Recesivo				Modelo Recesivo			
A/A + A/G	19(86.3)/92(95.8)	1		C/C + C/T	18(81.8)/68(70.8)	1	
G/G	3(13.6)/4(4.2)	3.60(0.732-17.72)	0.115	T/T	4(18.1)/28(29.2)	0.47(0.146-1.547)	0.218
Alelos				Alelos			
A	16(72.7)/81(84.3)	1		C	11()/57()	1	
G	6(27.2)/15(15.62)	2.03(0.666-6.188)	0.213	T	11()/39()	1.41(0.550-3.650)	0.47
p EHW**			0.632	p EHW**			0.602
(TNF-α -380 G/A)				(IFN-γ -1615 C/T)			
Genotipo	n(%)Persistencia/(%)S in Persistencia (n=22/96)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Persistencia/(%)S in Persistencia (n=22/96)	RMa (IC95%)	Valor p*
Modelo Codominante				Modelo Codominante			
G/G	20(90.9)/83(86.4)	1		C/C	11(50.0)/61(63.5)	1	
G/A	2(9.0)/13(13.5)	0.82(0.167-4.109)	0.818	C/T	9(40.9)/31(32.3)	1.59(0.593-4.296)	0.354
A/A	0(0)/0(0)	/	/	T/T	2(9.0)/4(4.2)	2.42(0.387-15.189)	0.34
Modelo Dominante				Modelo Dominante			
G/G	20(90.9)/83(86.4)	1		C/C	11(50.0)/61(63.5)	1	
G/A + A/A	2(9.0)/13(13.5)	0.82(0.167-4.109)	0.818	C/T + T/T	11(50.0)/35(36.5)	1.69(0.662-4.359)	0.27
Modelo Recesivo				Modelo Recesivo			
G/G + G/A	22(100)/96(100)	1		C/C + C/T	20(90.9)/92(95.8)	1	
A/A	0(0)/0(0)	/	/	T/T	2(9.0)/4(4.2)	2.01(0.337-11.991)	0.442
Alelos				Alelos			
G	17(77.2)/90(93.7)	1		C	13(59.0)/78(81.2)	1	
A	5(22.7)/6(6.2)	3.96(1.079-14.581)	0.038	T	9(40.9)/18(18.7)	2.98(1.094-8.146)	0.033
p EHW**			0.476	p EHW**			0.98

Razones de Momios ajustadas por edad y uso de inyecciones hormonales (anticonceptivo)

** Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg en controles.

*Valor p<0.05

De igual forma se evaluó la asociación de los polimorfismos analizados con eliminación del VPH. Los ORs fueron estimados a través de regresión logística ajustada nuevamente por edad y uso de inyecciones hormonales. Se observó significancia estadística con el polimorfismo -509 (TGF- β 1), el genotipo heterocigoto C>T tuvo un OR de 0.18 (IC 95% 0.037-0.889 $p<0.035$) y el genotipo homocigoto T>T un OR de 0.15 (IC 95% 0.027-0.807 $p<0.027$) al evaluar el modelo codominante. Para este análisis los ORs nos indican que el portar el alelo T de este SNP confiere protección contra la eliminación del VPH. Al evaluar el modelo dominante se encontró que los genotipos C>T y T>T mostraron un OR de 0.17 (IC 95% 0.036-0.811 $p<0.026$) refiriendo nuevamente significancia con protección hacia la eliminación del VPH. **(Cuadro 7).**

Cuadro 7.							
Análisis de asociación de los SNPs (-590 IL-4, -573 IL-6, (-592.-819,-1082) IL-10, -509 TGF-β1, -380 TNF-α, -1615 IFN-γ) de su región promotora con Eliminación de VPH.							
(IL- 4 -590 C/T)				(IL-6 -573 G/C)			
Genotipo	n(%)Eliminación/(%) Sin Eliminación (n=85/33)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Eliminación/(%) Sin Eliminación (n=85/33)	RMa (IC95%)	Valor p*
Modelo Codominante				Modelo Codominante			
C/C	14(16.4)/5(15.1)	1		G/G	33(38.8)/12(36.3)	1	
C/T	38(44.7)/14(42.4)	0.60(0.166- 2.224)	0.452	G/C	41(48.2)/15(45.4)	0.86(0.344-2.164)	0.755
T/T	33(38.8)/14(42.4)	0.59(0.164-2.170)	0.433	C/C	11(12.9)/6(18.1)	0.75(0.219-2.572)	0.65
Modelo Dominante				Modelo Dominante			
C/C	14(16.4)/5(15.1)	1		G/G	33(38.8)/12(36.3)	1	
C/T + T/T	71(83.5)/28(84.8)	0.60(0.179-2.023)	0.412	G/C + C/C	52(61.1)/21(63.6)	0.83(0.352-1.966)	0.676
Modelo Recesivo				Modelo Recesivo			
C/C + C/T	52(61.1)/19(57.5)	1		G/G +G/C	74(87.0)/27(81.8)	1	
T/T	33(38.8)/14(42.4)	0.85(0.369-1.998)	0.724	C/C	11(12.9)/6(18.8)	0.81(0.263-2.505)	0.718
Alelos				Alelos			
C	34(40)/14(42.4)	1		G	48(56.4)/20(60.6)	1	
T	51(60)/19(57.5)	1.05(0.453-2.449)	0.903	C	37(43.5)/13(39.3)	1.18(0.510-2.771)	0.687
p EHW**			0.23	p EHW**			0.731
(IL-10 -592 C/A)				(IL-10 -819 C/T)			
Genotipo	n(%)Eliminación/(%) Sin Eliminación (n=85/33)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Eliminación/(%) Sin Eliminación (n=85/33)	RMa (IC95%)	Valor p*
Modelo Codominante				Modelo Codominante			
C/C	23(27.0)/5(15.1)	1		C/C	23(27.0)/5(15.1)	1	
C/A	43(50.5)/16(48.4)	0.57(0.180-1.817)	0.344	C/T	43(50.5)/16(48.4)	0.57(0.180-1.817)	0.344
A/A	19(22.3)/12(36.3)	0.43(0.125-1.505)	0.18	T/T	19(22.3)/12(36.3)	0.43(0.125-1.505)	0.18
Modelo Dominante				Modelo Dominante			
C/C	23(27.0)/5(15.1)	1		C/C	23(27.0)/5(15.1)	1	
C/A + A/A	62(72.9)/28(84.8)	0.51(0.173-1.530)	0.23	C/T + T/T	62(72.9)/28(84.8)	0.51(0.173-1.530)	0.232
Modelo Recesivo				Modelo Recesivo			
C/C + C/A	66(77.6)/21(63.6)	1		C/C + C/T	66(77.6)/21(63.6)	1	
A/A	19(22.3)/12(36.3)	0.63(0.251-1.610)	0.34	T/T	19(22.3)/12(36.3)	0.63(0.251-1.610)	0.34
Alelos				Alelos			
C	42(49.4)/19(57.5)	1		C	42(49.4)/19(57.5)	1	
A	43(50.5)/14(42.4)	1.38(0.593-3.212)	0.45	T	43(50.5)/14(42.4)	1.38(0.593-3.212)	0.45
p EHW**			0.929	p EHW**			0.929

Razones de Momios ajustadas por edad y uso de inyecciones hormonales (anticonceptivo)

** Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg en controles.

*Valor p<0.05

Cuadro 7. Continuación							
Análisis de asociación de los SNPs (-590 IL-4, -573 IL-6, (-592.-819,-1082) IL-10, -509 TGF-β1, -380 TNF-α, -1615 IFN-γ) de su región promotora con Eliminación de VPH.							
(IL-10 -1082 A/G)				(TGF-β1-509 C/T)			
Genotipo	n(%)Eliminación/(%) Sin Eliminación (n=85/33)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Eliminación/(%) Sin Eliminación (n=85/33)	RMa (IC95%)	Valor p*
Modelo Codominante				Modelo Codominante			
A/A	49(57.6)/21(63.6)	1		C/C	22(25.8)/2(6.0)	1	
A/G	32(37.6)/9(27.2)	1.51(0.606-3.801)	0.372	C/T	41(48.2)/20(60.6)	0.18(0.037-0.889)	0.035
G/G	4(4.7)/3(9.0)	0.57(0.114-2.896)	0.503	T/T	22(25.8)/11(33.3)	0.15(0.027-0.807)	0.027
Modelo Dominante				Modelo Dominante			
A/A	49(57.6)/21(63.6)	1		C/C	22(25.8)/2(6.0)	1	
A/G + G/G	36(42.3)/12(36.3)	1.28(0.549-2.995)	0.565	C/T + T/T	63(74.1)/31(93.9)	0.17(0.036-0.811)	0.026
Modelo Recesivo				Modelo Recesivo			
A/A + A/G	81(95.2)/30(90.9)	1		C/C + C/T	64(75.2)/22(66.6)	1	
G/G	4(4.7)/3(9.0)	0.49(0.101-2.430)	0.388	T/T	21(24.7)/11(33.3)	0.54(0.216-1.356)	0.191
Alelos				Alelos			
A	67(78.8)/30(90.9)	1		C	42(49.4)/25(75.7)	1	
G	18(21.1)/3(9.0)	3.29(0.851-12.771)	0.084	T	43(50.5)/8(24.2)	3.64(1.394-9.522)	0.008
p EHW**			0.199	p EHW**			0.075
(TNF-α -380 G/A)				(IFN-γ -1615 C/T)			
Genotipo	n(%)Eliminación/(%) Sin Eliminación (n=85/33)	RMa (IC95%)	Valor p*	Genotipo	n(%)Eliminación/(%) Sin Eliminación (n=85/33)	RMa (IC95%)	Valor p*
Modelo Codominante				Modelo Codominante			
G/G	74(87.0)/29(87.8)	1		C/C	51(60)/21(63.6)	1	
G/A	11(12.9)/4(12.1)	1.62(0.416-6.366)	0.484	C/T	28(32.9)/12(36.3)	0.40(0.388-2.189)	0.855
A/A	0(0)/0(0)	/	/	T/T	6(7.0)/0(0)	/	/
Modelo Dominante				Modelo Dominante			
G/G	74(87.0)/29(87.8)	1		C/C	51(60.0)/21(63.6)	1	
G/A + A/A	11(12.9)/4(12.1)	1.62(0.416-6.366)	0.484	C/T + T/T	34(40.0)/12(36.3)	1.10(0.469-2.576)	0.826
Modelo Recesivo				Modelo Recesivo			
G/G + G/A	85(100)/33(100)	1		C/C + C/T	79(92.9)/33(100)	1	
A/A	0(0)/0(0)	/	/	T/T	6(7.0)/0(0)	/	/
Alelos				Alelos			
G	74(87.0)/32(96.9)	1		C	63(74.11)/28(84.8)		
A	11(12.9)/1(3.0)	3.90(0.471-32.384)	0.21	T	22(25.88)/5(15.1)	1.92(0.651-5.692)	0.24
p EHW**			0.71	p EHW**			0.201

Razones de Momios ajustadas por edad y uso de inyecciones hormonales (anticonceptivo)

** Prueba de Equilibrio Hardy-Weinberg en controles.

*Valor p<0.05

DISCUSIÓN

Factores de riesgo asociados a infección por el VPH a nivel del cérvix

Para el presente estudio las variables que mostraron relación estadísticamente significativa con infección por VPH fueron la edad, exposición previa y actual al tabaco y uso de DIU e inyecciones hormonales, características que han sido asociadas en otros estudios epidemiológicos tanto para infección por VPH, como para CaCU.(6,17) Se conoce que la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias e intermitentes en donde la edad tiene un papel fundamental, en las mujeres menores de 30 años cerca del 70% de la infecciones desaparecen aproximadamente en un año y el 91% en dos años, debido a que en edades tempranas el sistema inmune produce una respuesta con mayor eficacia controlando e interrumpiendo la evolución de esta infección en comparación con lo sucedido en edades más avanzadas.(1,18) La edad promedio de mujeres positivas al VPH en este estudio fue de 37 años lo cual tendría sentido al ser una de las etapas más activas sexualmente en la población, lo que resulta en una mayor exposición de este grupo a infecciones por el VPH.

El tabaquismo ha sido señalado por tener relación directa entre el riesgo de lesiones por el VPH y la duración e intensidad del tabaquismo. En promedio se considera que la fumadoras tienen el doble de riesgo de conservar un infección por el VPH y de sufrir un lesión. En estudios recientes se ha demostrado la presencia de nicotina, cotinina y otros mutágenos derivados del tabaco, en mujeres fumadoras con infección por VPH y lesión intraepitelial, se conoce que estos mutágenos ocasionan un daño molecular en el ADN del tejido cervicouterino por medio de un efecto tóxico directo, ocasionando además un efecto inmunosupresor local provocando mayor susceptibilidad para infecciones.(19)

Persistencia del VPH en el primer año de seguimiento de la cohorte

Para una infección persistente por el VPH el VPH-AR es un factor necesario pero no suficiente, de tal manera que se requiere de la combinación de varios factores para producir dicho evento, como el tabaquismo, uso de anticonceptivos orales, comportamiento sexual, edad, alteración del sistema inmunológico, co-infecciones, etc.(20)

El genotipo de VPH más prevalente en la población de estudio fue el VPH-58 (17.73%) al igual que fue el genotipo con mayor persistencia al año de seguimiento (5%). De igual forma se observó relación entre la presencia de VPH-AR y la persistencia del VPH ($p < 0.008$), resultados que coinciden con otros estudios como el de Canción JS. en 2013 cuando evaluó la importancia de la infección por el VPH-58 en mujeres positivas a VPH. (18) En este estudio se incluyeron a 265 mujeres de las cuales 158 presentaban infección por VPH-AR característica que fue indispensable para infección persistente con un OR de 15.459 (IC 95%: 2.042-117.045), de igual forma se reporta que las mujeres con VPH-58 tuvieron un riesgo más alto con un OR de 5.260 (IC 95%: 1.538-17.987) para una infección persistente y desarrollo de lesión intraepitelial que las mujeres con VPH-16 con un OR 3.822 (IC 95%: 1.176-12.424) en comparación con las mujeres con otros tipos de VPH-AR. (21)

El uso de anticonceptivos hormonales ha sido sugerido como un factor de riesgo para la persistencia de una infección debido a que genera cambios tanto químicos como físicos del moco cervical lo que facilita la entrada de diferentes agentes mutagénicos que condicionan alteración de la respuesta inmune local teniendo como resultado una mayor susceptibilidad a agentes virales. (19,22)

Eliminación del VPH en el primer año de seguimiento de la cohorte

En el presente estudio el genotipo que fue eliminado mayormente en las mujeres que fueron evaluadas en el primer año de seguimiento fue el genotipo 53 (20%). Es bien sabido que ante una infección por VPH de alto o bajo riesgo el sistema inmune tiene un papel clave para activar una respuesta dirigida a eliminar el VPH, prueba de ello es un estudio realizado por Scott ME. en 2013 donde evaluó la relación entre las citocinas cervicales y eliminación de la infección por el VPH, en dicho estudio se pudo observar que en mujeres con infecciones incidentes por VPH de alto riesgo presentaban una alta expresión de citocinas proinflamatorias tipo 1 dirigidas a erradicar la infección, sin embargo las pacientes que presentaban niveles elevados de IL-10 se asociaron con tiempos estadísticamente más largos de depuración del VPH, estos resultados subraya el compromiso a corto y largo plazo de los mediadores inmunes locales con la erradicación del VPH de alto o bajo riesgo. (23)

Niveles de expresión del ARNm de IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH

Ante el papel del VPH en la génesis del CaCU se ha estudiado de manera diversa la respuesta del sistema inmune tanto en lesiones precancerosas como en el cáncer de cérvix en donde se ha identificado un estado de inmunosupresión el cual se caracteriza por un aumento de la expresión de las interleucinas tipo II y III (IL-4, IL-10, IL-6 y TGF- β 1 supresoras de la respuesta inmune celular) acompañado de una reducción de las interleucinas tipo I (IL-2, IFN- γ y TNF- α) el cual favorece la progresión de las lesiones precancerosas o bien el establecimiento y desarrollo de CaCU.(4,24) En un estudio reciente se ha postulado un perfil genético de respuesta inmune Th2-Th3, implicado en el riesgo para el desarrollo de CaCU.(9) Sin embargo, no existen estudios que relacionen los niveles de expresión de citocinas Th1, Th2 y Th3 a nivel de cérvix en estados

de persistencia o eliminación de VPH, siendo uno de los objetivos del presente estudio.

Niveles de expresión del ARNm de IL-4 a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH

IL-4 es una glucoproteína producida por un grupo de células específicas como linfocitos Th2, basófilos, mastocitos y eosinófilos activados. Dentro de sus principales funciones se encuentra promover la diferenciación de linfocitos Th2, de linfocitos B, bloquea la actividad inflamatoria de IL-1, TNF- α e IL-6 y es considerada como un potente inhibidor de la apoptosis. Su participación es bien conocida en diferentes procesos inmunológicos dentro de los que destacan atopias, asma y procesos cancerígenos.(25,26)

Su participación en CaCU ha sido estudiada como parte del grupo de citocinas Th2. Daniilidis A. y colaboradores en 2016 realizaron un estudio donde describen los niveles de citocinas en mucosa de cuello uterino de mujeres infectadas con VPH. Participaron un total de 97 mujeres, 27 de ellas presentaban lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, 48 con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado y 22 con un frotis normal. Las citocinas evaluadas fueron IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TNF- β y TGF- β 1 y se detectaron niveles significativamente menores de IL-4 en muestras cervicales obtenidas del grupo con lesión escamosa intraepitelial de bajo grado cuando se compararon con muestras obtenidas del grupo lesión escamosa intraepitelial de alto grado.(27) Estos resultados resaltan la importancia de los niveles elevados de IL-4 en lesiones ocasionadas por VPH.

En el presente estudio los niveles de expresión del ARNm de IL-4 normalizados con actina a nivel de cérvix fueron mayores en los casos con persistencia del VPH comparados con los casos que presentaron eliminación del VPH. Al evaluar la asociación entre los niveles de expresión de IL-4 con persistencia y eliminación del

VPH no se encontró significancia estadística para esta citocina. Aunque no se encontró asociación estadística, si se pudo evidenciar que los niveles de expresión de IL-4 suelen ser mayores en estados infecciosos, coincidiendo en este caso con los niveles observados para persistencia del VPH.

Niveles de expresión del ARNm de IL-6 a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH

Es bien conocido que IL-6 es una citocina multifuncional caracterizada por su producción en diferentes tipos celulares como monocitos, macrófagos, queratinocitos, linfocitos T y B, fibroblastos, adipocitos, entre otras células. La literatura reporta que los principales estímulos para su síntesis y liberación son los procesos infecciosos ocasionados por diferentes agentes patógenos como virus o bacterias además de las acciones que tienen otras citocinas como IL-1. (28,29)

Se conoce que los principales objetivos y dianas celulares de IL-6 son los linfocitos T y B, monocitos, macrófagos y los hepatocitos. Tiene una amplia participación en procesos crónicos como enfermedades autoinmunes o cáncer.(30) Existen muchos artículos que relacionan los niveles de expresión de IL-6 con el mal pronóstico de CaCU, prueba de ello es un artículo publicado recientemente donde se demuestra que en pacientes con esta neoplasia los niveles de expresión del ARNm de IL-6 son mayores comparados con los niveles de expresión de otras citocinas como las que siguen un patrón Th1, con predominio de una respuesta antiinflamatoria de esta citocina, además se menciona que estos niveles elevados de IL-6 se asocian a un efecto promotor en el crecimiento de células tumorales y angiogénesis tumoral, siendo eventos claves para el desarrollo de CaCU.(9)

No obstante, es importante recordar que esta citocina tiene una actividad pleiotrópica, es decir además de su efecto antiinflamatorio en etapas crónicas ya antes mencionado, también se ha descrito un efecto proinflamatorio principalmente en etapas agudas de una patología.(31) Ya lo describían Malejczyk

J. y colaboradores cuando evaluaron la liberación constitutiva de IL-6 por los queratinocitos de neoplasias portadoras de VPH 16. En este estudio demostraron que en la línea celular de queratinocitos humanos cultivados que albergan y expresan secuencias de ADN integrado del virus del VPH 16, IL-6 no estimuló el crecimiento de los queratinocitos; sin embargo, si aumentó significativamente la actividad de las células NK de los linfocitos de sangre periférica humana contra los queratinocitos infectados. Estos resultados sugieren que en etapas iniciales las células neoplásicas infectadas con VPH pueden liberar IL-6, que puede mediar indirectamente la muerte del tumor mediante el aumento de la actividad de las células NK.(32)

Además de la investigación antes mencionada, evidencias recientes indican que IL-6 en etapas agudas de una infección promueve el desarrollo de células TH17. Dichas células producen la quimiocina IL-17, una quimiocina proinflamatoria que ayuda al reclutamiento de otras células del sistema inmune en los tejidos periféricos con el objetivo de la abolición del proceso infeccioso o proceso patológico agudo.(33)

En el presente estudio los niveles de expresión del ARNm de IL-6 normalizados con actina a nivel de cérvix fueron mayores en los casos con eliminación del VPH comparados con los casos con persistencia del VPH. Al evaluar la asociación entre los niveles de expresión de IL-6 con persistencia del VPH, no se encontró asociación estadísticamente significativa; sin embargo, al evaluar la asociación entre los niveles de expresión de IL-6 y eliminación del VPH se encontró un Coeficiente β de 1.16 (IC 95% 0.149-2.183 $p < 0.025$), es decir existe una asociación estadísticamente significativa entre IL-6 y la eliminación del VPH, lo que se tradujo en que las mujeres que presentaron eliminación del VPH tuvieron 1.16 veces más unidades relativas de expresión de IL-6 en comparación con los sujetos que no presentaron eliminación del VPH. Aunque no existen investigaciones previas que hayan evaluado esta asociación, estos resultados coinciden con algunas investigaciones ya realizadas previamente en tumores no

cancerígenos causados por el VPH y refuerzan el conocimiento sobre la función pleiotrópica de esta citocina.

Niveles de expresión del ARNm de IL-10 a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH

IL-10 es considerada una citocina Th2 con características antiinflamatorias que participa de manera activa en la regulación de la respuesta inmune adaptativa e innata. Se conoce que la IL-10 es producida por los linfocitos T CD4 Y CD8, fibroblastos, monocitos, entre otros.(34) Dentro de sus principales funciones se encuentra la inhibición la proliferación de linfocitos T e inhibición de la inflamación, así como la disminución de citocinas Th1.(35) Su participación en procesos infecciosos por VPH es fundamental, prueba de ello son los hallazgos que se han realizado al respecto de que IL-10 presenta una alta expresión asociada a la frecuencia de los tipos de VPH y la gravedad de las lesiones que provoca.(36,37) Aranary y colaboradores mencionan que tanto la persistencia y progresión de las lesiones ocasionadas por el VPH se ven favorecidas por mecanismos específicos IL-10 que cambian la expresión de citocinas en el microambiente cervical, basados principalmente en disminución de citocinas antiinflamatorias.(38)

De igual forma se ha informado que en pacientes con lesiones intraepiteliales y en estadios de CaCU se ha detectado niveles más altos de IL-4 e IL-10 en comparación de aquellos grupos sin lesiones justificando que las células transformadas por el VPH son las principales productoras de estas citocinas.(4,39,40)

En 2016 Torres Poveda y colaboradores describen el papel de IL-10 y TGF-B1 en la inmunosupresión local en neoplasia cervical asociada a VPH reportando que existen niveles más altos de IL-10 en suero y a nivel de cérvix en pacientes en etapas más tempranas de las lesiones ocasionadas por el VPH. De igual forma evidencian que los niveles de expresión del ARNm del IL-10 y los niveles de su

proteína en suero suelen ser significativamente más altos en lesión intraepiteliales que en pacientes sin alteraciones en cérvix.(4) De tal manera que la presencia de IL-10 es etiquetada como un factor elemental y clave para el desarrollo de una respuesta inmune alterada en la presencia de lesiones del cérvix.

Sin embargo, contrario a las investigaciones anteriormente comentadas, en el presente estudio los niveles de expresión del ARNm de IL-10 normalizados con actina a nivel de cérvix fueron ligeramente mayores en los casos con eliminación del VPH comparados con los casos con persistencia del VPH. Al evaluar la asociación entre los niveles de expresión de IL-10 con persistencia y eliminación del VPH no se encontró significancia estadística. Los resultados de este estudio pudieran estar influenciados por las co-infecciones que presentan algunas de las mujeres del estudio, pues si bien algunas de ellas presentaban eliminación para un genotipo de VPH al mismo tiempo desarrollaban incidencia de otro genotipo lo que explicaría probablemente los niveles elevados de IL-10 aún y en eliminación del VPH para este grupo de mujeres estudiadas.

Niveles de expresión del ARNm de TGF- β 1 a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH

TGF- β 1 es considerada como una de las citocinas originada de un subconjunto de células Th3, el papel que tienen TGF- β 1 es dual y hasta cierto punto controvertido y dependiente del estado inmunológico, tejido afectado o tipo de daño en el que participe. Esta citocina es producida por una gran cantidad de células entre ellas plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos.(41,42)

Estudios previos mencionan que esta citocina tiene la capacidad de inhibir las actividades de estimulación de las células presentadoras de antígeno generando ausencia de las respuestas inmunitarias así como falta de proliferación y diferenciación de Linfocitos T en LT citotóxicos y auxiliares. En estados de cáncer se menciona que TGF- β 1 puede promover la progresión tumoral al facilitar la

invasión de la matriz extracelular y la angiogénesis.(43) En un estudio reciente en donde evalúan la expresión el ARNm de diferentes citocinas en tumores de cérvix se menciona que todos los tumores expresaron ARNm de TGF- β 1 e IFN- γ .(9)

Contrario a estos efectos mencionados, también se ha estudiado y demostrado que TGF- β 1 por un mecanismo específico sobre las células presentadoras de antígeno puede favorecer una respuesta inmune tipo Th2. Shier MK. y colaboradores demuestran que TGF- β 1 es una proteína inhibidora del crecimiento celular. En este estudio utilizaron líneas celulares transformadas con VPH 16 y 18. Sus resultados sugieren que TGF- β 1 puede tener efectos antiproliferativos específicamente sobre algunas células transformadas con VPH al generarse una regulación negativa de la expresión y de la función de diferentes moléculas potenciadoras de la proliferación.(44)

En este trabajo de tesis los niveles de expresión del ARNm de TGF- β 1 normalizados con actina a nivel de cérvix fueron mayores en los casos con eliminación del VPH comparados con los casos de persistencia de VPH; así al evaluar la asociación entre los niveles de expresión de TGF- β 1 con persistencia y eliminación del VPH no se encontró significancia estadística. Si bien no existen estudios previos que evalúen de manera específica los niveles de expresión de TGF- β 1 en persistencia o eliminación del VPH, los resultados de este estudio coinciden con algunos estudios previamente mencionados, apoyando entonces la hipótesis de su participación en la activación de la respuesta inmune contra patógenos como VPH.

Niveles de expresión del ARNm de TNF- α a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH

TNF- α es miembro de un grupo de citocinas tipo Th1 que se estimula principalmente en la fase aguda de reacciones inflamatorias, se conoce que esta citocina está relacionada con el transcurso de distintas agresiones celulares,

siendo las infecciones uno de sus principales ejemplos. Su participación en procesos crónicos es contraria a la mencionada en fases agudas. En diferentes estudios se ha postulado que TNF- α como miembro de las citocinas tipo Th1 muestra niveles bajos en estadios de CaCU en comparación con los niveles expresados en etapas iniciales de la infección por el VPH.(45,46)

En 2016 se publica un artículo donde evalúan los niveles de expresión de citocinas Th1, Th2 y Th3 en mujeres con CaCU y en controles con VPH positivo en donde se observa que los niveles de expresión de TNF- α fueron mucho más bajos para las pacientes con CaCU comparados con los niveles observados en las pacientes VPH positivo siendo estos resultados estadísticamente significativos con una $p < 0,00001$. Estos datos ponen en evidencia el papel descrito de TNF- α como elemento fundamental en las respuesta inmune aguda desencadenada frente a infecciones virales.(9)

Para el presente estudio los niveles de expresión del ARNm de TNF- α normalizados con actina a nivel de cérvix fueron mayores en los casos con eliminación del VPH comparados con los casos con persistencia del VPH, de igual forma se evaluó la asociación entre los niveles de expresión de TNF- α con persistencia y eliminación del VPH sin encontrar significancia estadística. Estos resultados están relacionados con lo descrito en la literatura, pues al encontrar niveles más altos en eliminación del VPH se entendería el papel que tiene esta citocina ante la erradicación de una enfermedad infecciosa en etapas agudas, se debe recordar que existían pacientes que mientras presentaban eliminación para un tipo viral, al mismo tiempo podían presentar incidencia de otro genotipo lo que reforzaría la explicación de encontrar niveles altos de TNF- α en casos de eliminación del VPH.

Niveles de expresión del ARNm de IFN- γ a nivel de cérvix en casos de persistencia y eliminación del VPH

Es bien conocido que IFN- γ pertenece al grupo de citocinas Th1 con grandes funciones antiinflamatorias, producida por los linfocitos T CD4 y NK, el IFN- γ se encarga de la activación de macrófagos y de potenciar el efecto de fagocitosis de estas células, de igual forma la literatura menciona que IFN- γ participa en la diferenciación de LT CD4 en LT Th1 disminuyendo la respuesta Th2.(47,48) En 2014 Ramanathan P. y colaboradores demuestran la participación activa de IFN- γ en tumores de cérvix positivos a VPH lo que indica que las células dendríticas presentes en el ambiente tumoral presentaban una gran estimulación de la proliferación de LT y secreción IFN- γ potenciando así la respuesta Th1.(49)

En este estudio se evaluaron los niveles de expresión de IFN- γ en los casos de persistencia y eliminación del VPH. Los niveles de expresión del ARNm de IFN- γ normalizados con actina a nivel de cérvix fueron mayores en los casos con persistencia del VPH comparados con los casos con eliminación del VPH y se evaluó la asociación entre los niveles de expresión de IFN- γ con persistencia y eliminación del VPH sin encontrar significancia estadística. Encontrar niveles más altos de IFN- γ en los casos con persistencia del VPH reflejaría el papel de esta citocina en fases agudas de una patología/infección ocasionando un proceso antiinflamatorio.

Asociación de los polimorfismos en región promotora -590 IL-4, -573 IL-6, -592, -819, -1082 IL-10, -509 TGF- β 1, -308 TNF- α y -1615 IFN- γ .

Como se ha mencionado el sistema inmune desempeña un papel clave durante una infección por VPH ya que la eliminación del virus está determinada por reacciones inmunes específicas genéticamente predeterminadas encargadas de liberación de distintos elementos dirigidos contra la infección. Las citocinas son fundamentales en esta respuesta inmune donde distintos polimorfismos

identificados pueden ser responsables de las variaciones en los niveles de expresión observados entre individuos con distintas enfermedades.(19)

Se han estudiado e identificado un gran número de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en región promotora de citocinas como -590 C> T (IL-4), -573 G>C (IL-6), -592 C>A, -819 C>T, -1082 A>G (IL-10), -509 C>T (TGF- β 1), -308 G>A (TNF- α) y -1615 C>T (IFN- γ), los cuales se han asociado a variaciones en la respuesta inmune del huésped contribuyendo al riesgo de CaCU. (9)

Polimorfismo -590 C>T y su asociación con persistencia y eliminación del VPH.

Es bien conocido que el gen que codifica para IL-4 se encuentra localizado en el cromosoma 5 (5q31), región en donde podemos encontrar a otros genes que codifican para citocinas Th2.(50) El polimorfismo -590 C >T en la región promotora del gen IL-4 es la variación más comúnmente reportada de este gen; sin embargo, existen pocos artículos que asocien este polimorfismo con infecciones virales o cáncer. Algunos autores mencionan que el alelo T del SNP -590 C>T se ha asociado con un incremento en la actividad transcripcional in vitro, esto es debido a que el SNP se encuentra dentro de 5'UTR del gen, teniendo como resultado alteraciones en esta región con capacidad de influir en la transcripción y estabilización del ARNm y que ocasionan un aumento de las concentraciones plasmáticas con una gran variedad de fenotipos.(9,51)

Dentro de los estudios encontrados para el polimorfismo -590 C>T se reporta que esta variación del gen se asocia a distintas alteraciones del sistema inmunológico generando pérdida de la homeostasis de un individuo. En edades pediátricas, este polimorfismo ha presentado mayor asociación con alergias, asma, artritis idiopática juvenil, hepatitis autoinmune y vasculitis sistémicas siendo la enfermedad de Kawasaki la vasculitis más característica,(52–54) en etapas adultas se ha reportado gran asociación con enfermedades como artritis

reumatoide, gastritis ocasionada por Helicobacter Pylori, cáncer gástrico y rinitis alérgica.(52,55)

El hallazgo de mayor relevancia para el presente estudio es la asociación reportada por Torres Poveda y colaboradores en 2016, donde en un estudio de casos y controles realizado en 200 pacientes con CaCU y 200 controles hospitalarios se demostró que una copia del alelo T de riesgo del SNP -590 C>T presentó un OR de 2.22 (IC 95% 1.238 a 3.987 p <0.007) para CaCU, es decir que una copia de este alelo de riesgo fue suficiente para incrementar el riesgo de CaCU al igual que en los individuos portadores de dos copias de este alelo de riesgo, siendo este el primer estudio en mostrar dicha evidencia.(9) Contrario a lo anteriormente mencionado, en el presente estudio se analizó el polimorfismo -590 C>T de la región promotora de IL-4 en pacientes con persistencia y/o eliminación del VPH en donde los individuos que fueron portadores de una copia del alelo T de riesgo del SNP -590 presentaron un OR de 0.19 (IC 95% 0.060-0.653 p<0.008) para persistencia del VPH, sin encontrar asociación significativa en eliminación del VPH. De tal forma que una copia del alelo de riesgo T se considera suficiente para conferir protección ante la persistencia de VPH y el hecho de tener dos copias de este alelo genera exactamente la misma protección. Sin embargo, hasta este momento no existen otros reportes en la literatura que apoyen dicha asociación en cáncer, persistencia y/o eliminación del VPH.

Polimorfismo -573 G>C y su asociación con persistencia y eliminación del VPH.

Se sabe que el gen IL-6 tiene una relación importante en los procesos inmunológicos e inflamatorios, este gen ha sido mapeado en el cromosoma 7 (7p21).(28) Jeong-Shi Lin menciona que el gen IL-6 es uno de los genes de las familias de interleucinas que codifica una proteína citocina fosforilada glucosilada relacionada con la inflamación, maduración de las células B y mantenimiento de la homeostasis inmunitaria, por lo que se ha vinculado con una gran variedad de

estados de enfermedad asociados con la inflamación.(56) Se han estudiado varios polimorfismos presentes en este gen, siendo el SNP -573 G>C localizado en su región promotora el que se ha asociado como un factor de riesgo genéticamente predeterminado para distintos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón, cáncer de mama, adenocarcinoma de endometrio o CaCU, debido a la sobreproducción del ARNm e incremento en los niveles de su citocina con efecto estimulante en el crecimiento de las células tumorales.(57–59)

Recientes investigaciones demuestran que el polimorfismo -573 G>C se asocia con alteraciones en diferentes respuestas del sistema inmunológico que son activadas para combatir infecciones por distintos patógenos, como en el caso de tuberculosis o hepatitis B, generando susceptibilidad para padecerlas o agravar su desarrollo y evolución.(60,61) Respecto a su asociación con infección por VPH y CaCU, algunos autores mencionan que el polimorfismo -573 G>C en la región promotora del gen IL 6 que produce altos niveles en el plasma de su proteína, se asocia con la gravedad del cáncer y puede favorecer su progresión al promover la angiogénesis a nivel del tumor.(57) En el presente estudio se analizó el polimorfismo -573 G>C de IL-6 en pacientes con persistencia y eliminación del VPH, demostrando en el análisis por alelos que los individuos portadores del alelo C de riesgo del SNP -573 presentaron un OR de 2.80 (IC 95% 1.058-7.450 $p<0.038$) para persistencia del VPH, sin encontrar asociación significativa en eliminación del VPH, esto quiere decir que el ser portador del alelo C de riesgo es un elemento clave de riesgo para continuar con la persistencia de la infección del VPH. Estos resultados coinciden con otros estudios en donde se evalúa la asociación del polimorfismo -573 G>C con el riesgo para CaCU en mujeres infectadas por VPH 16, obteniendo un riesgo incrementado para cáncer al ser portador del genotipo homocigoto C/C con un OR de 3.2 (IC 95% 1.572-6.535 $p<0.001$), al igual que para las pacientes portadoras del alelo de riesgo C, observando un OR de 1.70 (IC 95% 1.208-2.404 $p<0.002$).⁽⁹⁾

Polimorfismo -592 C>A y su asociación con persistencia y eliminación del VPH.

Georgios S. Chatzopoulos reporta que el gen de IL-10 se encuentra en el cromosoma 1 (1q31-32) el cual posee cinco exones, es encargado de producir la citocina IL 10 que actúa como un inhibidor general de las respuestas proliferativas y de citocinas de las células T helper (Th) 1 y Th2 in vitro e in vivo.(62) Diversos estudios han encontrado que la región promotora del gen IL-10 es altamente polimórfica, identificando varios polimorfismos en esta región.(63) Se ha informado el impacto de tres polimorfismos comunes en el promotor del gen IL-10 -592 A>C, -1082 G>A y -819C>T asociados a CaCU y otras patologías.(63,64)

El polimorfismo -592 A>C se conoce por estar ubicado en el promotor del gen IL-10 en una región de control negativo, estudios previos demuestran que al generarse el cambio del nucleótido de C por A se genera un aumento en la actividad del promotor desencadenando un aumento de su capacidad represiva.(65) La literatura menciona dos factores de transcripción específicos (Sp1 y Sp3) que se unen a una región cercana del polimorfismo, los cuales tienen tanto la capacidad de activar como de inhibir la transcripción. En un estudio reciente se reporta que al expresarse el polimorfismo -592 A>C Sp1 pierde su capacidad inhibitoria transcripcional.(66)

La literatura reporta que el polimorfismo -592 A>C en la región promotora del gen IL-10 se ha asociado a distintas patologías como trombocitopenia inmune en la infancia, artritis idiopática juvenil, artritis reumatoide y a una evolución más grave de los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana.(65,67) En febrero de 2018 Guo C. y colaboradores publicaron un metanálisis que demuestra asociación significativa entre los polimorfismos del gen IL-10 y el riesgo de CaCU, mencionando que se combinaron diez estudios que constaban de 3.149 casos y 2.237 controles en el metanálisis para evaluar si el polimorfismo IL-10 -592 C>A se asociaba con el riesgo de CaCU obteniendo como resultado que el genotipo AA

con un OR de 1.86 (IC 95% 1.02-3.39 $p < 0.04$) y los genotipos CC y CA con un OR de 1.62 (IC 95% 1.06-2.49 $p < 0.03$) se asociaban con un mayor riesgo de CaCU en el grupo de población caucásica.(68) Sin embargo, no existen estudios previos que asocien el polimorfismo -592 C>A con persistencia y/o eliminación de la infección por el VPH y en el presente estudio tampoco se obtuvo asociación significativa para este polimorfismo, contrario a lo mencionado para otros estados inmunológicos o patológicos en un individuo.

Polimorfismo -819 C>T y su asociación con persistencia y eliminación del VPH.

El polimorfismo -819 C>T pertenece al grupo de polimorfismos localizados en el promotor del gen IL-10, estudios previos reportan que esta variación se localiza en una región caracterizada por la unión de elementos de respuesta a estrógenos, los cuales han demostrado tener la capacidad de regular la expresión de ciertas citocinas ya sea de manera directa o por medio de interacción con otros factores de transcripción.(9)

No hay investigaciones previas que hayan estudiado la asociación de polimorfismo -819 C>T con infección persistente y/o eliminación del VPH y existen pocos estudios que asocien esta variación con CaCU. En este estudio no se encontró asociación de esta variación con ninguno de los genotipos y modelos de herencia analizados. Hasta este momento se ha demostrado que este polimorfismo tiene un papel mayormente relacionado con enfermedades provocadas por alteración del sistema inmune, infecciones por ciertos agentes patógenos y enfermedades caracterizadas por alteraciones metabólicas, dentro de las cuales destacan cáncer gástrico, cáncer colorrectal, enfermedad inflamatoria del intestino, dengue, hepatitis crónica ocasionada por infección del virus de hepatitis B, enfermedad tiroidea autoinmune, síndrome metabólico y síndrome de ovario poliquístico.(69–71)

Hong Ren y colaboradores en un metanálisis en 2015 estudiaron la asociación del polimorfismo -819 C>T en el promotor del gen IL 10 con infección persistente por el virus de la hepatitis B en población asiática, demostrando que en la presencia del polimorfismo -819 C>T el alelo C aumentó significativamente el riesgo de infección persistente por VHB, obteniendo para el genotipo CC/TC un OR de 1.283 (IC 95% 1.023-1.610 $p<0.031$) y en el análisis por alelos, el alelo de riesgo C mostro un OR de 1.183 (IC 95% 1.001-1.399 $p< 0.049$).⁽⁷²⁾

En 2017 Amit Kumar y colaboradores demuestran asociación del polimorfismo -819 C>T con el desarrollo de síndrome metabólico en población india, observando para el genotipo TT analizado bajo el modelo codominante un OR de 1.62 (IC 95% 1.05–2.49 $p<0.03$) y para los genotipos CT y TT estudiados bajo el modelo dominante un OR de 1.35 (IC 95% 1.01–1.80 $p<0.04$).⁽⁷³⁾

Polimorfismo -1082 A>G y su asociación con persistencia y eliminación del VPH.

De todos los SNP's presentes en la región promotora del gen IL-10 el polimorfismo -1082 A>C ha sido sin duda uno de las variaciones de este gen más estudiadas y que ha mostrado gran relación con enfermedades ocasionadas por alteración del sistema inmune y padecimientos oncológicos.^(70,73)

Se conoce que este polimorfismo es una sustitución de A>G que se encuentra localizado dentro de un supuesto sitio de unión del factor de transcripción Ets. La literatura menciona que los factores de transcripción de la familia Ets son reguladores de gran importancia en la respuesta del sistema inmune y sobre todo en la proliferación celular, incrementando entonces la actividad promotora de este gen luego de la estimulación debida a su unión.⁽⁹⁾

En 2016 Gang Li demuestra la relación entre el polimorfismo -1082 A>G con Linfoma No Hodgkin en población, encontrando que los portadores del genotipo

AG bajo el modelo codominante y los genotipos AG/GG analizados bajo el modelo dominante tenían un riesgo significativamente mayor para el Linfoma No Hodgkin, obteniendo para el genotipo AG un OR de 1.042 (IC 95% 1.012-1.074 $p < 0.007$) y para el genotipo AG/GG un OR de 1.034 (IC 95% 1.011-1.057 $p < 0.003$). Asociaciones parecidas fueron mostradas para la población caucásica donde se observa para el genotipo GA un OR de 1.041 (IC 95% 1.009-1.075 $p < 0.011$) mientras que para los genotipos AG/GG un OR de 1.031 (IC 95% 1.008-1.055 $p < 0.009$). (74)

En el mismo metanálisis de Guo C. y colaboradores publicado en 2018 en el que demuestra asociación significativa entre los polimorfismos del gen IL 10 y el riesgo de CaCU, se realizó una búsqueda de 13 estudios enfocados a la asociación entre el polimorfismo IL-10 -1082 A>G y el riesgo de desarrollar CaCU los cuales estaban compuestos por 2,311 pacientes y 2,491 controles. Los resultados demuestran un riesgo significativamente mayor para desarrollar CaCU al ser portador de esta variación genética, observando para el genotipo AG analizado bajo el modelo codominante un OR de 1.34 (IC del 95% 1.04-1.74 $p < 0.03$), mientras que para los genotipos AG/GG analizados bajo en modelo dominante un OR de 1.58 (IC 95% 1.11-2.25 $p < 0.02$) y en el análisis por alelos un OR de 1.60, (IC 95% 1.12-2.29 $p < 0.01$) para el alelo G de riesgo. (68)

Contrario a las evidencias antes mencionadas, en el presente estudio no se encontró asociación significativa entre la infección persistente o eliminación del VPH y el polimorfismo -1082 A>G para ninguno de los genotipos evaluados, coincidiendo con un estudio de Torres Poveda y colaboradores en donde intentan demostrar la posible asociación de esta variación y el riesgo de CaCU sin obtener resultados estadísticamente significativos para este polimorfismo. (9)

Polimorfismo -509 TGF- β 1 y su asociación con persistencia y eliminación del VPH.

El polimorfismo -509 se define como una transición de C>T localizado el promotor de este gen asociándose a un aumento en los niveles plasmáticos de su proteína codificada, la cual pertenece a la súper familia del factor de crecimiento transformante beta 1 que tiene una función bifásica, generando tanto supresión tumoral como actividad prooncogénica en cánceres humanos. Estudios previos demuestra que la sobreexpresión de este gen por la presencia de estas variaciones media la angiogénesis, la proliferación celular y la migración.(75,76)

En este estudio se demostró que las pacientes con el polimorfismo -509 C>T presentaban protección contra la eliminación del VPH, obteniendo para el genotipo heterocigoto C>T un OR de 0.18 (IC 95% 0.037-0.889 $p<0.035$), el genotipo homocigoto T>T un OR de 0.15 (IC 95% 0.027-0.807 $p<0.027$) al evaluar el modelo codominante. Mientras que en la evaluación del modelo dominante, los genotipos C>T y T>T mostraron un OR de 0.17 (IC 95% 0.036-0.811 $P<0.026$). Es decir aquellos pacientes portadores del alelo T de riesgo en alguno de los modelos mencionados presentaban menor probabilidad de eliminación viral y el hecho de ser portador de dos copias de este alelo modifica en igual probabilidad la eliminación.

La función de este polimorfismo también ha sido estudiada en otros estados patológicos como CaCU. En 2009 Singh H. y colaboradores publicaron un estudio evaluando el papel del polimorfismo del promotor -509 C>T TGF- β 1 en la susceptibilidad al CaCU obteniendo que el genotipo TT de este polimorfismo se asoció con mayor riesgo de cáncer en estadio II mostrando un OR de 3.13 (IC 95% 0.87-11.14 $p<0.07$) y se menciona que los pacientes con este mismo genotipo con el uso de tabaco tenían un mayor riesgo de CaCU.(77)

Polimorfismo -308 TNF- α y su asociación con persistencia y eliminación del VPH.

El polimorfismo -308 se reporta como una sustitución de G>A ubicado en la región promotora del gen TNF- α el cual puede afectar la actividad transcripcional de TNF- α en varios tumores. Este polimorfismo presenta los genotipos GG, GA y AA los cuales han sido ampliamente estudiados en estados de cáncer. Investigaciones recientes demuestran que los genotipos GA/AA pueden promover la expresión inespecífica del TNF- α en varios tipos de tumores para afectar su efecto antitumoral, la susceptibilidad del individuo al cáncer y el pronóstico de los pacientes. En condiciones fisiológicas TNF- α posee funciones antitumorales, antivirales y mejora del sistema inmune; no obstante, existe evidencia de que TNF- α se encuentra altamente expresada en tumores regulando la proliferación, invasión y metástasis por medio de la angiogénesis tumoral. (78–80)

Hasta ahora los estudios que asocian este polimorfismo con infección por VPH o CaCU no son muy claros. En Marzo del 2018 Liping Li y colaboradores publican un estudio que tuvo como objetivo investigar la correlación entre el polimorfismo -308 G>A del gen TNF- α y la susceptibilidad al CaCU en el cual se recolectó sangre de 142 pacientes con esta neoplasia y 150 controles sanos. Dentro de sus resultados se puede observar que no se encontró diferencia significativa en el genotipo y la frecuencia de los alelos entre el grupo de CaCU y el grupo de control; sin embargo, realizaron una correlación entre el polimorfismo -308 G>A y los datos clinicopatológicos de las pacientes con CaCU encontrando que la frecuencia del genotipo GA/AA es significativamente mayor en la etapa III y IV que en la etapa I y II ($P < 0.05$), de igual forma demuestran que la frecuencia de genotipo GA + AA fue significativamente mayor en el grupo de metástasis ganglionares que en el grupo de metástasis en ganglios linfáticos ($P < 0.05$). (81)

En otro estudio publicado en 2016 Torres Poveda y colaboradores estudiaron la asociación de este polimorfismo en mujeres VPH 16 y el riesgo de CaCU sin encontrar asociación significativa. (9)

En el presente estudio si se observó asociación significativa entre el polimorfismo -308 G>A de la región promotora del gen TNF- α para infección persistente por el VPH, observando en el análisis por alelos que el alelo de riesgo A presentó un OR de 3.96 (IC 95%, 1.079-14.581 $p<0.038$) es decir, las pacientes con el alelo de riesgo A tienen mayor riesgo de presentar infección persistente causada por el VPH.

Polimorfismo -1615 IFN- γ y su asociación con persistencia y eliminación del VPH.

El polimorfismo -1615 se ha demostrado como un cambio de C>T localizado en la región promotora del gen IFN- γ , el resultado de esta variación genera un aumento en las concentraciones de su proteína codificada la cual ha sido asociada con el riesgo de diferentes patologías como leucemias linfocíticas, carcinoma hepatocelular por virus de hepatitis B, lupus eritematoso sistémico y cáncer de mamá. (82–84)

En 2010 Kwangwoo Kim y colaboradores publicaron que el polimorfismo -1615 C>T del gen interferón gamma se asocia a lupus eritematoso sistémico demostrando un OR ajustado de 2.27 y $p<0.0024$. Por otra parte en 2016 se publica un artículo que evidencia que el SNP -1615 C> T de IFNG se asocia con un menor riesgo de CaCU obteniendo un OR de 0.22 (IC 95% 0.135-0.385 $p<0.0001$) para los genotipos C/T + T/T analizados bajo el modelo dominante.(85)

Sin embargo, no existe evidencia científica previa que relacione el polimorfismo -1615 C>T en la región promotora del gen IFN- γ con el riesgo de infección persistente y/o eliminación de VPH. En este estudio se buscó evaluar esta asociación y se encontró en el análisis por alelos mayor riesgo de persistencia de infección por VPH en las pacientes portadoras del alelo T de riesgo con un OR de 2.98 (IC 95%, 1.094-8.146 $p<0.033$) es decir, las pacientes que son portadoras de una copia del alelo T de riesgo tendrían un aumento en la transcripción de INF- γ ,

lo que favorece concentraciones más altas en plasma, posiblemente en etapas más agudas de una infección persistente.

CONCLUSIONES

Prevalencia del VPH en el estudio.

Para el presente estudio se observó mayor prevalencia global de mujeres VPH positivas en el estudio basal de la cohorte (76.02%) en comparación con las mujeres VPH negativas (23.98%). El grupo de VPH de alto riesgo fue el más prevalentes para este estudio (65.91%).

Persistencia y eliminación del VPH

La prevalencia global para la persistencia del VPH fue del 18.65% mientras que los casos no persistentes fueron el 81.36%. Los tipos virales con mayor prevalencia fueron el 58, seguido del 16 y 31. La eliminación de VPH global tuvo una prevalencia del 72.03%. Los tipos virales con mayor eliminación en este caso fueron el 53, 58 y 31.

Asociación de los niveles de expresión del ARNm de citocinas en cérvix en persistencia y eliminación del VPH

Para este estudio se encontró asociación estadísticamente significativa de los niveles de expresión del ARNm de IL-6 en cérvix para eliminación del VPH con un coeficiente β del 1.16 (IC 95% 0.149-2.183 $p < 0.025$), es decir; las mujeres que presentaron eliminación del VPH tienen 1.16 URE veces más que las que no eliminaron VPH.

Asociación de polimorfismos de los genes de citocinas en casos de persistencia y eliminación del VPH.

En el presente estudio se observó que ser portador del polimorfismo -573G>C (IL-6), -380G>A (TNF- α) o 1615C>T (IFN- γ) es un factor de riesgo para persistencia de infección por el VPH, mientras que ser portador del polimorfismo -590 C>T (IL-4) confiere protección contra persistencia de infección de VPH. Las pacientes portadoras del polimorfismo -509C>T (TGF- β 1) mostraron protección contra la eliminación del VPH y los polimorfismos -592C>A, -819C>T y -1082A>G (IL-10) no mostraron significancia estadística para persistencia o eliminación de VPH.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las limitaciones que se contemplaron para este proyecto de investigación fueron las propias de un estudio de cohorte, como las que se muestran a continuación:

Las pérdidas de seguimiento de las pacientes se presentaron en el desarrollo de este proyecto ya que algunas de ellas abandonaron el estudio motivadas por falta de interés o cambio de domicilio; así mismo, puede existir pérdida en el seguimiento por muerte de las pacientes relacionada con otra causa al evento de interés lo cual repercutió en los resultados obtenidos en el presente estudio.

La segunda limitación que se contempló, fue la presencia de sesgos de información ya que durante la entrevista, realizada por el personal encargado de esta etapa, las pacientes no recordaban adecuadamente la información preguntada y necesaria para el estudio.

Sumado a esto es importante reconocer que los resultados obtenidos en el presente estudio son del primer año de seguimiento por lo que hasta este momento su papel en persistencia o eliminación del VPH está limitado a lo observado en este periodo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

El proyecto de cohorte donde está inserto este proyecto de tesis contó con la aprobación de:

1. Comité de Investigación CI- 342 -2016. No. de Proyecto 1287, (Anexo 3).
2. Comité de Ética en Investigación, CI: 1287, (Anexo 4).
3. Comité de Bioseguridad CI: 1287 CB: 1278, (Anexo 5).
4. Carta responsiva de los sitios de muestreo de Manejo de RPBI según la NOM-087-SEMARNAT-SSA-2002.

Debido a que en este estudio se procesaron muestras de tejido humano (sangre y cérvix), se cumplió con las siguientes normas para un manejo adecuado.

1. NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el proceso de identificación y los listados de los residuos peligrosos.
2. NOM-087-ECOL-SSA1-2002, para la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos así como las especificaciones para su manejo.

RECURSOS HUMANOS, MATERIALES Y FINANCIEROS

Recursos humanos y materiales:

Este proyecto contó con la participación de personal, equipo e infraestructura del laboratorio 4PB de Inmunogenética y Cáncer, del Centro de Investigación sobre enfermedades infecciosas y el respaldo de un grupo de investigación con trayectoria en el campo de respuesta inmune en infecciones virales asociadas a cáncer.

Recursos financieros:

Para el desarrollo del presente proyecto de tesis se contó con financiamiento disponible del Fondo Sectorial en Salud de CONACyT, Proyecto 233538 CONACYT-FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE-2014.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torres-Poveda KJ, Cruz-Valdez A, Madrid-Marina V. Epidemiología del cáncer cervicouterino. *Gac Mex Oncol*. 2014;13(4):4–17.
2. Ochoa Carrillo FJ, Guarneros de Regil DB, Velasco Jiménez MT. Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gac Mex Oncol* [Internet]. 2015;14(3):157–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665920115000607>
3. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, Monk BJ, Stanley MA, Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. 2016;
4. Torres-Poveda K. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clin Oncol* [Internet]. 2014;5(4):753. Available from: <http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v5/i4/753.htm>
5. Manzo-Merino J., Jiménez-Lima R. C-GA. Biología molecular del cáncer cervicouterino. *Gac Mex Oncol*. 2014;13(4):18–24.
6. Shi N, Lu Q, Zhang J, Li L, Zhang J, Zhang F, et al. Analysis of risk factors for persistent infection of asymptomatic women with high-risk human papilloma virus. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2017;5515(April):0–0. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2016.1239669>
7. Barrera-Rodríguez R. L. Maldonado Noriega VMM. Mecanismos Moleculares de la respuesta Inmunitaria. 2011;2:211–37.
8. Molano M. Guerra entre el sistema inmune y la infección por el VPH. *Rev Colomb Cancerol*. 2009;2:67–8.
9. Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Bahena-Román M, Méndez-Martínez R, Zurita-Díaz MA, López-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* [Internet]. 2016;16(1):330. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2364-4>
10. Grimm C, Watrowski R, Baumühlner K, Natter C, Tong D, Wolf A, et al.

- Genetic variations of interleukin-1 and -6 genes and risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2011;121(3):537–41.
11. Shi TY, Zhu ML, He J, Wang MY, Li QX, Zhou XY, et al. Polymorphisms of the Interleukin 6 gene contribute to cervical cancer susceptibility in Eastern Chinese women. *Hum Genet*. 2013;132(3):301–12.
 12. Ding Q, Shi Y, Fan B, Fan Z, Ding L, Li F, et al. The Interleukin-10 Promoter Polymorphism rs1800872 (-592C>A), Contributes to Cancer Susceptibility: Meta-Analysis of 16 785 Cases and 19 713 Controls. *PLoS One*. 2013;8(2).
 13. Barbisan G, Pérez LO, Contreras A, Golijow CD. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. *Tumor Biol*. 2012;33(5):1549–56.
 14. Yu Z, Liu Q, Huang C, Wu M, Li G. The Interleukin 10 -819C/T Polymorphism and Cancer Risk: A HuGE Review and Meta-Analysis of 73 Studies Including 15,942 Cases and 22,336 Controls. *Omi A J Integr Biol* [Internet]. 2013;17(4):200–14. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/omi.2012.0089>
 15. Wang J, Ding Q, Shi Y, Cao Q, Qin C, Zhu J, et al. The interleukin-10-1082 promoter polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. *Mutagenesis*. 2012;27(3):305–12.
 16. Shah R, Hurley CK, Posch PE. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF- β 1 expression due to the common SNP - 509C-T (c. -1347C > T). *Hum Genet*. 2006;120(4):461–9.
 17. Galván M-, Barragán M-, Meléndez R. Factores De Riesgo Asociados a Lesiones Intraepiteliales Escamosas De Alto Grado. Risk Factors Associated With Squamous Intraepithelial. *Rev Salud Quintana Roo*. 2013;24(225):6–10.
 18. Dickson EL, Vogel RI, Geller MA, Downs LS. Cervical cytology and multiple type HPV infection: A study of 8182 women ages 31-65. *Gynecol Oncol*. 2014;133(3):405–8.
 19. Olga L. Rincón, Luis René Pareja, Sergio Jaramillo BHA. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO , UNA RELACIÓN COMPLEJA Human papillomavirus

- , immune response and cervical cancer: a complex relationship. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2007;58(3):202–12.
20. Mitchell SM, Sekikubo M, Biryabarema C, Byamugisha JJK, Steinberg M, Jeronimo J, et al. Factors associated with high-risk HPV positivity in a low-resource setting in sub-Saharan Africa. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2014;210(1):81.e1-81.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2013.08.038>
 21. Song JS, Kim EJ, Choi J, Gong G, Sung CO. Significance of HPV-58 Infection in Women Who Are HPV-Positive , Cytology-Negative and Living in a Country with a High Prevalence of HPV-58 Infection. 2013;8(3).
 22. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis - Role of Partiy, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):20–8.
 23. Mark E. Scott^{1,*}, Yurii B. Shvetsov^{2,*}, Pamela J. Thompson², Brenda Y. Hernandez², Xuemei Zhu², Lynne R. Wilkens², Jeffrey Killeen², Dien D. Vo^{1,†}, Anna-Barbara Moscicki^{1,*} and MTG. Cervical Cytokines and Clearance of Incident Human Papillomavirus Infection: Hawaii HPV Cohort Study Mark. *Int J Cancer*. 2014;133(5):1187–96.
 24. Alcocer-González JM¹, Berumen J, Taméz-Guerra R, Bermúdez-Morales V, Peralta-Zaragoza O, Hernández-Pando R, Moreno J, Gariglio P M-M V. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol*. 2006;3(19):481–91.
 25. Zamorano J, Rivas MD. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Immunologia*. 2003;22:215–24.
 26. Jamie J.A. McLeod, B.N. Baker and JJR. Mast Cell Production and Response to IL-4 and IL-13. 2016;75(1):57–61.
 27. Daniilidis A¹, Koutsos J, Oikonomou Z, Nasioutziki M, Hatziparadisi K TT. Cytokines of Cervical Mucosa and Human Papilloma Virus Infection of the Cervix: A Descriptive Study. Karger AG, Basel. 2016;60(1):58–64.
 28. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014;6(10):a016295–

a016295. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25190079>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4176007>
<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a016295>

29. Ataie-Kachoie P1, Pourgholami MH1, Richardson DR2 MD. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *BMJ*. 2014;11(67):932–7.
30. Hunter CA JS. IL-6 como una citoquina clave en salud y enfermedad. *Nat Immuno*. 2015;5(16):448–57.
31. Taniguchi K1 KM. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol*. 2014;1(26):54–74.
32. Malejczyk J1, Malejczyk M, Urbanski A, Köck A, Jablonska S, Orth G LT. Constitutive release of IL6 by human papillomavirus type 16 (HPV16)-harboring keratinocytes: a mechanism augmenting the NK-cell-mediated lysis of HPV-bearing neoplastic cells. *El sevier*. 1991;1(136):155–64.
33. Saavedra Ramírez PG, Vásquez Duque GM, González Naranjo LA. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*. 2011;24(2):157–66.
34. Gabryšová L1, Howes A, Saraiva M OA. The regulation of IL-10 expression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:90–157.
35. WANG Y, LIU X-H, LI Y-H, LI O. The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer. *Biomed Reports [Internet]*. 2013;1(3):347–51. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/>
36. Berti FCB1, Pereira APL2, Cebinelli GCM3, Trugilo KP4 B de OK. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *El sevier*. 2017;34:1–13.
37. Mannino MH1, Zhu Z1, Xiao H2, Bai Q1, Wakefield MR1 FY. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *El sevier*. 2015;367(2):103–7.
38. Arany I1, Grattendick KG TS. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR). *El sevier*. 2002;2(55):331–9.

39. Syrjänen SSNSDR-ML-FTBESH. Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. *Virchows Arch.* 2009;455(6):505–515.
40. Bermudez-Morales VH1, Gutierrez LX, Alcocer-Gonzalez JM, Burguete A M M V. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest.* 2008;26(10):1037–43.
41. Papageorgis P, Stylianopoulos T. Role of TGF β in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review). *Int J Oncol.* 2015;46(3):933–43.
42. Chen J, Mishra L. Targeting TGF- β signaling in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17(7):743–60.
43. Hazelbag S1, Kenter GG, Gorter A FG. Prognostic relevance of TGF-beta1 and PAI-1 in cervical cancer. *Int J Cancer.* 2004;112(6):1020–8.
44. Shier MK1, Neely EB, Ward MG, Meyers C HM. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) down-regulates expression and function of proliferation-inducing molecules in HPV-transformed cells. *Anticancer Res.* 1999;19(6B):4977–82.
45. F1. B. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):409–16.
46. Ali KS1, Ali HY JJ. Concentration levels of IL-10 and TNF α cytokines in patients with human papilloma virus (HPV) DNA⁺ and DNA⁻ cervical lesions. *J Immunotoxicol.* 2012;9(2):168–72.
47. Hu T, Yang P, Zhu H, Chen X, Xie X, Yang M, et al. Accumulation of invariant NKT cells with increased IFN- γ production in persistent high-risk HPV-infected high-grade cervical intraepithelial neoplasia. ??? [Internet]. 2015;1–10. Available from: ???
48. DeCarlo CA1, Severini A, Edler L, Escott NG, Lambert PF, Ulanova M ZI. IFN- κ , a novel type I IFN, is undetectable in HPV-positive human cervical keratinocytes. *Lab Invest.* 2010;90(10):1482–91.

49. Ramanathan P1, Dhandapani H1, Jayakumar H1, Ganeshrajah S2 TR. Dendritic cells primed with HPV positive cervical tumor lysate are superior to unprimed DCs in migratory capacity and induce a potent Th1 response. *El sevier*. 2014;75(12):1216–24.
50. Wang T, Tian L, Gao M, Song H, Wei Y, Xue Y. Interleukin (IL) -4 -590C > T polymorphism is not associated with the susceptibility of gastric cancer : An updated meta-analysis. *Ann Med Surg [Internet]*. 2016;9:1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amsu.2016.05.011>
51. Kyung H, Kang S, Yong H, Gill K, Valan M, Ock Y. Promoter polymorphism (À 590 , T / C) of interleukin 4 (IL4) gene is associated with rheumatoid arthritis : An updated meta-analysis. *Saudi J Biol Sci [Internet]*. 2017;24(2):444–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.013>
52. Li ZP 1 , Yin LL , Wang H LL. Association between promoter polymorphisms of interleukin-4 gene and allergic rhinitis risk: a meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 34(3):306–13.
53. Mansour AI1, Behairy OG2, Abd Almonaem ER3, Abd-Rabuh RM4 AI. Association of interleukin (IL)-4 variable number of tandem repeats (VNTRs) and IL-4-590 promoter polymorphisms with susceptibility to pediatric autoimmune hepatitis type 1. *Cytokine*. 43(18):30009–7.
54. Assari R 1, 2 , Aghighi Y 3 , Ziaee V 1, 2 , Sadr M 4 , Rezaei A 5 , Rahmani F 5, 6 , Sadr Z 4 , Raeeskarami SR 7 , Moradinejad MH 2 , Rezaei N 5, 6 8 . Interleukin-4 cytokine single nucleotide polymorphisms in kawasaki disease: a case-control study and a review of knowledge. *Int J Rheum Dis*. 21(1):266–70.
55. Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. 2010;16(10):1188–200.
56. Lin J, Lee L, Liu H, Chen Y, Chiou T. Association of IL-6 C-572G Gene Polymorphism with Anti-E Production. 2018;48–52.
57. Shi W, Liu H, Wu D, Tang Z, Shen Y, Guo L. Stratification Analysis and Case-control Study of Relationships between Interleukin-6 Gene

- Polymorphisms and Cervical Cancer Risk in a Chinese Population. 2014;15:7357–62.
58. Wang HY¹, Zhang JJ¹, Zheng XY¹, Liu JH² LY. Association between IL-6 Gene (-174 & -572 G/C) Polymorphisms and Endometrial Adenocarcinoma Risk. *Pathol Oncol Res.* 22(4):825–9.
 59. Zhang Z¹, Chen Z², Chen D³, Lin Y⁴, Jiang Y² WQ. [Association between IL-6-572 C/G polymorphism and breast cancer susceptibility]. *Zhi, Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za.* 32(12):1667–1670.
 60. Saxena R¹, Chawla YK, Verma I KJ. IL-6(-572/-597) polymorphism and expression in HBV disease chronicity in an Indian population. *Send to Am J Hum Biol.* 26(4):549–55.
 61. Pang C. Association between the IL-6 gene polymorphism and tuberculosis risk : a meta-analysis. 2017;445–54.
 62. Chatzopoulos GS, Doufexi A, Kouvatsi A. Clinical response to non-surgical periodontal treatment in patients with interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms. 2017;22(4).
 63. Ke Z, Yuan L, Ma J, Zhang X, Guo Y, Xiong H. IL-10 Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility : An Updated Meta-Analysis. 2015;56(5):1274–87.
 64. Ni J¹, Ye Y, Teng F WQ. Interleukin 10 polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 23(1):126–33.
 65. Karimabad MN¹, Arababadi MK, Hakimzadeh E, Daredori HY, Nazari M, Hassanshahi G KD. Is the IL-10 promoter polymorphism at position -592 associated with immune system-related diseases? *Inflammation.* 2013;36(1):35–41.
 66. Steinke JW, Barekzi E, Hagman J, Borish L. Functional Analysis of – 571 IL-10 Promoter Polymorphism Reveals a Repressor Element Controlled by Sp1. 2018;
 67. Liu P, Song J, Su H, Li L, Lu N, Yang R, et al. IL-10 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus : A Meta-Analysis. 2013;8(7):1–11.

68. Guo C, Wen L, Song J, Zeng W, Dan C. Significant association between interleukin-10 gene polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. 2018;9(15):12365–75.
69. Wu MS¹, Wu CY, Chen CJ, Lin MT, Shun CT LJ. Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *Int J Cancer*. 2003;104(1):617–23.
70. Jung JH, Song GG, Kim J, Choi SJ. Association of Interleukin 10 Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease: Meta-Analysis. 2016;272–7.
71. Caroline A, Moura EL De, Ferreira JM, Wendell A, Moura A De, Darlan A, et al. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine protection and susceptibility to dengue in Brazilian population. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2017;10(11):1065–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.009>
72. Liu SS, Chan KYK, Leung RCY, Chan KKL, Tam KF, Luk MHM, et al. Prevalence and risk factors of human papillomavirus (hvp) infection in southern chinese women - a population-based study. *PLoS One*. 2011;6(5):1–7.
73. Madeshiya AK, Singh S, Dwivedi S, Konwar R. Association of IL-10 gene (- 1082A > G , - 819C > T and - 592C > A) polymorphism and its serum level with metabolic syndrome of north. 2017;96(1).
74. GangLi. Relationship between IL-10 gene polymorphisms and the risk of non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis. *El sevier*. 2016;77(5):418–25.
75. Ramos-Flores C, Romero-Gutiérrez T, Delgado-Enciso I, Maldonado GE, Plascencia VM, Vazquez-Vuelvas OF et al. Polymorphisms in the genes related to angiogenesis are associated with uterine cervical cancer. *Cancer, Int J Gynecol*. 2013;23(7):1198–204.
76. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Peng CT, Yeh LS LC. Polymorphism for transforming growth factor beta 1-509 (TGF-B1-509): association with endometriosis. *Biochem Genet*. 43(5):203–10.
77. Singh H, Jain M MB. Role of TGF-beta1 (-509C>T) promoter polymorphism

- in susceptibility to cervical cancer. *Oncol Res.* 2009;18(1):41–5.
78. Roszak A, Misztal M, Sowińska A JP. TNF- α -308 G/A as a risk marker of cervical cancer progression in the Polish population. *Mol Diagn Ther.* 2015;19(1):53–7.
 79. Liu L, Yang X, Chen X, Kan T, Shen Y, Chen Z et al. Association between TNF- α polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. 2012;39: *Mol Biol Rep.* 2012;39:2683–8.
 80. Sehoulí EJ, Lichtenegger W, Society NG, Rotar IC, Mureşan D, Radu P, et al. CURRENT ASPECTS AND FUTURE DIRECTION Selected Articles Presented at the International Charité - Mayo Conference TNF- α 308 G / A Polymorphism and Cervical. 2014;416(April 2013).
 81. Li L, Liu JIE, Liu C, Lu X. The correlation between TNF- α -308 gene polymorphism and susceptibility to cervical cancer. 2018;7163–7.
 82. Li CJ, Dai Y, Fu YJ, Tian JM, Li JL, Lu HJ et al. Correlations of IFN- γ genetic polymorphisms with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(7):6867–77.
 83. Kim K, Cho SK, Sestak A, Namjou B, Kang C BS. Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 69(6):1247–50.
 84. Kim HJ, Chung JH, Shin HP, Jeon JW, Park JJ, Cha JM, Joo KR LJ. Polymorphisms of interferon gamma gene and risk of hepatocellular carcinoma in korean patients with chronic hepatitis B viral infection. *Hepatogastroenterology.* 2013;60(125):1117–20.
 85. Kwangwoo Kim¹, Soo-Kyung Cho², Andrea Sestak³, Bahram Namjou³, Changwon Kang¹ S-CB. Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Res Basic Transl.* 2018;69(6).

ANEXO 1



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 cervicouterino y cada año se reportan más de 11,000 nuevos casos; lo cual sugiere que esta enfermedad sigue siendo un grave problema de salud pública. El Instituto Nacional de Salud Pública realizará un estudio titulado "Las citocinas inmunosupresoras Th2 y Th3 como predictores de persistencia viral y progresión a lesión pre-maligna en cérvix en mujeres infectadas con VPH-AR: estudio de cohorte", con el fin de evaluar marcadores inmunológicos asociados a persistencia y eliminación de infección por el VPH.

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 de infección por el VPH, 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 (un tubo de 7 ml = una cucharadita) por el profesional especializado encargado, con la que nos permitirá extraer el suero para medir el nivel de proteína de IL-10, IL-4, TGFβ1, IFNγ, IL-6, IL-2, TNFα 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 y ARN de linfocitos de sangre periférica, 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, IL-4, TGF β 1, IFN γ , IL-6, IL-2, TNF α , y expresión de E6 y E7 del VPH y carga viral en cérvix. Adicionalmente el ginecólogo le tomará muestra del canal endocervical para realizar un frotis o extendido en lámina para la citología o Papanicolaou y le hará una colposcopia adicionándole ácido acético para detectar tempranamente cualquier tipo de lesión en el cérvix que tenga que ser tratada, además tomará muestra de exudado del cérvix en viales de ThinPrep (Pap test) para la tipificación de VPH. El diagnóstico colposcópico lo realizará el ginecólogo colposcopista al momento de la consulta, la citología será enviada para su análisis patológico.

RIESGOS Y MOLESTIAS POTENCIALES:

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

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

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

BENEFICIOS POTENCIALES:

Los resultados de este estudio permitirán conocer si usted tiene una infección por el Virus del Papiloma Humano o algún tipo de lesión del cuello uterino que requiera de tratamiento oportuno.

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

PARTICIPACIÓN:

Su participación es VOLUNTARIA y por lo tanto, puede dejar de contestar alguna pregunta, suspender la entrevista o retirarse del estudio en cualquier momento. Las muestras de sangre y de exudado de cérvix que usted está donando serán procesadas para obtener ADN, ARN y suero y ADN y ARN, respectivamente. 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 investigación 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 Dra. Kirvis J Torres Poveda, 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 Dra Karina Delgado Romero, Ginecóloga colposcopista del 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. Angélica Ángeles LLerenas, 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 y de cérvix sea procesada y guardada en un banco de muestras en el Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la responsabilidad del Investigador Responsable del proyecto, la Dra. Kirvis J Torres Poveda y sea utilizada en otros proyectos de investigación diferentes a este.

- Sí acepto
 No acepto



ANEXO 2



Cuestionario

Estudio "Las citocinas inmunosupresoras Th2 y Th3 como predictores de persistencia viral y progresión a lesión pre-maligna en cérvix en mujeres infectadas con VPH-AR: estudio de cohorte"

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

ANTECEDENTES CANCER: Si No

TIPO DE CANCER: _____

NIVEL DE CONSANGUINIDAD: _____

ANTECEDENTES OBESIDAD: Si No

ANTECEDENTES CARDIOVASCULARES: Si No

ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES PARASITARIAS: Si No

ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES REUMÁTICAS O AUTOINMUNES: Si No

ANTECEDENTES ITS: 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: _____

No. GESTACIONES: _____

EDAD PRIMER PARTO: _____

MÉTODO PLANIF FLIAR: _____

IMC: _____

FECHA ÚLTIMA CITOLOGÍA: _____

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:

OCUPACION PAREJA: _____

EDAD PAREJA: _____

ESTADO DE SALUD PAREJA: _____

RESULTADO PCR HPV PROYECTO: _____

FECHA ENTREGA DE RESULTADO Y REGISTRO EN SISTEMA DE INFORMACIÓN

NOMBRE DE ENTREVISTADOR: _____

ANEXO 3



Instituto Nacional
de Salud Pública

Comisión de Investigación

2014, AÑO DE OCTAVIO PAZ

No. de Proyecto 1287

Cuernavaca, Morelos, 19 de diciembre 2014.

Dra. Kirvis Janneth Torres Poveda
Responsable de proyecto
Centro de Investigación sobre
Enfermedades Infecciosas - INSP
Presente

Por medio del presente informo a usted, que el Comité de Investigación evaluó su proyecto de investigación titulado: **Las citocinas inmunosupresoras Th2 y Th3 como predictores de persistencia viral y progresión a lesión pre-maligna en cérvix en mujeres infectadas con VPH-AR: estudio de cohorte**, el dictamen del Comité es: **Aprobado**.

Así mismo le recuerdo que a partir de 1° de septiembre del 2013, todo protocolo de investigación que desarrolle el INSP en colaboración con los Servicios de Salud de Morelos (SSM), aun estando aprobado por el comité de Ética en Investigación, la Comisión de Bioseguridad y la Comisión de Investigación, no pueden dar inicio en el estado de Morelos, hasta contar con la autorización correspondiente de los SSM. Trámite que realizará la Comisión de Investigación.

Para llevar a cabo este trámite, agradezco a usted nos envíe un párrafo que contenga lo siguiente:

- Título
- Objetivo Principal
- Justificación
- Alcance del Proyecto
- Metodología
- Resumen del proyecto
- beneficios para los SSM derivados de la investigación
- listado de apoyo requerido por los mismos.
- Especificar cuándo está planeado que inicie el estudio

Aterramente

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

Ccp. Dr. Mauricio Hernández Ávila.- Director General del INSP.- Presente
Dra. Ceila Mercedes Alpuche Aranda.- Directora General Adjunta del CISEI.- Presente
Mra. Elizabeth Obdulia Robles Carvajal.- Subdirector de Proyectos UCP.- Presente.
C.P. Gabriel Guillermo Medina Ramirez.- Ejecutivo de Proyectos UCP.- Presente.

Avenida Universidad 655
Cerrada Los Pinos y Caminera
Colonia Santa María Ahuacatlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
teléfono: (777) 329 3000

www.insp.mx

ANEXO 4



Instituto Nacional
de Salud Pública

Generación de conocimiento
para el desarrollo de políticas de salud



CEI Comité de Ética
en Investigación
Instituto Nacional de Salud Pública

Cuernavaca, Mor., 15 de diciembre, 2014

CI: 1287, No. 1602

Kirvis Janneth Torres Poveda
Investigadora Principal
Presente.

En relación a su proyecto titulado " *Las citocinas inmunosupresoras Th2 y Th3 como predictores de persistencia viral y progresión a lesión pre-maligna en cérvix en mujeres infectadas con VPH-AR: estudio de cohorte* " 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 14 de diciembre 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 vencimiento. Favor de solicitar vía electrónica el formato correspondiente a este Comité. ***Nota: Es responsabilidad de usted como Investigador/a Responsable de este proyecto solicitar la renovación anual de su estudio con suficiente anticipación.***

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.

El número de su proyecto es **1287** y el de esta aprobación es **1602**. Le pedimos hacer referencia a estos números para cualquier correspondencia futura.

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

Atentamente

Angélica Ángeles Llerenas
Presidente

Avda. Universidad 655
Cerrada Los Pinos y Caminera
Colonia Santa María Ahuacatlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
conu: (777) 329 3000

www.insp.mx

ANEXO 5



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA COMITÉ DE BIOSEGURIDAD



CBI4-346.

Cuernavaca, Mor., a 10 de diciembre del 2014.

CI:1287 CB: 1278

Kirvis Janneth Torres Poveda
Responsable de Proyecto
CISEI-INSP
Presente

Por medio del presente informo a usted que el dictamen del Comité de Bioseguridad al proyecto de investigación titulado: "Las citocinas inmunosupresoras Th2 y Th3 como predictores de persistencia viral y progresión a lesión pre-maligna en cérvix en mujeres infectadas con VPH-AR: estudio de cohorte", es: APROBADO debido a que dicho proyecto establece todas las medidas de uso y manejo de residuos biológico infecciosos (RPBI) y CRETII; por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

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

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

Atentamente,



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

ANEXO 6



Generación de conocimiento
para el desarrollo de políticas de salud



Registro ante CONDOÉTICA: 17CEI00420160758
Registro ante COFEPRIS: 13 CEI 17 067 36
FINA: 00015605

Cuernavaca, Mor., 4 de agosto, 2017
Protocolo CI: 900

Jocson Alejandro Flores Polanco
Maestría en Ciencias en Enfermedades Infecciosas
Presente

Por medio del presente me permito informar a usted que el dictamen del Comité de Ética en Investigación a su proyecto titulado **"ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN REGULADORA DE LOS GENES DE CITOCINAS Th2 y Th3 CON INFECCIÓN PERSISTENTE POR EL VPH EN MUJERES MEXICANAS"** fue:

Aprobado

Lo anterior debido a que su estudio se encuentra anidado dentro del proyecto titulado: **"Las citocinas inmunosupresoras Th2 y Th3 como predictores de persistencia viral y progresión a lesión pre-maligna en cérvix en mujeres infectadas con VPH-AR: estudio de cohorte"**, registrado a nombre de la Dra. Kirvis Jenneth Torres Poveda y en el cual se analizarán muestras biológicas del banco construido a partir de la cohorte de dicho estudio.

Addenda/Modificaciones: Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de su protocolo de tesis deberá ser enviado a este Comité previo a su implementación.

Atentamente

Dra. Angélica Ángeles Llerenas
Presidente

ccp- Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán - Coordinador Maestría en Enfermedades Infecciosas
Mtro. Miguel Ángel Reyes - Depto. Coordinación de becas ante CONACYT

Avda. Universidad 433
Ciudad de México y Cuernavaca
Colonia Santa María Ahuacatlán
62050 Cuernavaca, México, D.F.
Teléfono (777) 321 9833

www.insp.mx

ANEXO 7



COMITÉ DE BIOSEGURIDAD



CB17-033

Cuernavaca, Mor., 30 enero 2018.

TM: 782

Jocsan Alejandro Flores Polanco
Maestría en Ciencias en Enfermedades Infecciosas
ESPM-INSP
Presente

En relación a su proyecto titulado: **"ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN REGULADORA DE LOS GENES DE CITOCINAS Th2 y Th3 CON INFECCIÓN PERSISTENTE POR EL VPH EN MUJERES MEXICANAS"** se le informa que el Comité de Bioseguridad emite un dictamen como: **Aprobado**, en virtud de que cumple con los requerimientos del Comité de Bioseguridad.

Le recordamos que si tiene alguna duda con respecto al manejo de CRIT y RPBI puede consultar el Manual de procedimientos para el manejo de sustancias CRIT y RPBI del INSP (<https://www.insp.mx/comite-bioseguridad/manual-bioseguridad.html>).

Así mismo tenga presente que debe mantener vigente su acreditación del curso de bioseguridad, en caso de no contar con el curso o su vigencia esté vencida o próxima a vencer, puede actualizar en el sitio <https://about.citiprogram.org/en/course/basic-introduction-to-biosafety/>.

Atentamente,

Dra. Antonia Herrera Ortiz
Presidente del Comité
de Bioseguridad-INSP

Presidencia e-mail: aherrera@insp.mx
Secretaría Técnica: secretaria@insp.mx

Avenida Universidad 655
Carretera Luis Prieto y Carretera
Colonia Santa María Ahuacatitlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
celular: (777) 329-3000

www.insp.mx

ANEXO 8



*Instituto Nacional
de Salud Pública*

Comité de Investigación

Registro ante COFEPRIS: 15 CI 17 007 031.

CI-108-2018

Proyecto de Tesis No. 898

Cuernavaca, Mor., a 30 de enero de 2018.

C. Jocsan Alejandro Flores Polanco
Maestría en Ciencias
Área de Concentración en
Enfermedades Infecciosas
Presente

Por medio del presente informo a usted, que el Comité de Investigación evaluó su proyecto de tesis titulado: "**Asociación de los polimorfismos de la región reguladora de los genes de Citocinas Th2 y Th3 con infección persistente por el VPH en mujeres mexicanas**"; el dictamen de este Comité es: **Aprobado**.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce
Presidente del Comité
de Investigación-INSP

c.c.p. Mtra. Lorena Castillo Castillo.- Jefe del Departamento de Asuntos Escolares INSP.- Presente