



**Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Médicas**

**Análisis de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en  
genes asociados a la infección por el virus del Papiloma  
Humano (VPH) y la progresión neoplásica: un modelo  
poligénico de susceptibilidad al  
cáncer cervical**

**Lic. Gisela Barbisan**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias de la Salud

Director: Dr. Carlos Daniel Golijow

Co-Director: Dr. Enrique Quiroga

Instituto de Genética Veterinaria “Ingeniero Fernando Noel Dulout” (IGEVET)-CONICET

Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de La Plata.

La Plata, Buenos Aires, Argentina



- 2014 -





---

*A mí mamá Mónica y  
mí papá Sergio.*

---

## Agradecimientos

*Me gustaría expresar mi gratitud a las personas que me han brindado apoyo y colaboración a lo largo de la realización de este trabajo:*

*A la directora del IGEVET, Dra. Pilar Peral García, por haberme dado la oportunidad de ingresar en el instituto, de desarrollar esta tesis y por haberme impulsado a finalizarla.*

*A mi director, Dr. Carlos Golijow, por haberme recibido en su grupo de trabajo, haberme guiado y compartido sus valiosos conocimientos y experiencia en el desarrollo de esta tesis. Gracias por la confianza y las oportunidades brindadas.*

*Mi especial agradecimiento a mi compañero de trabajo y amigo, Orlando, por su inmensa ayuda en este recorrido, por haberme transmitido sus conocimientos y experiencia, por su actitud motivadora e inquietud ante la resolución de problemas, con lo cual siempre ha creado un ambiente estimulante para la investigación científica. Por las largas y constructivas charlas sobre la profesión y sobre la vida.*

*A mis compañeros de trabajo y grandes amigos: Anahí, Leo, Noelia, Lucía, Andrea, Mateo, Patricio, Juana, gracias por la compañía, el apoyo, por todos los momentos compartidos (congresos, cursos, reuniones, charlas, salidas etc) y por permitir que el trabajo cotidiano sea más llevadero. Gracias por la amistad que me llevo de cada uno de ustedes.*

*A la Dra. Cecilia Furnus y a la Dra. Analía Seoane, por sus valiosos, oportunos y maternos consejos.*

*Mis más sinceros agradecimientos a todos los integrantes del IGEVET, con quienes compartí los días de trabajo a lo largo de estos años, gracias por su desinteresada colaboración, su disposición y su compañía.*

*A mi mamá, mi papá y mi hermana, por estar siempre a mi lado, por sostenerme, por su amor y apoyo incondicional, que me han permitido seguir siempre adelante.*

*A Ricky, por su gran ayuda con la tesis, por acompañarme, por la paciencia, por su apoyo y por todo su amor.*

---

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. 1. Cáncer Cervical .....	2
1.1.1 El Cáncer Cervical como resultado de la interacción hospedador huésped .....	2
1.1.2 Epidemiología Descriptiva .....	3
1.1.3 Histología y Clasificación .....	6
1.2 Virus del Papiloma Humano .....	9
1.2.1 Clasificación y estructura .....	10
1.2.2 Genoma del Virus del Papiloma Humano .....	11
1.2.3 Productos génicos del Virus del Papiloma Humano .....	12
1.2.4 Proteínas claves del VPH en la carcinogénesis cervical .....	13
1.2.5 Diversidad genética del VPH .....	17
1.2.6 El ciclo biológico del VPH .....	17
1.3 Factores de riesgo .....	19
1.4 Polimorfismos de nucleótido simple, Cáncer Cervical y VPH .....	20
1.4.1 Polimorfismos de nucleótido simple y genes reguladores del ciclo celular .....	22
1.4.2 Genes supresores de tumores .....	22
1.4.2.1 El gen supresor de tumores p53 .....	23
1.4.2.1.1 Polimorfismo del codon 72 del gen <i>p53</i> .....	24
1.4.2.2 El gen <i>RNASEL</i> .....	25
1.4.2.2.1 Polimorfismo del codón 462 de <i>Rnase L</i> .....	28
1.4.3 Polimorfismos de nucleótido simple y genes efectores del sistema inmunológico .....	28

---

1.4.3.1 El gen del Factor de Necrosis Tumoral alfa .....	29
1.4.3.1.1 Polimorfismos -238G/A y -308 G/A del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> .....	30
1.4.3.2 El gen <i>Interleuquina-10</i> .....	31
1.4.3.2.1 Polimorfismo -1082 (G/A) de <i>IL-10</i> .....	31
1.4.3.3 El Gen <i>Interferon-gama</i> .....	32
1.4.3.3.1 Polimorfismo +874 T/A del gen <i>INFG</i> .....	33
1.4.4 Polimorfismos de nucleótido simple y genes de reparación del ADN .....	34
1.4.4.1 El Gen <i>XRCC1</i> .....	35
1.4.4.1.1 Polimorfismos <i>Arg194Trp</i> y <i>Arg399Gln</i> del gen <i>XRCC1</i> .....	36
1.4.5 Polimorfismos de nucleótido simple en genes asociados a la vía apoptótica .....	37
1.4.5.1 Los Genes <i>FAS</i> y <i>FASL</i> .....	38
1.4.5.1.1 Polimorfismos de los genes <i>FAS</i> (-670 A/G) y <i>FASL</i> (-844 C/T) .....	40
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
2.1 Hipótesis .....	43
2.2 Objetivos .....	44
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 Grupo de Estudio .....	46
3.2 Tipos de muestras .....	47
3.3 Extracción y Purificación del ADN .....	47
3.4 Detección del Genoma del VPH .....	47
3.5 Tipificación del Genoma del VPH .....	50
3.5.1 LIS-SSCP .....	50

---

3.5.2 PCR- Enzima Inmuno Ensayo (PCR-EIA) .....	51
3.5.2.1 Protocolo de PCR-EIA .....	51
3.6 Análisis de los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) .....	54
3.6.1 Amplificación de SNPs mediante PCR .....	55
3.6.2 Genotipificación de SNPs por Pirosecuenciación .....	58
3.6.2.1 Pirosecuenciación como herramienta para genotipificar SNPs .....	61
3.6.2.2 Protocolo de Pirosecuenciación .....	63
3.6.3 PCR-RFLP como técnica de genotipificación .....	65
3.6.3.1 Genotipificación de SNPs por PCR-RFLP .....	66
3.7 Análisis Estadístico .....	68
3.7.1 Frecuencias génicas y genotípicas .....	69
3.7.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	69
3.7.3 Prueba de Chi-cuadrado de Pearson .....	70
3.7.4 Estimación del riesgo relativo .....	71
3.7.5 Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial o MDR .....	72
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>74</b>
4.1 Virus del Papiloma Humano y su asociación con el Cáncer Cervical .....	75
4.1.1 Detección del ADN del Virus del Papiloma Humano. ....	75
4.1.1.1 Prevalencia del Papilomavirus Humano .....	76
4.2 SNPs y su relación con el Cáncer Cervical y la Infección por VPH .....	80
4.3 Interacciones Inter-alélicas entre SNPs .....	94

---

<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>98</b>
5.1 Cáncer Cervical y su relación con el Virus del Papiloma Humano .....	99
5.2 Vacuna contra el VPH .....	102
5.3 La carcinogénesis cervical como proceso multifactorial .....	103
5.4 Polimorfismos De Nucleótido Simple y su relación con el Cáncer Cervical .....	105
5.4.1 Polimorfismo Arg72Pro de P53 .....	108
5.4.2 Polimorfismo del codón 462 del gen <i>RNASEL</i> .....	109
5.4.3 Polimorfismos en el gen <i>XRCCI</i> .....	110
5.4.5 Polimorfismos en los genes <i>FAS</i> y <i>FASL</i> .....	114
5.5 Polimorfismos de Nucleótido Simple y su relación con la infección por VPH ...	115
5.6 Discrepancias entre los estudios .....	118
5.7 Interacciones génicas en la carcinogénesis cervical .....	121
5.8 Perspectivas futuras .....	124
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>126</b>
6.1 Conclusiones .....	127
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>130</b>
7.1 Bibliografía .....	131

---

## RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es el séptimo cáncer más frecuente en la población general y el segundo más común entre las mujeres de todo el mundo. Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares han establecido al Virus del Papiloma Humano (VPH) como el principal factor etiológico del cáncer cervical. Sin embargo, dada la alta prevalencia de la infección por VPH en la población general respecto de la incidencia del carcinoma cervical, se presume que la sola infección por este virus sería insuficiente para provocar la transformación neoplásica. Las diferencias genéticas del hospedador que influyan en la respuesta contra la infección viral podrían determinar un mayor riesgo de desarrollo de lesiones cervicales y progresión hacia un carcinoma invasor. De esta manera, los polimorfismos genéticos presentes en genes relacionados a la infección viral, a la respuesta inmune, a los sistemas de reparación del ADN y aquellos genes supresores de tumores, podrían influenciar y determinar un riesgo aumentado de desarrollo de la neoplasia cervical. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del componente genético en relación a la susceptibilidad de desarrollo de cáncer cervical y la infección por el Virus del Papiloma Humano.

Se analizaron un total de 512 muestras cervicales de mujeres de la ciudad de La Plata, las cuales fueron clasificadas histológicamente en: 200 muestras de mucosa cervical normal (PapI/II), 100 Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado (LGSIL), 72 Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (HGSIL) y 140 muestras correspondientes a Carcinomas Cervicales Escamosos (SCC). La presencia de ADN del VPH fue examinada mediante PCR anidada y la genotipificación del virus por PCR-SSCP y PCR-EIA. La genotipificación de los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) presentes en los genes *FASL* (-844 T/C), *IL10* (-1082 G/A), *p53* (*Arg72Pro*), *INFG* (+ 874 T/A) y *RNASEL* (*Arg462Gln*) se llevó a cabo mediante la tecnología de Pirosecuenciación,

---

mientras que el análisis de los SNPs *Arg399Gln* y *Arg194Trp* de *XRCCI*, -308 (G/A) y -238 (G/A) de *TNF- $\alpha$*  y -670 del gen *FAS* se realizó utilizando la técnica de PCR-RFLP. La prevalencia de la infección por VPH en el grupo control fue del 36,5%. El tipo viral más prevalente fue el VPH-16 (51,2%). Del total de los controles, el 29,3% correspondió a mujeres mayores a 30 años infectadas con VPH-16 y/o VPH-18. Los polimorfismos presentes en las regiones promotoras de los genes *TNF- $\alpha$*  (-308 (G/A) y -238 (G/A)), *IL-10* (-1082 (G/A)) y *FASL* (-844 (T/C)), así como el SNP + 874 (T/A) del gen *Interferon gamma*, no presentaron diferencias entre casos y controles. De manera similar, no hubo asociación entre dichos polimorfismos y la presencia del ADN del VPH. Sin embargo, se registró un incremento significativo en el riesgo de desarrollo de cáncer cervical otorgado por los genotipos homocigota AA del gen *FAS* (OR=2,25;  $p=0,035$ ), heterocigota CG del gen *p53* (OR=2,43;  $p=0,004$ ) y el genotipo TT+TC del gen *XRCCI* codon 194 (OR=2,26;  $p=0,02$ ). Por otra parte, los genotipos homocigota AA de *RNASEL* (OR=0,31;  $p=0,034$ ) y heterocigota AG de *XRCCI* codon 399 (OR=0,48;  $p=0,023$ ) otorgaron una menor susceptibilidad frente al desarrollo de la neoplasia cervical. En el caso del gen *FAS*, el genotipo homocigota AA (OR=2,53;  $p=0,035$ ) se encontró asociado con un incremento en la susceptibilidad a la infección por VPH. En cuanto a las lesiones cervicales, se observó que tanto el alelo *Gln* (A) (OR=3,03;  $p=0,001$ ) como el genotipo homocigota *Gln/Gln* (AA) (OR=5,34;  $p=0,000$ ) de *XRCCI Arg399Gln* otorgaron un incremento significativo en el riesgo de desarrollo de lesiones de bajo grado (LSIL). Por el contrario, el genotipo heterocigota *Gln/Arg* (AG) de este mismo polimorfismo estuvo asociado con una disminución en el riesgo de desarrollo de este tipo de lesiones (OR=0,25;  $p=0,009$ ). Por último, el análisis de los polimorfismos a través del algoritmo MDR reveló que existe una interacción sinérgica entre ellos, presentando el modelo de cuatro-factores (cuatro-*loci*), conformado por

---

*FASL-P53-RNASEL-XRCC1399*, una asociación significativa con la neoplasia cervical (TA=0,61; p<0,05).

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que la asociación encontrada entre los Polimorfismos de Nucleótido Simple y el carcinoma cervical apoya el rol de la susceptibilidad genética del hospedador en la etiología de esta enfermedad. En base a esto se sugiere que la utilización de estos polimorfismos podría resultar muy conveniente en la identificación de aquellos individuos que se encuentran con mayor riesgo de desarrollo de lesiones cervicales y progresión hacia un carcinoma invasor.

# ***Introducción***

## **1. 1. Cáncer Cervical**

### **1.1.1. El Cáncer Cervical como resultado de la interacción hospedador huésped**

En el contexto de la biología molecular, el cáncer comprende a ciertas enfermedades que están caracterizadas por presentar alteraciones en los mecanismos que gobiernan la proliferación, el anclaje y la migración celular. Los agentes capaces de inducir neoplasias conforman una serie variada de carcinógenos, dentro de los que se pueden encontrar desde sustancias químicas y distintas radiaciones, hasta virus oncogénicos.

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares han establecido al Virus del Papiloma Humano (VPH) como el principal factor etiológico del cáncer de cuello uterino. Sin embargo, dada la alta prevalencia de la infección por VPH en la población general respecto de la incidencia del carcinoma cervical, se presume que la sola infección por este virus sería insuficiente para provocar la transformación neoplásica. Los estudios realizados sugieren que la mayoría de las infecciones por VPH serían transitorias, siendo el virus suprimido por el sistema inmune del hospedador, llevando la carga viral a niveles no detectables. Por esta razón, la persistencia de la infección por VPH sería una condición necesaria, pero no suficiente, para que se produzca el desarrollo de las neoplasias intraepiteliales cervicales.

Entre los factores que pueden condicionar que una infección se establezca como persistente se encuentra el perfil genético individual. Magnusson y col. (2000) y Czene y col. (2002), estimaron que el valor de heredabilidad del cáncer de cuello uterino se encontraría entre el 25 y el 27%, demostrando la importancia que posee el perfil genético del hospedador en el desarrollo de este tipo de cáncer. En este sentido, hoy se sabe que la mayor parte de la variación en la secuencia del genoma humano es atribuible a la presencia de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Usualmente, estos polimorfismos poseen baja penetrancia, pudiendo comportarse como silentes en aquellos casos donde no existe exposición al agente causal. Actuando en conjunto, la

suma de las pequeñas variaciones puede explicar una proporción importante de la susceptibilidad a una enfermedad multifactorial.

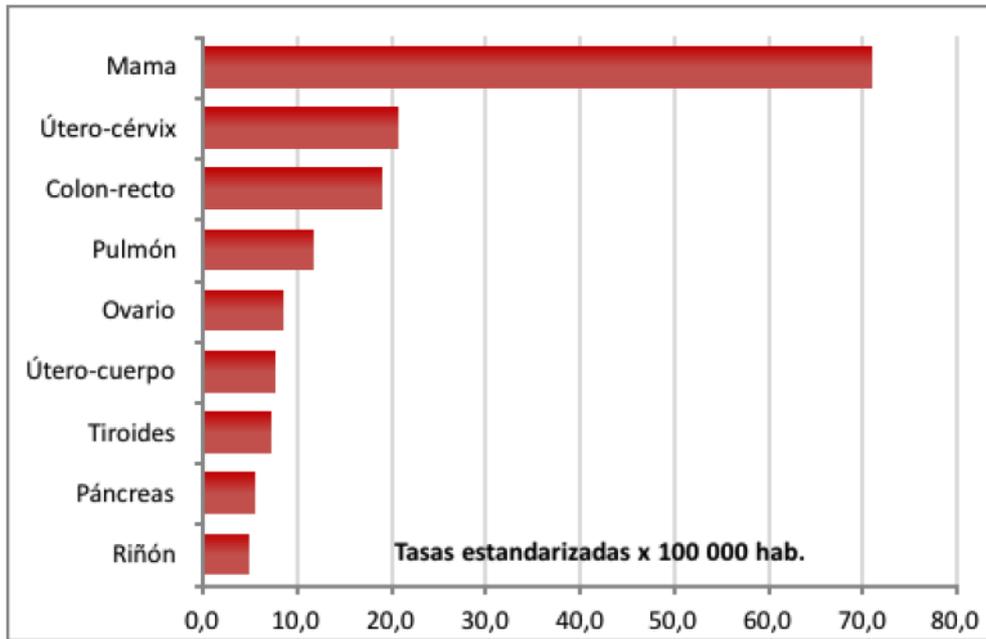
El conocimiento de las variaciones genéticas derivado del proyecto genoma humano hace posible la implementación de un enfoque poligénico orientado hacia la prevención de las enfermedades, permitiendo la identificación de individuos que por su perfil genotípico sean susceptibles al desarrollo de cáncer de cuello uterino.

### **1.1.2. Epidemiología Descriptiva**

El cáncer de cuello uterino es el séptimo cáncer más frecuente en la población general y el segundo más común entre las mujeres de todo el mundo. La incidencia global estimada para este cáncer en el año 2012 fue de aproximadamente 528.000 nuevos casos por año. En términos generales, es mucho más común en países en desarrollo, donde representa casi el 12% de todos los cánceres femeninos. Las regiones de alto riesgo, con Tasas de Incidencia ajustadas por edad estimadas en más de 30/100.000 mujeres por año, incluyen el Este de África (42,7), Melanesia (33,3), Sur (31,5) y Centro (30,6) de África. Por otra parte, las tasas de incidencia más bajas se encuentran en Australia / Nueva Zelanda (5,5) y Asia Occidental (4,4). El Cáncer de cuello uterino sigue siendo el cáncer más común en las mujeres de África Central y Oriental. (IARC, GLOBOCAN 2012).

Para el año 2012, se estimaron 266.000 muertes por cáncer cervical en todo el mundo, representando el 7,5% de todas las muertes por cáncer femenino. La mortalidad varía entre las diferentes regiones del mundo, con tasas que van desde menos de 2/100.000 en Asia Occidental, Europa Occidental y Australia / Nueva Zelanda a más de 20/100.000 en Melanesia (20,6), Centro (22,2) y Este (27,6) de África. (IARC, GLOBOCAN 2012).

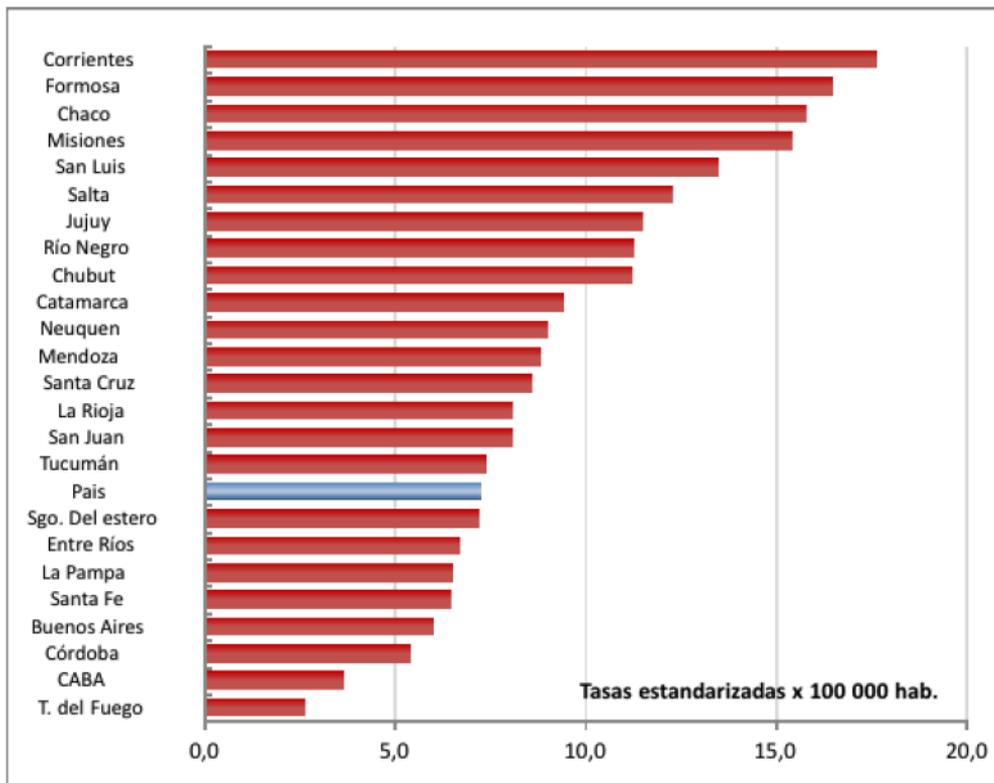
En nuestro país, dentro del cáncer ginecológico, el primer lugar lo ocupa el cáncer de mama y el segundo lugar el cáncer de cuello uterino, con una tasa de incidencia de 21/100.000 en el año 2012 (**Gráfico 1**).



**Gráfico 1-** Tasas de Incidencia ajustadas por edad estimadas por la IARC para los principales tipos de cáncer en mujeres. Argentina, 2012.

Asimismo, en Argentina se diagnostican aproximadamente 4000 nuevos casos por año y mueren 1800 mujeres. La tasa de mortalidad ajustada por edad fue de 7/100.000 mujeres para el año 2012 (Msal.gov.ar., 2012). De esta manera, el cáncer de cuello uterino representa el 10% de la mortalidad femenina por cáncer, hecho que lo sitúa en el sexto lugar como causa de muerte por motivo de enfermedad neoplásica en la población femenina.

En nuestro país, el cáncer cérvico-uterino es un indicador de inequidad en salud. La carga de enfermedad y mortalidad varía según la provincia, siendo más alta en poblaciones con menor nivel de desarrollo socio-económico (**Gráfico 2**).



**Gráfico 2-** Tasas de Mortalidad estandarizadas por edad para el cáncer cervicouterino según las diferentes provincias. Argentina, 2012. IARC.

Dentro de la provincia de Buenos Aires, en el área de influencia de este estudio correspondiente al Partido de La Plata, la tasa de mortalidad del carcinoma de cuello uterino estimada para el período 2007-2009 fue de 5,5/100.000 mujeres por año (Msal.gov.ar., 2012).

La importancia del cáncer cervical se encuentra aún más destacada por el hecho de que la sobrevivencia global de los pacientes con esta neoplasia generalmente es más corta que para las pacientes con cáncer de mama. Además, el cáncer cervical ocurre en una edad relativamente más precoz que la del cáncer de mama y en general afecta a mujeres multíparas al inicio de los años post-menopáusicos.

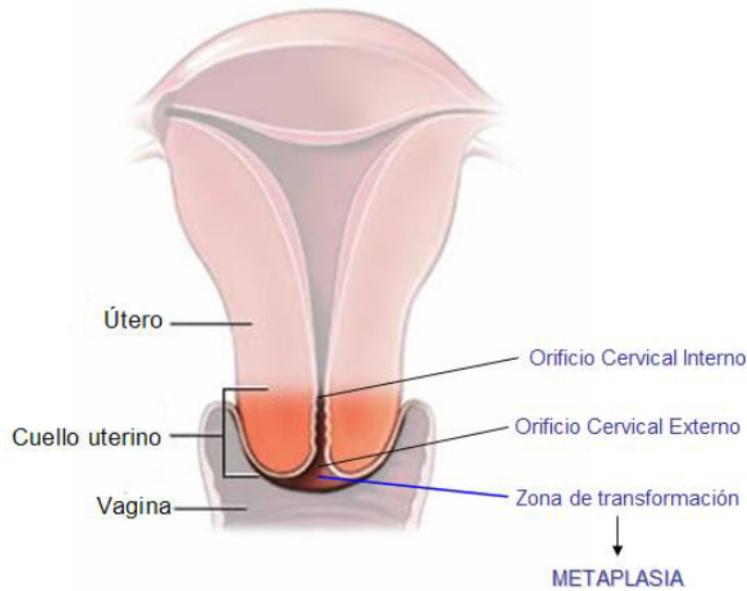
Argentina definió como prioritario el abordaje integral de la prevención de cáncer cervicouterino, con el objetivo de disminuir la mortalidad por esta patología. Esto

incluye la incorporación de la vacuna contra VPH para niñas de 11 años y el fortalecimiento de la estrategia de prevención secundaria a través del tamizaje basado en la citología y la introducción del Test de VPH como tamizaje primario.

### **1.1.3. Histología y Clasificación**

Se distinguen dos formas de carcinomas de cuello uterino: el de células escamosas (SCC), que comprende el 80% de los carcinomas detectados y el adenocarcinoma (ADC), que presenta una prevalencia cercana al 20%. El cuello uterino normal posee dos tipos de epitelio, el exocervical (plano escamoso) y el endocervical (cilíndrico mucosecretor). El sitio de unión de ambos epitelios se denomina zona de unión escamo-columnar y es un área dinámica, sujeta a fenómenos de proliferación y remodelación que transforma el epitelio cilíndrico mucosecretor en epitelio escamoso, proceso llamado metaplasia. El cáncer de cuello de útero afecta a esta zona particular del cérvix (Alonso *et al.*, 2005). El mayor riesgo de desarrollo de neoplasia coincide temporalmente con el momento de mayor actividad metaplásica, indicando que este reemplazo es el que permite que la transformación celular se produzca.

Las lesiones que se desarrollan en el interior del epitelio han variado su nomenclatura desde 1949, cuando se denominaron “displasias”, pasando por “neoplasia intraepitelial cervical” (NIC), con sus categorías: leve (NIC 1), moderada (NIC 2) y grave o carcinoma in situ (NIC 3). En 1989, en el Congreso de Bethesda, Washington, se propuso la denominación SIL (lesión intraepitelial escamosa). El sistema Bethesda tiene como objetivo proporcionar una terminología y criterios diagnósticos uniformes para la caracterización de la patología cervical. Esta clasificación citológica divide las



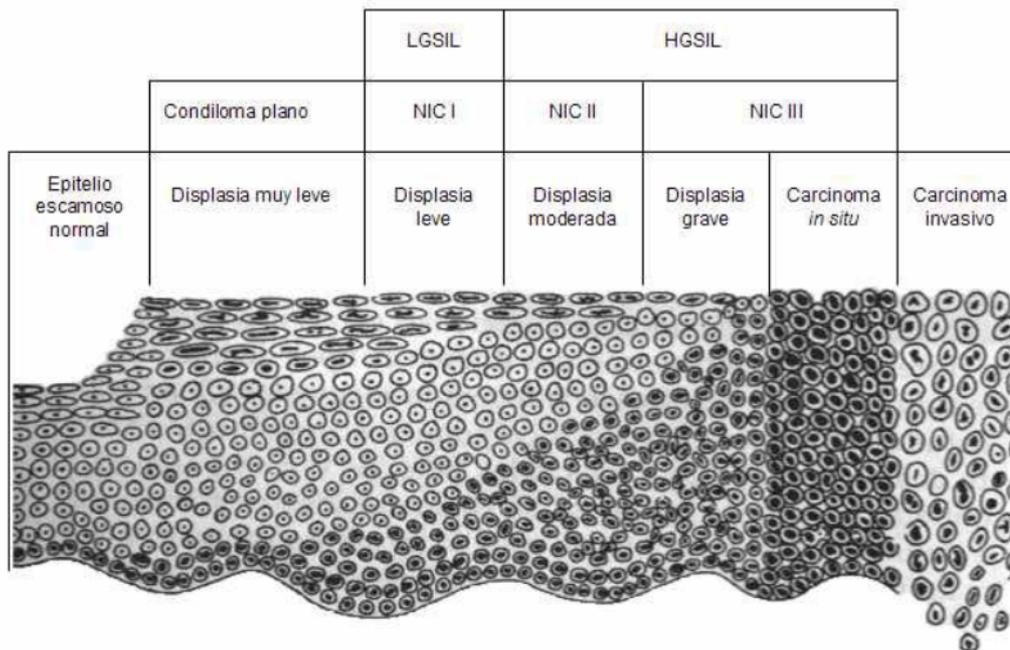
**Figura 1-** Esquema del cuello uterino normal, donde se distinguen el orificio cervical interno, el orificio cervical externo y la zona de transformación.

anormalidades de células escamosas en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado o LGSIL (“*low grade squamous intraepithelial lesions*”) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado o HGSIL (“*high grade squamous intraepithelial lesions*”). Aquellas anormalidades que no corresponden a estas categorías o que se deben a cambios reactivos benignos se clasifican como atipia de células escamosas de significado incierto o ASCUS (“*atypical squamous cell of uncertain significance*”) (Farias-Eisner, 1995).

Las lesiones intraepiteliales conforman un espectro de anormalidades consideradas como precursoras del cáncer cervicouterino (Alonso P. *et al.*, 2005). La distancia temporal que separa a las lesiones intraepiteliales del carcinoma invasor indica una lenta evolución potencial de las lesiones primarias para alcanzar al cáncer invasor.

El sitio de origen de las SIL es predominantemente el labio anterior del cérvix, tanto en el epitelio de la zona de transformación como en el epitelio endocervical de la unión. El proceso se puede iniciar en las células basales del epitelio escamoso del exocérvix, en las células basales de la zona de transformación o en las células de reserva del

endocervix. La mayoría de las SIL aparecen en la unión escamo-columnar de la zona de transformación y solo alrededor del 10% se localizan en el epitelio cilíndrico sin involucrar a la unión. En términos generales las SIL ubicadas en el exocervix tienden a ser de bajo grado, a diferencia de aquellas que se extienden en el canal endocervical, que son de alto grado. Las SIL se caracterizan por una proliferación de células anormales, con pérdida de la polaridad celular y de la maduración citoplasmática; la proporción que ocupan estas células inmaduras dentro del epitelio es uno de los parámetros para su clasificación (Alonso P. *et al.*, 2005) (**Figura 2**).



**Figura 2**- Esquema de la graduación de las lesiones cervicales basado en la proporción de la lesión que es ocupada por células no diferenciadas. Tomado y modificado de Lörincz y Reid, 1997.

Usualmente, en las pacientes con LGSIL se observa una reversión en su epitelio cervical a su condición normal, sin mediar tratamiento. Solo alrededor del 20% de los casos con LGSIL progresan al estadio siguiente de HGSIL (Ross, 1998).

El estadio HGSIL no es reversible, aunque algunos estudios sugieren que un pequeño porcentaje de pacientes con HGSIL no tratado puede revertir su condición a lesiones de

bajo grado. Sin embargo, el HGSIL es casi siempre de tratamiento quirúrgico, con resultados positivos. En la mayoría de los pacientes con HGSIL que no reciben tratamiento se observa una progresión hacia el carcinoma microinvasivo y posteriormente al carcinoma invasivo de células escamosas (Ross, 1998).

## **1.2. Virus del Papiloma Humano**

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares han establecido al virus del papiloma humano (VPH) como el principal factor etiológico de este tipo de cáncer, y ha sido propuesto como una causa necesaria, implicando esto que el cáncer cervical no aparecerá sin la presencia persistente del ADN de VPH (Bosch et al., 2002). Sin embargo la prevalencia de la infección por VPH es más alta respecto de la incidencia del carcinoma cervical. Esto se debe a que, en general, estas infecciones son limitadas por el sistema inmune del hospedador. Incluso cuando la infección persiste, el cáncer cervical mayoritariamente no aparece hasta después de transcurridos muchos años. Este hecho apoya la hipótesis de que la infección por VPH puede iniciar una lesión, pero no necesariamente promoverla a un estadio de carcinoma cervical. Ciertas influencias oncogénicas dadas por otros factores o cofactores, intervendrían en el proceso de transformación y establecimiento de la malignidad. De este modo, la persistencia de la infección sería una condición necesaria, pero no suficiente, para el desarrollo de lesiones intraepiteliales cervicales.

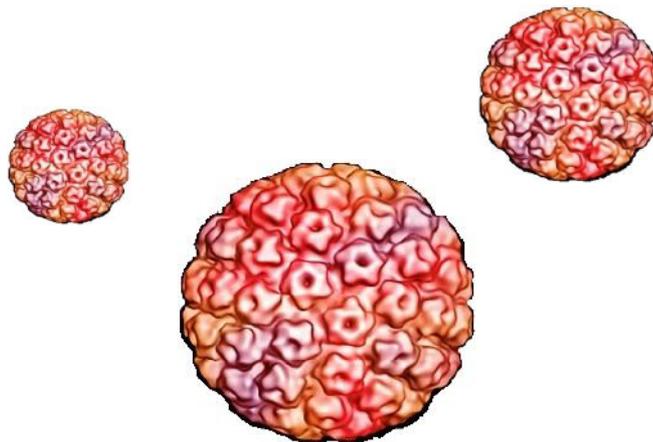
Se estima que el VPH es la infección de transmisión sexual (ITS) más común. La prevalencia de VPH ha sido estimada en un 26.8% en mujeres de 14 a 59 años (Dunne et al., 2007) y estudios en Argentina han arrojado resultados de prevalencia de la infección de un 46% para la ciudad de La Plata (Abba et al., 2003), 26% para Ushuaia (Sijvarger et al., 2006), 17% en Concordia (Matos et al., 2003) y 43% para Posadas (Tonon et al., 1999; Tonon et al., 2003). De los 6.2 millones de nuevas infecciones con

VPH por año, 74% ocurren en mujeres de entre 15 y 24 años, y algunas estimaciones sugieren que más del 80% de las mujeres sexualmente activas adquirirán VPH genital antes de los 50 años (Huang, 2008).

### **1.2.1. Clasificación y estructura**

El virus del papiloma humano (VPH) es un agente infeccioso epiteliotrópico semejante en su estructura superficial a los poliomavirus y anteriormente clasificado dentro de la Familia Papovaviridae (Raj, 1994). Actualmente se los ha reubicado en la Familia: Papillomaviridae, Subfamilia: Papillomavirus, Género: Papilloma (Van Regenmortel et al., 1999 o 2000). Hasta el momento se han identificado 170 genotipos virales distintos y se han obtenido las secuencias completas o parciales de sus genomas (de Villiers, 2013).

El virión del VPH posee una nucleocápside icosaédrica de 72 capsómeros, desnuda, de 55nm de diámetro. Está constituido por ADN de doble cadena circular, de unos 8 kb de longitud, que se replica en el núcleo celular (Shah y Howley, 1990). Los genomas de los diversos tipos tienen la misma organización general, pero pueden diferir considerablemente en longitud y secuencias. La estructura no envuelta del virus le otorga una resistencia relativa al calor y a los solventes orgánicos (Roden *et al.*, 1997; Stoler, 2000).



**Figura 3- Nucleocápside del Virus del Papiloma Humano.**

Al igual que otros virus, es un parásito intracelular obligado por lo que debe liberar su genoma y proteínas accesorias dentro de la célula hospedadora y subsecuentemente utilizar la maquinaria biosintética celular para la replicación viral (Marsh and Helenius, 2006). El VPH infecta el epitelio mucoso y cutáneo en una amplia variedad de vertebrados superiores, induciendo en todos los casos la proliferación celular.

### **1.2.2. Genoma del Virus del Papiloma Humano**

El genoma del Papilomavirus humano consiste en ADN de doble cadena circular, de 7200-8000 pb., super-enrollado y condensado por su asociación a proteínas de tipo histónicas, en una estructura que se asemeja a la cromatina celular (Shah y Howley, 1990). Contiene más de diez marcos abiertos de lectura, que revelan ser altamente conservados entre los miembros de este grupo. La transcripción del ADN es unidireccional y de regulación compleja (Turek, 1994).

El genoma del VPH puede ser dividido en tres regiones:

**1) La región de control larga (LCR)** o región regulatoria río arriba (**URR**), que posee las secuencias de regulación para la replicación y la expresión génica del VPH. Este segmento varía substancialmente entre los tipos de VPH individuales y posee aproximadamente 1000 pb (10%) del genoma.

**2) La región temprana (E)**, que comprende los genes *E1-E7*, involucrados en la persistencia del genoma, replicación del ADN y activación del ciclo lítico. Esta región abarca del 50 al 70% del genoma viral.

**3) La región tardía (L)**, que contiene los genes que codifican los componentes de la cápside, *L1* y *L2*. Una de las proteínas de la cápside, *L1*, tiene un peso molecular de 55.000 dalton y su marco abierto de lectura (ORF) está altamente conservado entre los distintos tipos de Papilomavirus.

Las proteínas virales E son transcriptas a partir del promotor temprano (P97 en VPH 31) antes de la replicación productiva, mientras que las proteínas L son transcriptas principalmente a partir del promotor tardío (P742 en VPH 31) durante la síntesis de nuevos viriones (Fehrmann y Laimins, 2003).

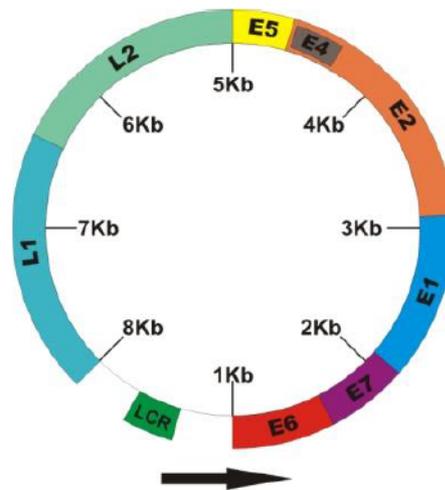


Figura 4- Representación gráfica del genoma del VPH. Tomado y modificado de Burd, 2003.

### 1.2.3. Productos génicos del Virus del Papiloma Humano

#### E1

La proteína viral E1 de 73 kDa es requerida para la replicación viral. Se une a una secuencia específica de ADN en el origen de replicación y se ensambla en complejos hexaméricos con la ayuda de una segunda proteína viral, E2. Este complejo posee actividad helicasa e inicia la separación de las cadenas de ADN viral y así provee el molde para la subsecuente síntesis del ADN (WHO-IARC Monographs, 2007).

#### E2

El gen E2 codifica un producto de alrededor 45 kDa, que se une a un sitio específico del ADN, ayudando a reclutar a E1 hacia el origen de replicación; también cumple un importante rol en la regulación de la transcripción viral.

## **E4**

El gen E4 está localizado en la región temprana y se superpone con E2, pero es transcrito en un marco de lectura diferente (WHO-IARC Monographs, 2007). A pesar de su nombre, está involucrada en estadios tardíos del ciclo viral, cuando se ensamblan los viriones completos. Se desconoce si tiene propiedades transformantes, sin embargo se considera que cumple un importante papel en la maduración y replicación de los virus. También induce el colapso de la red de citoqueratina citoplasmática de los queratinocitos humanos, una situación que podría facilitar la liberación de los viriones desde la célula infectada (Motoyama *et al.*, 2004).

## **L1 y L2**

Los genes L1 y L2 producen las proteínas estructurales del virión. Se ensamblan en cápsomeros, los cuales forman la cápside icosaédrica alrededor del genoma viral, durante la generación de la progenie de viriones (WHO-IARC Monographs, 2007).

### **1.2.4. Proteínas claves del VPH en la carcinogénesis cervical**

Los Papilomavirus de alto riesgo son potentes inductores de la proliferación celular y pueden immortalizar un gran número de tipos celulares humanos. El potencial maligno de los diferentes tipos virales se basa en la interacción de las oncoproteínas E6 y E7 con diversos factores celulares, siendo los más importantes pRb y p53.

## **E5**

El gen E5 codifica cadenas polipeptídicas cortas, hidrofóbicas, con capacidad de anclaje en la membrana celular. La proteína E5 exhibe poca actividad transformadora (Fehrmann y Laimins, 2003). El marco abierto de lectura de E5 se encuentra usualmente eliminado en células provenientes de carcinoma cervical, indicando la ausencia de un rol esencial de este gen en el mantenimiento del fenotipo maligno en la célula hospedadora (zur Hausen, 2000; Schwarz *et al.*, 1985). Cuando está presente, E5

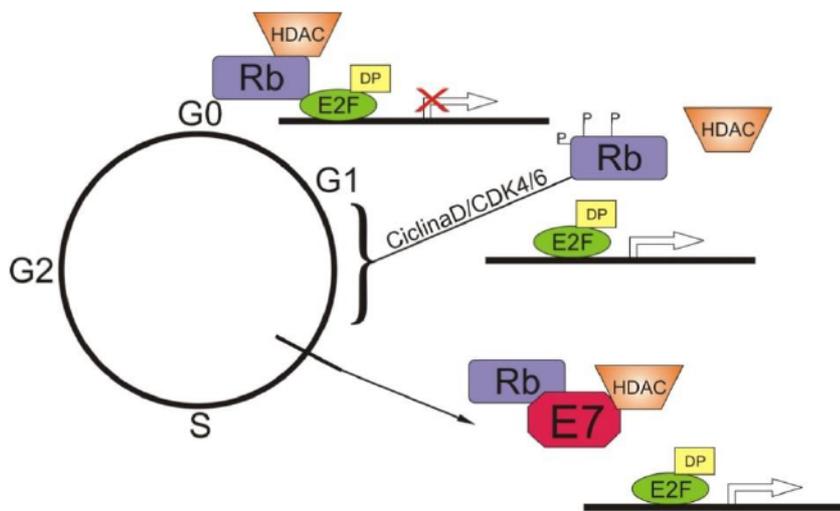
interacciona y modula la función de otras proteínas asociadas con la membrana celular. Los dos blancos de acción principales son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en los queratinocitos y el receptor del factor de crecimiento plaquetario (PDGF) en los fibroblastos. E5 promueve la asociación del receptor y retarda su remoción y degradación (DiMaio y Mattoon, 2001). La sobreexpresión constante de la proteína E5 puede modificar el crecimiento celular y resultar en una transformación neoplásica en algunos sistemas experimentales (Leechanachai *et al.*, 1992; DiMaio y Mattoon, 2001).

## **E6**

E6 es uno de los primeros genes expresados durante la infección, y tiene un rol determinante en la immortalización celular. La proteína E6, de aproximadamente 150 aminoácidos, no posee actividad enzimática intrínseca y ejerce sus funciones interactuando con proteínas celulares (Fehrmann y Laimins, 2003). La propiedad mejor conocida de la proteína E6 de los VPHs de alto riesgo es la capacidad de unirse y degradar a la proteína supresora de tumores p53, a través del reclutamiento de la proteína asociada a E6 (E6-AP, *E6-associated protein*). Este hecho resulta en la inhibición de la actividad transcripcional de p53 (Werness *et al.*, 1990; Scheffner *et al.*, 1993; WHO-IARC Monographs, 2007). Ante una situación de daño genético que no puede ser reparado, p53 induce apoptosis, ya que tiene un papel crucial en el mantenimiento de la integridad del genoma celular (Klingelutz *et al.*, 1996; Veldman *et al.*, 2003). De este modo la pérdida de función de p53 promueve la supervivencia después del daño o inestabilidad genómica de las células cancerosas que deberían ser susceptibles a apoptosis, permitiendo la acumulación de cambios genéticos que pueden conducir a la progresión maligna (White *et al.*, 1994; Arends *et al.*, 1995). En contraste con los tipos virales de alto riesgo, las proteínas E6 codificadas por los tipos 6 y 11 de bajo riesgo, se unen a p53 con menor afinidad, no pudiendo mediar su degradación.



(Wang *et al.*, 2001). La proteína E7 de los tipos virales 6 y 11 se unen a pRB con una afinidad significativamente menor que las proteínas E7 de los tipos 16 y 18 (Münger *et al.*, 1991). A pesar de la importancia del complejo E7- pRB, este no es un requisito necesario para desarrollar la oncogenicidad. E7 posee otros blancos proteicos claves en la regulación del ciclo celular como las proteínas p107, p130, una ciclina A y una quinasa asociada a la ciclina p33 (Zerfass-Thome *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997; zur Hausen 2000).



**Figura 6**-Efectos de E7 sobre Rb. Los complejos Rb-HDAC reprimen la actividad de los complejos de transcripción E2F/DP-1 en G1. E7 une Rb y HDAC independientemente, causando la activación constitutiva de los genes dependientes de E2F. Tomado de Longworth y Laimins, 2004.

Mediante el bloqueo de dos genes oncosupresores cruciales, las proteínas E6 y E7 contribuyen significativamente al potencial de transformación celular, promoviendo fenotipos sensibles a la acumulación de mutaciones y refractantes a los estímulos anti-proliferativos. Hasta el momento, otras proteínas del VPH no han demostrado poseer un rol significativo en los procesos de transformación maligna.

### 1.2.5. Diversidad genética del VPH

Existen más de 120 tipos de VPH, los cuales se clasifican según el grado de homología de las secuencias de ADN. Se considera un nuevo tipo de VPH cuando el marco abierto de lectura *L1* presenta más del 10% de diferencia respecto de prototipos establecidos (Delius *et al.*, 1998). La gran diversidad genética resultante se explica por una dilatada co-evolución con los humanos y los mamíferos en general (Bernard, 1994). Basado en la composición de los ácidos nucleicos se han definido numerosos subgrupos, los cuales se corresponden en buena manera con los agrupamientos clínicos (Lörincz *et al.*, 1992). Los Papilomavirus pueden ser agrupados en tipos cutáneos y mucosos según infecten células basales de la piel o las mucosas. El primer grupo consiste en tipos comunes a la población general, como son los agentes etiológicos de las verrugas plantares (VPH-1), verrugas comunes (VPH-2, -4), y de la condición *epidermodysplasia verruciformis* (VPH -5, -8). El segundo grupo está constituido por miembros que causan infecciones en el epitelio anogenital u orofaríngeo: los tipos VPH-6, 11, 34, 40, 42, 44, 53, 55, 59, 61, etc., se denominan tipos virales de bajo riesgo por hallarse asociados a una variedad de proliferaciones benignas: neoplasias intraepiteliales, papilomas faríngeos, orofaríngeos y anogenitales, queratocantomas, verrugas anogenitales y displasias leves. Los tipos VPH-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, etc., son considerados de alto riesgo porque están comúnmente asociados a lesiones displásicas moderadas o severas y al cáncer cervical invasor, cáncer de vulva, de vagina, pene y ano (zur Hausen, 1996; Bonnez y Reichman, 2000; Stoler, 2000).

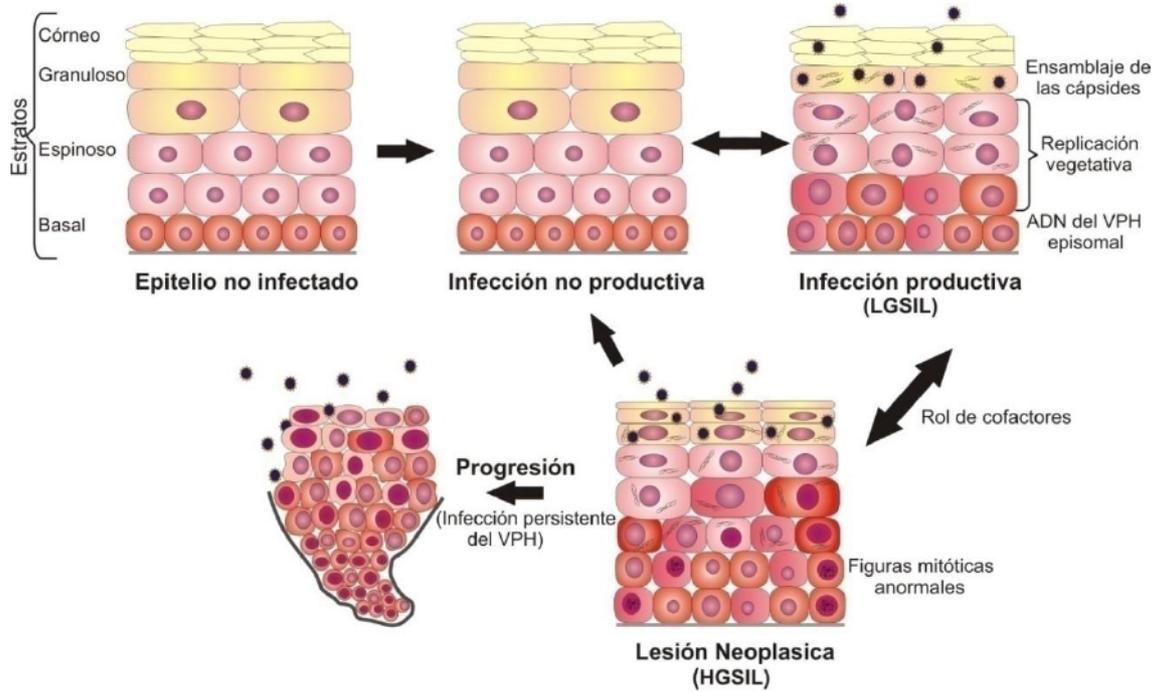
### 1.2.6. El ciclo biológico del VPH

El ciclo biológico del Papilomavirus está estrechamente ligado al grado de diferenciación de la piel o mucosas (**Figura 7**). Para poder establecerse en el epitelio, el virus debe ganar acceso a las células basales. Una vía común de infección es a través de

micro-traumas, los que se forman en gran número en las abrasiones menores y en el intercurso sexual.

Una vez que el VPH ha ingresado a las células epiteliales basales, el genoma se localiza en el núcleo de forma episomal, y la replicación viral queda limitada al ciclo celular. En esta fase, la producción de las proteínas virales es mínima, expresándose los genes *E6* y *E7*, y en una menor cantidad otros genes tempranos. Los mismos estimulan la proliferación y expansión lateral de las células basales, creando un ambiente propicio para la subsecuente replicación a medida que las células suprabasales se van diferenciando (zur Hausen, 2002).

Cuando la infección ha sido firmemente establecida, el VPH debe migrar a las capas superiores y producir los componentes estructurales. Esto es logrado mediante la supresión de los genes *E6* y *E7* por parte de las proteínas regulatorias virales *E1* y *E2*, que permiten que las células basales infectadas dejen de proliferar y se diferencien a queratinocitos. Al mismo tiempo, el ADN del VPH inicia su replicación como círculo rodante utilizando las enzimas del hospedador (Dowhanick *et al.*, 1995; Frattini *et al.*, 1997). Cuando los queratinocitos alcanzan las capas superficiales, se promueve la expresión de los genes tardíos, permitiendo el ensamblaje de las partículas virales y su subsecuente liberación.



**Figura 7- Biología de la infección por VPH.**

### 1.3. Factores de riesgo

El VPH es detectado en un amplio número de mujeres sanas y, sin embargo sólo una pequeña fracción de las mujeres infectadas desarrollará posteriormente un cáncer cervical. Esto indica que en el proceso carcinogénico deben intervenir otros cofactores importantes, además del VPH.

Diversos estudios epidemiológicos han propuesto una variedad de cofactores implicados en la progresión del carcinoma cervical, entre ellos se encuentran: el tipo de HLA, la inmunodepresión, la presencia de hormonas esteroideas (basado en asociaciones de cánceres cervicales con tasas de parición alta y utilización a largo plazo de anticonceptivos orales), y el tabaquismo. La mayor parte de estos cofactores parecen influir en la progresión a CIN 3 más que de CIN 3 a cáncer (Arends et al., 1995). Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* y otros virus podrían también interferir en la supresión o eliminación de la infección por VPH por parte del sistema inmunitario



Desde hace unos años, los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) han comenzado a ser intensamente estudiados con el objetivo de dilucidar las bases genéticas de enfermedades de base multifactorial.

Tales polimorfismos representan la forma más frecuente de variabilidad en el genoma humano, y muchos de los mismos corresponderían a cambios no sinónimos a nivel proteico, razón por la que están siendo utilizados como los marcadores de elección en los estudios de asociación de enfermedades con componentes multigénicos, como las enfermedades neoplásicas (Rebbeck et al., 2004).

Considerando que los carcinomas cervicales carentes de VPH son extremadamente raros, se ha establecido que el virus es el responsable de la mayoría de los tumores cervicales. Sin embargo, también se ha demostrado que gran cantidad de las infecciones por VPH son de carácter transitorio, indicando que la mayoría de las mujeres son capaces de resolver la infección de forma satisfactoria. La habilidad de una persona para resolver una infección está ciertamente influenciada por factores externos y por factores inherentes al hospedador, lo que implica que muchas de las fases del desarrollo tumoral pueden estar afectadas por el componente genético. Es decir que el genotipo de una persona determinaría directamente la probabilidad de exposición al VPH; ciertos genotipos podrían otorgar predisposición al desarrollo de cáncer cervical independientemente de la infección; o podrían existir combinaciones genéticas que otorguen resistencia a la misma.

Los genes de penetrancia incompleta, particularmente aquellos de baja penetrancia pueden predisponer al desarrollo de determinadas características como el cáncer, entre otras. Aunque el riesgo asociado con cada alelo individual pueda ser pequeño, la combinación de un cierto número de variantes alélicas puede presentar una mayor contribución al desarrollo del fenotipo que aquellos genes de alta penetrancia identificados hasta el momento (Houlston y Peto, 2004). Por este motivo, la

consecuencia de la exposición a un agente carcinogénico puede presentar variación entre diferentes individuos.

#### **1.4.1. Polimorfismos de nucleótido simple y genes reguladores del ciclo celular**

En la carcinogénesis, la regulación del paso a través de G1 es un evento esencial en el establecimiento maligno de un tumor. Los Papilomavirus de alto riesgo interrumpen este control por la degradación de p53 y la inactivación de Rb por la acción de las oncoproteínas E6 y E7 respectivamente (Revisado en zur Hausen, 2002).

Específicamente, el polimorfismo en el codón 72 del gen *p53* es objeto de una animada controversia, ya que las variantes p53Arg y p53Pro poseen susceptibilidades diferenciales a la inactivación por E6 (Storey y col., 1998; Rosenthal y col., 2000; Koushik y col., 2004). La proteína p21, por otra parte, es uno de los efectores directos en el bloqueo de G1 mediado por la proteína p53. Su característica principal está dada por su habilidad de unirse e inhibir ciertos complejos quinasa dependiente de ciclina. Ciertos polimorfismos en este gen podrían ser cruciales en el desarrollo del cáncer cervical (Roh y col., 2001; Lee y col., 2004). Es probable que la variabilidad genética inter-individual de las proteínas de la vía Rb también se encuentre involucrada diferencialmente en los fenómenos de transformación celular inducida por VPH.

#### **1.4.2. Genes supresores de tumores**

En contraste con las mutaciones activadoras que generan alelos oncogénicos de los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores pierden su habilidad para regular el crecimiento celular cuando están mutados. En este caso, la pérdida de función es la que contribuye al desarrollo del tumor. Estos genes son recesivos y por lo tanto ambos alelos deben ser defectuosos para contribuir en el proceso de la transformación celular. Al igual que los proto-oncogenes, las funciones normales de los genes supresores de

tumores son diversas, y sus productos se localizan en distintos compartimentos subcelulares. Entre algunos de los genes supresores de tumores podemos mencionar a *p53*, *Rb*, *BRCA1*, *BRCA2*, *APC*, *p16*, etc.

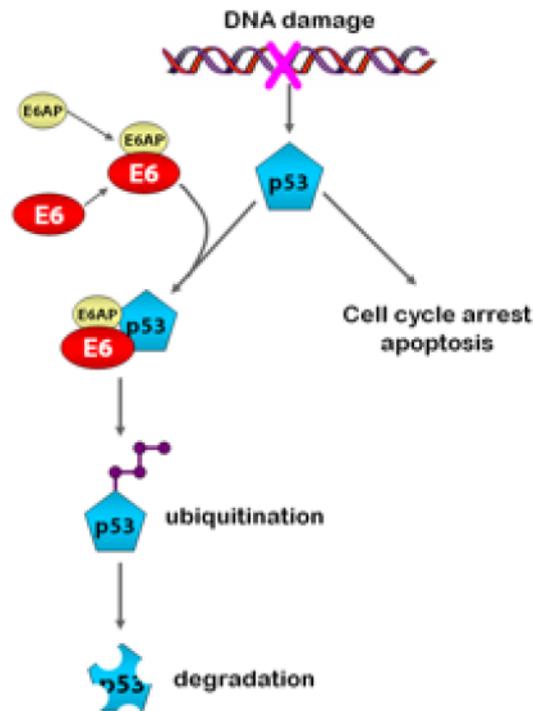
#### 1.4.2.1. El gen supresor de tumores p53

El gen *p53* está localizado en el cromosoma 17 y codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos. Esta forma un complejo tetramérico que reconoce una secuencia de ADN, regulando la expresión de varios genes (Soussi y May, 1996). La activación de *p53* resulta en la transcripción de numerosos genes que regulan directamente la proliferación celular, la apoptosis, la estabilidad genómica y la diferenciación celular. Estos genes incluyen a *p21WAF1/CIP1*, *GADD45*, *MDM2*, *14-3-3-s*, *BAX*, *B99*, *TSP1*, etc. (Nakamura, 2003).

Una de las funciones más importantes de *p53* es el arresto del ciclo celular. Cuando se produce una alteración en la secuencia normal del ADN, *p53* activa la síntesis de *p21*. Esta se une al complejo CDK/ciclina D, impidiendo la progresión del ciclo celular a través de G1. Simultáneamente, se activa la vía de reparación y síntesis del ADN, mediante la expresión de los genes *PCNA* y *GADD45*. Si el daño del ADN es severo, *p53* activa genes relacionados a la inducción de la apoptosis, tales como *BAX* o *KILLER/DR5* (Woods y Vousden, 2001).

El gen *p53* se encuentra mutado en el 50% de todos los tipos de cáncer humanos, constituyendo el blanco génico más alterado (Hollstein *et al.*, 1991). La función normal de *p53* puede perderse de numerosas formas, la más común es la delección de una región del cromosoma 17p y mutación sutil en el otro alelo. Esto ha sido documentado en un gran número de neoplasias, incluyendo las de cerebro, pulmón, hígado, vejiga y colon (Nigro *et al.*, 1989; Harris, 1993). Asimismo, su inactivación por parte de la

oncoproteína E6 del VPH podría resultar en la acumulación de lesiones en el ADN que de alguna manera contribuirían a la progresión tumoral.



**Figura 9-** El daño en el ADN induce la activación de p53, conduciendo al arresto del ciclo celular o a la apoptosis. La proteína E6 del VPH se une a E6-AP y lo dirige a p53, lo cual resulta en la ubiquitinación mediada por E6-AP y una degradación proteosomal rápida de p53.

Tomado de Jo & Kim (2005).

#### 1.4.2.1.1. Polimorfismo del codon 72 del gen *p53*

Se han descrito dos variantes del gen *p53*, en relación a un sitio polimórfico en el codón 72 (**dbSNP no. Rs 1042522**), la variante arginina (*p53Arg*) y la variante prolina (*p53Pro*). Estas dos isoformas despliegan diferencias funcionales en sus actividades bioquímicas y biológicas (Beckman *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1996). Este polimorfismo ha sido extensamente estudiado en el cáncer cervical, debido a que se ha demostrado que la variante *p53Arg* es hasta siete veces más susceptible a la degradación dirigida por la proteína viral E6 del VPH que la variante *p53Pro*. Por lo tanto, se ha especulado que el genotipo homocigota *p53Arg/Arg* tendría una mayor susceptibilidad

de desarrollo de neoplasias asociadas al VPH (Storey *et al.*, 1998). En lo concerniente al cáncer cervical, los resultados demuestran un riesgo mayor para adenocarcinomas (OR=1,7) en comparación con carcinomas de células escamosas (OR= 1,5) (Koushik *et al.*, 2004).

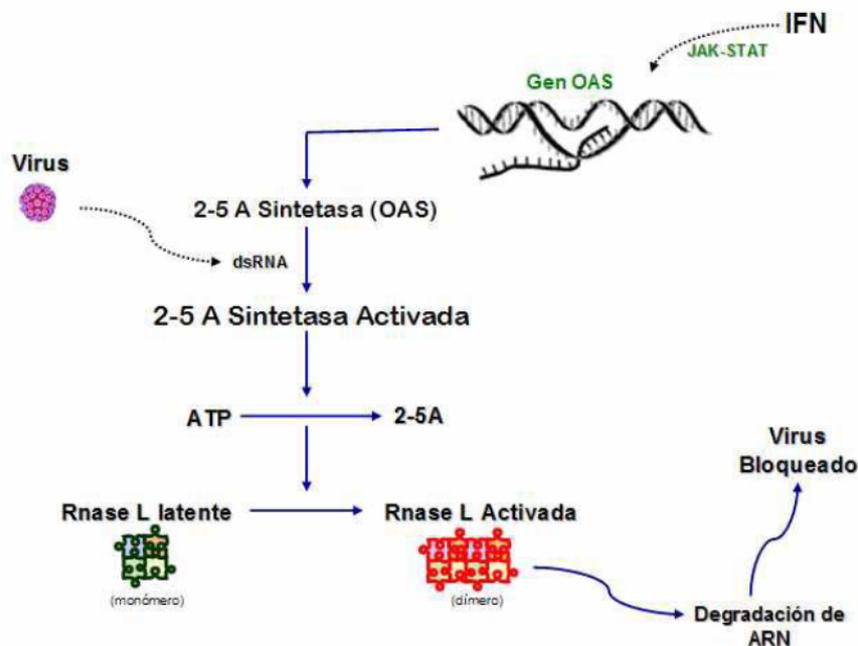
Independientemente de la interacción con el VPH, se ha demostrado que las variantes del codón 72 de *p53* son funcionalmente diferentes *in vitro*, y que además el alelo *p53Arg* induce la apoptosis al menos cinco veces más eficientemente que la variante *Prolina* (Dumont *et al.*, 2003). Hasta la fecha, las investigaciones se han extendido hacia todos los tipos de carcinomas, y en especial en aquellos en cuyo desarrollo se sospecha estar involucrado el Papilomavirus humano.

#### **1.4.2.2. El gen *RNASEL***

El gen *RNASEL* codifica una proteína quinasa de 740 aminoácidos, denominada RNase L, que posee tres dominios y capacidad de dimerizarse, y se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (1q25.3) (Smith *et al.*, 1996). RNase L tiene actividad endorribonucleasa y actúa como mediador en la vía del sistema oligoadenilato ligado a 2'-5' (2-5A) regulado por interferón, el cual está asociado a actividades antivirales y proapoptóticas. A través del sistema de transducción de JAK-STAT, el interferón induce a la familia de oligosintetasas 2'-5' OAS, que a su vez son activadas por ARN doble cadena.

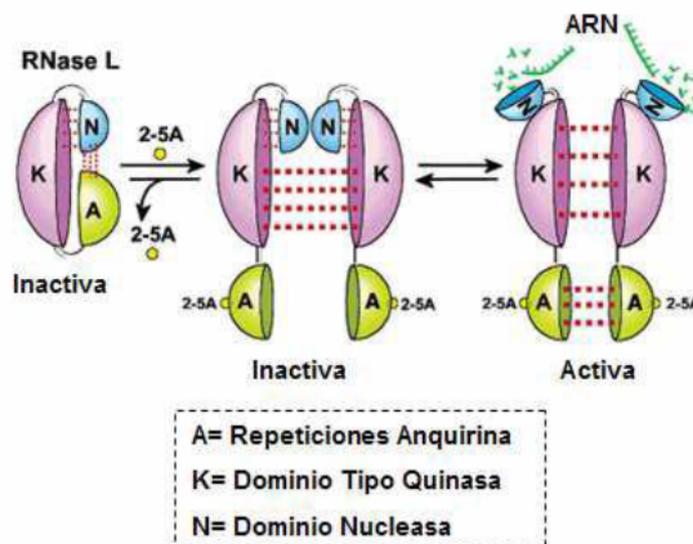
Las OAS convierten el ATP en pirofosfato y en una serie de pequeños oligoadenilatos ligados a 2'-5' conocidos como 2-5A (Zhou *et al.*, 1993). La única función bien conocida de esta vía es la activación de Rnase L, que posee un dominio de unión y de represión en el extremo N terminal, y un dominio similar al de una quinasa y ribonucleasa en el extremo C terminal (Silverman, 2003).

Existe evidencia que indica que Rnase L está asociado a la inducción y regulación de la apoptosis en respuesta a infecciones virales o a otros estímulos externos (Xiang *et al.*, 2003). Es más, los estudios de cáncer de próstata hereditario han demostrado que Rnase L posee una función supresora de tumores. El gen se encuentra en un locus de susceptibilidad para el cáncer de próstata hereditario denominado HPC1 (“*Hereditary Prostate Cancer on Chromosome 1q24-25*”), donde las alteraciones cromosómicas son frecuentes en familias que sufren esta enfermedad (Silverman, 2003). En este sentido, los niveles de la proteína Rnase L se encuentran sobreexpresados en tumores colorrectales, lo que parece ser un evento temprano en la carcinogénesis colorrectal (Wang *et al.*, 1995). En la línea celular derivada de carcinoma de colon HT-29 el efecto coloidal del tratamiento con interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) fue relacionado a la incapacidad de procesar rRNA, al incremento en la actividad de la sintetasa 2-5, y posiblemente a la activación de Rnase L dependiente de



**Figura 10-** Rol del sistema RNase L/ 2-5A en la vía antiviral de los IFN.

2-5A (Chapekar y Glazer, 1988). Estudios más recientes sugieren que la activación de RNase L responde a un espectro más amplio de factores: Shock osmótico y de membrana causado por Cloruro de Calcio, estrés oxidativo ocasionado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inflamación estimulada por TNF alfa y quimioterapia. Solamente dos mutaciones de la línea germinal han sido firmemente asociadas con el cáncer de próstata familiar, estas son Glu265X y Met1Ile, que según los estudios en niveles de expresión génica son cambios que inactivan la función de la proteína (Carpten *et al.*, 2002). Con respecto a otros tipos de cánceres, se ha encontrado que la alteración de este gen también podría estar asociada a un riesgo incrementado en cáncer de cérvix, de cabeza y cuello y de cáncer de mama (Madsen *et al.*, 2008). Aún más, algunos polimorfismos relevantes han sido identificados para Rnase L, dentro de éstos se destaca el cambio Arg462Gln en cáncer de próstata esporádico y hereditario (Rökman *et al.*, 2002).



**Figura 11-** Modelo funcional de la activación de RNase L por 2-5A.

Tomado y modificado de Silverman 2003.

#### **1.4.2.2.1. Polimorfismo del codón 462 de *Rnase L***

El codón 462 codifica un polimorfismo G/A (Arg462Gln) en el nucleótido 1385 (dbSNP no. Rs 486907) que se encuentra dentro de la región quinasa. Este cambio ha suscitado mucho interés porque la variante glutamina ha sido asociada con el cáncer de próstata hereditario (HPC) y el esporádico (Rökman *et al.*, 2002).

El polimorfismo posee dos variantes que están directamente asociadas a la capacidad de la enzima de dimerizarse: se ha demostrado experimentalmente que la variante glutamina posee tres veces disminuida su capacidad enzimática respecto a la variante arginina, y posee menos capacidad para causar apoptosis en respuesta a moléculas 2-5A en ensayos *in vitro* (Xiang *et al.*, 2003).

Se ha estudiado este polimorfismo en diversos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer cervical. Un grupo de investigación liderado por Madsen y col. encontró 15 cambios del tipo SNP asociados con la aparición del cáncer cervical, entre los cuales figuraba el polimorfismo Arg462Gln de RnaseL. Este SNP parecería estar implicado en la regulación postranscripcional de otro polimorfismo de baja penetrancia ubicado en el mismo exón.

#### **1.4.3. Polimorfismos de nucleótido simple y genes efectores del sistema inmunológico**

La inmunidad celular es fundamental en la regulación de la infección y desarrollo de las neoplasias asociadas al VPH. En el 80% de los pacientes, las lesiones remiten espontáneamente o el tratamiento estándar estimula este proceso. Sin embargo, un 10-20% de las lesiones no promueven una respuesta inmune apropiada y se prueban refractarias a los tratamientos clásicos (Cox *et al.*, 2001). Este comportamiento podría ser explicado por los diferentes patrones de expresión de los efectores del sistema inmune. En este sentido, varios trabajos han demostrado un incremento del perfil de

secreción de citoquinas tipo Th2 en relación al tipo Th1 en un rango amplio de tumores (Clerici *et al.*, 1997; Santin *et al.*, 2000; El-Sherif *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004), y han identificado polimorfismos en regiones regulatorias de citoquinas que explicarían las variaciones inter-individuales en la expresión. Además, se ha demostrado en diversos estudios la asociación de ciertos polimorfismos citoquímicos con un peor pronóstico del cáncer cervical (Turner *et al.*, 1997; Stanczuk, 2001; Kim *et al.*, 2003; Kirkpatrick, 2004).

#### **1.4.3.1. El gen del Factor de Necrosis Tumoral alfa**

El gen *TNF- $\alpha$*  se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), posee cuatro exones, de los cuales el último codifica más del 80 % de la proteína secretada (Nedwin *et al.*, 1985; Pan *et al.* 2012). El Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) es una potente citoquina proinflamatoria, con una fuerte acción antiviral y antitumoral, por lo que posee un rol importante en el desarrollo de la respuesta inmune y por consiguiente juega un rol crítico en un amplio rango de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y neoplásicas (Bazzoni and Beutler, 1996; Beutler and Bazzoni, 1998). Es producido principalmente por monocitos/macrófagos activados, linfocitos T y NK, pero también por una amplia variedad de células como fibroblastos, células del músculo liso y células tumorales. Se ha demostrado que TNF- $\alpha$  está involucrado en el curso de la carcinogénesis a través de la inducción de la proliferación, la invasión y la metástasis de las células tumorales (Shishodia *et al.*, 2003). Además, se han detectado niveles altos de TNF- $\alpha$  en suero de pacientes con cáncer (Abrahamsson *et al.*, 1993), lo cual fue asociado con un peor pronóstico de la enfermedad (Nakashima *et al.*, 1998). Por lo tanto, los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  podrían contribuir a la patogénesis y a la progresión maligna del cáncer cervical. (Pan *et al.* 2012).

#### 1.4.3.1.1. Polimorfismos -238G/A y -308 G/A del gen *TNF- $\alpha$*

Varios trabajos han demostrado que el nivel de transcripción de esta citoquina está sumamente afectado por Polimorfismos de Nucleótido Simple localizados en la región promotora del gen. Uno de ellos se encuentra en la posición -308 (A/G) (dbSNP no. Rs 1800629), corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Kroeger *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997). Según Kroeger y col., el alelo menos frecuente (alelo A) duplica el nivel de transcripción del gen. Por otro lado, existe un sitio represor corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, que incluye la posición -238 (dbSNP no. Rs 361525). La sustitución de G por A en la posición -238, también podría afectar la expresión de *TNF- $\alpha$*  (Fong *et al.*, 1994). Se han realizados varios estudios de tipo caso-control en los cuales se sugiere la asociación de estos polimorfismos con la susceptibilidad al cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer nasofaríngeo y cáncer cervical (Deshpande *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2006; Pooja *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2011). En lo referente al cáncer cervical, la producción local e incrementada de *TNF- $\alpha$*  ha sido observada *in vivo* (Tjong *et al.*, 2001). Por ello, los cambios en los niveles de expresión de *TNF- $\alpha$*  pueden influir en la respuesta inmune a patógenos y contribuir a la susceptibilidad del individuo a la enfermedad.

Varios estudios demuestran que el genotipo AA de *TNF $\alpha$*  -308 G>A estaría asociado a un incremento en el riesgo de progresión de lesiones premalignas hacia un cáncer cervical invasor. (Sousa *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Zhang and Zhang., 2013) mientras que el polimorfismo -238G>A de este gen parecería estar asociado a una disminución significativa en el riesgo de desarrollo de la neoplasia cervical (Pan *et al.* 2012).

#### 1.4.3.2. El gen *Interleuquina-10*

El gen *IL-10* está localizado en el cromosoma 1(1q31-32) y está formado por 5 exones, los cuales abarcan aproximadamente 5 kb (Lopez et al, 2010). Interleuquina-10 (IL-10) es la citoquina anti-inflamatoria más importante encontrada dentro de la respuesta inmune humana, y es también conocida como factor inhibidor de síntesis de citoquinas (CSIF) (Lalani y col., 1997). Es una molécula pleiotrópica que tiene efectos sobre la inmunorregulación y la inflamación. Esta citoquina es producida principalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos Th2 CD4+, también se expresa en mastocitos, en un cierto subconjunto de células T activadas (Tc2, Tr1) y células B (Howard and O'Garra, 1992; Platzer *et al.*, 2000; Opal *et al.*, 1998), aunque no todas las células T reguladoras producen IL-10 (Moore *et al.*, 2001). La proteína es liberada por las células T citotóxicas para inhibir las acciones de las NK durante la respuesta inmune a la infección viral.

##### 1.4.3.2.1. Polimorfismo -1082 (G/A) de *IL-10*

Las células cancerosas producen un número de citoquinas y quimioquinas que tienen un efecto de supresión sobre las células inmunológicas. En varios pacientes con cáncer se ha demostrado que el nivel de citoquinas inmunosupresoras, como IL-10, es considerablemente más alto que el de citoquinas inmunoestimuladoras (Ortegel *et al.*, 2002; Luscher *et al.*, 1994; Barth *et al.*, 1996; Monti *et al.*, 2004). Las notables diferencias interindividuales detectadas en los niveles de IL-10, tanto con una producción constitutiva *in vivo*, como después de un estímulo celular *in vitro* (Westendorp *et al.*, 1997), sugieren que su producción se encuentra controlada genéticamente. (Turner *et al.*, 1997; Westendorp *et al.*, 1997). Se ha reportado un importante número de polimorfismos en la región promotora del gen de IL-10, algunos de ellos asociados a una producción diferencial de IL-10. Los más ampliamente

estudiados son tres polimorfismos de nucleótido simple localizados en las posiciones -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A), aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Platzer *et al.*, 1999). Se ha encontrado que el polimorfismo -1082 (G/A) (**dbSNP no. Rs 1800896**) es importante en la determinación de los niveles de producción de IL10. (Zoodma *et al.*, 2005). La asociación de los alelos -1082 G y A con una producción de citoquina baja (AA), media (GA) y alta (GG) fue demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* (Turner *et al.*, 1997; Eskdale *et al.*, 1998) Existen varios trabajos que han investigado la relación entre estos polimorfismos y la neoplasia cervical. Algunos de ellos, (Stanczuk *et al.*, 2001) encontraron una asociación entre este polimorfismo y el desarrollo de cáncer cervical, donde el genotipo AG otorgó una disminución en el riesgo de desarrollo de la enfermedad cervical en comparación con el genotipo AA. Mientras que otros estudios (Roh *et al.*, 2002) no encontraron asociación entre los polimorfismos de IL-10 y el riesgo de neoplasia cervical (Ni *et al.*, 2013).

#### **1.4.3.3. El Gen *Interferon-gama***

Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) es una citoquina soluble dimerizable, la cual a diferencia de interferon- $\alpha$  e interfeon - $\beta$ , es secretada por las células CD4<sup>+</sup> Th1, células CD8 citotóxicas, células Th0 y células natural killers activadas. Esta citoquina incrementa la respuesta inmune celular a través del aumento de la citotoxicidad de las células T y de la actividad de las células NK. (Tartour *et al.*, 1998). El gen que codifica a IFN- $\gamma$  se encuentra en el cromosoma 12 (12q24), abarca aproximadamente 5.4 kb y contiene 4 exones (Gangwar *et al.*, 2009). Este gen codifica una proteína lábil al ácido, la cual posee propiedades antivirales, inmunoregulatorias y antitumorales (Schroder *et al.*, 2004). Esta proteína altera la transcripción de más de 30 genes, produciendo una variedad de respuestas fisiológicas y celulares. La unión de IFN- $\gamma$  a los receptores IFNGR1 e IFNGR2 activa la vía de JAK-STAT por fosforilación de Jak, y de este modo

activa al factor de transcripción STAT (Horvath CM., 2004). La vía de JAK-STAT es la vía de señalización de IFN más aceptada y la mejor caracterizada (Gough *et al.*, 2008). Además, IFN- $\gamma$  activa a las células presentadoras de antígeno APCs y promueve la diferenciación a Th1 mediante la regulación positiva del factor de transcripción y la inhibición del desarrollo de las células Th2 (Oriss *et al.*, 1997). La inmunidad celular tipo 1 juega un rol crítico en la defensa del hospedador contra el desarrollo tumoral y la infección viral (Ikeda *et al.*, 2002). La estimulación de los macrófagos con IFN- $\gamma$  induce mecanismos antimicrobianos y antitumorales directos, así como vías de presentación y procesamiento de antígeno. Así, altos niveles de producción de IFN- $\gamma$  están asociados con una defensa efectiva del hospedador contra infecciones virales como el HPV. En pacientes con cáncer cervical, la disminución de la expresión intratumoral de IFN- $\gamma$  ha sido asociada a un peor pronóstico de la enfermedad (Tartour E. *et al.*, 1998; Gangwar *et al.*, 2009).

#### **1.4.3.3.1. Polimorfismo +874 T/A del gen *IFNG***

Existe un Polimorfismo de Nucleótido Simple en el primer intron del gen *IFN- $\gamma$* , en el extremo 5' cercano a una región de repetición CA, en la posición +874 (T/A) (**dbSNP no. Rs 2430561**). Los polimorfismos en este gen han sido asociados con una producción diferencial de INF y por lo tanto tendrían importancia biológica. El alelo +874T se correlaciona con una alta producción de IFN, mientras que el alelo +874A se asocia a una baja producción de IFN en respuesta a un estímulo. Esto es debido a que la secuencia de ADN que contiene el alelo T es el sitio específico de unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual transcribe el gen para la producción de interleuquina (Pravica *et al.*, 2000; Schena *et al.*, 2006). Debido a los bajos niveles de expresión de INF- $\gamma$  asociados con el alelo +874 A, el polimorfismo +874 de este gen fue asociado

con la susceptibilidad y la progresión de una variedad de enfermedades. Diversos trabajos investigaron el rol de este polimorfismo en el riesgo de desarrollo de diferentes tipos de cánceres, como ser cáncer de mama (Scola *et al.*, 2006; Kamali-Sarvestani *et al.*, 2005; Gonullu *et al.*, 2007), melanoma maligno (Nikolova *et al.*, 2007; Howellet *et al.*, 2003) y cáncer de cuello uterino (Kordi Tamandani *et al.*, 2008; Govan *et al.*, 2003), sin embargo los resultados no son concluyentes. En lo referente al cáncer cervical, existen trabajos que encontraron una asociación significativa entre el polimorfismo +874 de INF- $\gamma$  y el desarrollo de la enfermedad (Lai *et al.*, 2005; Gangwar *et al.*, 2009; Mi *et al.*, 2011). Así, Gangwar y col. demostraron que tanto el genotipo homocigota AA como el alelo A estaban significativamente sobrerrepresentados en pacientes con CIN, en comparación con los controles sanos. Sin embargo, otros trabajos no encontraron asociación cuando evaluaron el rol de este polimorfismo tanto en la predisposición como en el desarrollo del cáncer cervical y sus lesiones precursoras (Govan *et al.*, 2003; do Carmo Vasconcelos de Carvalho *et al.*, 2012).

#### **1.4.4. Polimorfismos de nucleótido simple y genes de reparación del ADN**

La inestabilidad genómica es una característica de los tumores malignos y es particularmente común en los cánceres de origen epitelial (Klausner, 2002). Este fenómeno se origina en los estadios tempranos de la neoplasia cervical y puede ser detectado aún en lesiones premalignas (Duensing and Münger, 2003; Duensing and Münger, 2004). La presencia de múltiples mutaciones en el genoma celular puede contribuir de manera importante a la rápida selección clonal de poblaciones que son capaces de sobrepasar los obstáculos ambientales durante la progresión carcinogénica. Las oncoproteínas de los VPH oncogénicos son capaces de doblegar los mecanismos regulatorios de las células hospedadoras (Cahil, 1999). Por lo tanto, la inestabilidad genómica puede ser un mecanismo adicional que incrementa la plasticidad del genoma

celular y facilita la evolución de poblaciones celulares que garantizan una persistencia viral de largo plazo. Evidencias recientes indican que algunas funciones de reparación del ADN son haplo-insuficientes, apoyando la idea de que ciertas variantes en las secuencias de los genes de reparación del ADN forman parte de los defectos que contribuyen al riesgo de desarrollo del cáncer (Cui *et al.*, 1999; Goode *et al.*, 2002). En este sentido, los sistemas de reparación del ADN son los componentes críticos en la respuesta individual a la exposición a factores ambientales agresivos. En algunos casos, y para ciertos tipos de cáncer, se han asociado determinadas mutaciones en genes de reparación del ADN con cambios fenotípicos obvios (ej., *hMHL1* en cáncer colorrectal). Sin embargo, es más probable que el cáncer sea producto de una combinación singular de variantes de reparación del ADN, que no causen efectos celulares abruptos (de Boer, 2002; Ruttan and Glickman, 2002).

#### **1.4.4.1. El Gen *XRCC1***

La exposición a diferentes mutágenos y carcinógenos, tanto endógenos como exógenos, puede resultar en diversos tipos de daños en el ADN. Estas alteraciones, si no son reparadas, pueden causar inestabilidad genética, mutagénesis y cáncer. Para contrarrestar las consecuencias deletéreas de los agentes que dañan el material genético, existen diversos sistemas de reparación del ADN que, en conjunto, se encargan de la mayoría de los daños provocados en la información genética de las células. La reparación de los diferentes tipos de daños en el ADN es importante para salvaguardar la integridad genómica (Smith *et al.*, 2003). Entre los principales mecanismos de reparación, el sistema de reparación por escisión de bases (BER) es la primer defensa contra las lesiones generadas por radiaciones ionizantes y agentes alquilantes fuertes, así como contra aquellas lesiones causadas por agentes endógenos que dañan el ADN (Seeberg *et al.*, 1995). De esta forma, los sistemas de reparación del ADN mantienen la

integridad genética, y sus defectos están asociados a diferentes tipos de enfermedades, incluyendo el cáncer. Se han descrito más de 130 genes de reparación del ADN (Wood et al., 2001). Entre ellos encontramos al gen *XRCC1*, el cual está localizado en el cromosoma 19 (19q13.2); consiste en 17 exones y codifica una proteína de 633 aminoácidos, denominada XRCC1 (Lindahl and Wood, 1999). XRCC1 es una proteína esencial, involucrada en el sistema de reparación por escisión de bases y en el sistema de reparación de rupturas de cadena simple. Esta proteína no tiene actividad enzimática aparente, actúa como puente para otras proteínas de reparación del ADN, como ser AP endonucleasa humana (APE1), ADN polimerasa b, ADN ligasa III, polinucleótido quinasa, y poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARP) (Whitehouse et al., 2001). La pérdida de XRCC1 resulta en una disminución de la estabilidad genómica, incluyendo el aumento de las frecuencias de traslocaciones y deleciones cromosómicas espontáneas o inducidas (Hung, et al, 2005).

#### **1.4.4.1.1. Polimorfismos *Arg194Trp* y *Arg399Gln* del gen *XRCC1***

Existen más de 60 polimorfismos de nucleótido simple validados para este gen, de los cuales aproximadamente 30 variantes están localizadas en exones o en regiones promotoras. Dos de estos polimorfismos, con cambios no sinónimos, presentan una frecuencia relativamente alta, y son los más estudiados: *Arg194Trp* en el exón 6 (dbSNP no. rs1799782), y *Arg399Gln* en el exón 10 (dbSNP no. rs25487) (Hung, et al, 2005). El polimorfismo *Arg194Trp* se encuentra en una región “conectora” relacionando los dominios que interactúan con PARP y ADN polimerasa b. La variante *194Arg* (alelo C) y el genotipo *Arg194Arg* (homocigota CC) han sido asociados con una menor sensibilidad in vitro a la bleomicina y al benzo(a)pireno diol epoxide (Wang et al., 2003). En lo referente al polimorfismo *Arg399Gln*, el alelo *399Gln* está

localizado en el extremo carboxilo terminal del dominio de interacción con la poliadenosin difosfato-ribosa polimerasa. Fue asociado con niveles más altos de aductos de ADN provocados por la aflatoxina B1 y mayor sensibilidad a la bleomicina (Wang *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 1999; Matullo *et al.*, 2001). A pesar que el efecto biológico exacto de estos SNPs no ha sido completamente caracterizado, se puede pensar que las sustituciones de aminoácidos podrían provocar alteraciones sutiles en la estructura y función de las enzimas de reparación, alterando de esta manera la interacción de XRCC1 con otras enzimas y por consiguiente su capacidad de reparación. Estos polimorfismos podría afectar, de esta manera, la susceptibilidad individual al desarrollo de diversas enfermedades, como el cáncer. Un amplio número de estudios de epidemiología molecular han asociado a los polimorfismos en el gen XRCC1 tanto con un aumento, como con una disminución del riesgo de desarrollo de cáncer, dependiendo del tipo de cáncer y de la etnia de la población estudiada. De esta manera, se ha reportado asociación con cáncer de pulmón (David-Beabes *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Divine *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2004), cáncer pancreático (Duell *et al.*, 2002), cáncer de próstata (van Glis *et al.*, 2002), cáncer de mama (Duell *et al.*, 2001) y cáncer cervical (Niwa *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012).

#### **1.4.5. Polimorfismos de nucleótido simple en genes asociados a la vía apoptótica**

La apoptosis es un proceso fisiológico que regula la muerte celular, y varía en los diferentes tejidos y organismos. Ocurre durante el desarrollo embrionario, la metamorfosis y la diferenciación, y juega un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis (Zörnig *et al.*, 2001.). Existe gran cantidad de evidencia que sugiere que la regulación anormal de la apoptosis podría contribuir a la patogénesis de una variedad de enfermedades, incluido el cáncer (Thompson, 1995). La capacidad de resistir al estímulo apoptótico y las alteraciones genéticas en los componentes de las vías

apoptóticas son mecanismos esenciales en el desarrollo de diversas neoplasias (Evan and Vousden, 2001; Lowe and Lin, 2000).

El sistema Fas/FasL juega un rol fundamental en el control de la apoptosis y el mantenimiento de la homeostasis celular. Se han identificado polimorfismos en regiones regulatorias de estos genes (*FAS* (-670A/G) y *FASL* (+877)) que provocarían variaciones en la expresión de los mismos, las que tendrían un papel fundamental en el inicio y la progresión de distintas neoplasias.

#### **1.4.5.1. Los Genes *FAS* y *FASL***

El gen *FAS* está localizado en el cromosoma 10q24.1, y comprende 9 exones y 8 intrones. Codifica una proteína transmembrana Tipo 1 con tres dominios extracelulares ricos en cisteína (exones 1-3), un dominio transmembrana (exón 6), y tres dominios intracelulares (exones 7-9) (Itoh and Nagata, 1993). Esta proteína denominada FAS, conocida también como TNFRSF6/CD95/APO-1, es un receptor de la superficie celular involucrado en la señalización de la apoptosis en muchos tipos celulares (Muschen et al., 2000.).

Los receptores que tienen la capacidad de desencadenar la vía extrínseca de apoptosis son llamados “receptores de muerte”, e involucran miembros de la super familia del Receptor TNF (TNFR6/Fas/Apo-1, TNFR1, TNFR2, DR3, DR4, DR5) (Ashkenazi and Dixit, 1998). Los análisis de expresión revelaron que FAS se expresa en la superficie celular de fibroblastos, células mieloides y células T linfoblastoides. En estudios posteriores fue identificado el ligando que desencadena la apoptosis, unido al receptor FAS sobre la superficie de un hibridoma de célula T citotóxica. FAS ligando (FASLG), también conocido como TNFSF6/CD95LG, es un miembro de la superfamilia del

Factor de Necrosis Tumoral, que puede desencadenar la cascada de muerte celular por apoptosis, mediante interacción con su receptor FAS (Houston and O'Connell, 2004). Este gen se encuentra sobre el cromosoma 1 (1q23), consiste en aproximadamente 8 kilobases y está dividido en 4 exones. La unión de FASL a su receptor ocurre por contacto célula-célula e induce la trimerización del Receptor de Fas en la membrana celular (**Figura 12**). La interacción de Fas/FasL promueve la formación de un complejo citoplasmático, llamado complejo inductor de muerte (*death inducing signaling complex*, o DISC) (Kischkel, et al 1995). Con la trimerización de FAS, los dominios de muerte tienden a agregarse, y permiten el reclutamiento de una proteína adaptadora citoplasmática, la proteína asociada al dominio de muerte de FAS (FADD). FADD también posee un dominio efector de muerte (DED), que interacciona con el dominio de muerte de FAS, promoviendo el reclutamiento de la pro-caspasa 8 y su activación mediante autoclivaje (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). De esta manera se desencadena una cascada de proteasas por varios miembros de la familia de las caspasas. Finalmente, la degradación del ADN y la digestión enzimática de varios blancos celulares llevarán a la muerte celular (Elmore, 2007). De esta manera la vía de FAS/FASL juega un rol crucial en la regulación de la apoptosis y el mantenimiento de la homeostasis celular. Varios estudios han demostrado que la desregulación de esta vía lleva no solo a la reducción de la expresión de FAS, sino también a una expresión aberrante de FASL en una variedad de tumores (Loro et al, 1999; Muraki et al, 1999; Sundelin et al, 1997; Gastman et al., 1999; Zhang et al., 2006)



rs5030772). El polimorfismo FASL -844 C/T está localizado en un motivo de unión para el factor de transcripción CAAT/enhancer-binding protein beta. El alelo -844 C puede aumentar la expresión basal de FASL comparado con el alelo -844 T (Wu *et al.*, 2003). De esta manera, al influenciar la expresión génica y desregular las vías de señalización de muerte celular, estos polimorfismos pueden contribuir a la carcinogénesis (Sibley *et al.*, 2003).

Ambos polimorfismos en los genes *FAS* y *FASL* han sido asociados en numerosos estudios tanto con enfermedades autoinmunes (Goodman *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1999), como con diversos tipos de cáncer, como ser cáncer de esófago (Sun *et al.*, 2004), cáncer de pulmón (Wang *et al.*, 2003) y cáncer cervical (Ueda *et al.*, 2005; Kordi Tamandani *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2003).

# ***Hipótesis y Objetivos***

## **2.1. Hipótesis**

Los datos epidemiológicos han mostrado que las tasas de incidencia y prevalencia de infección por VPH en la población general presentan gran variabilidad, y una infección persistente con un tipo de VPH oncogénico puede resultar en el desarrollo de neoplasias, las que al cabo de muchos años sin mediar tratamiento, pueden concluir con la aparición de un cáncer invasor. La mayoría de las infecciones virales son eliminadas por el sistema inmune, sin embargo una predisposición genética podría explicar por qué algunas persisten e inducen cáncer. Esto sugiere que el potencial de los agentes carcinogénicos puede ser modificado por pequeños polimorfismos genéticos en el hospedador, cada uno de ellos otorgando un riesgo pequeño o moderado.

El cáncer de cuello uterino es la rara consecuencia de la infección por ciertos tipos oncogénicos de VPH que afectan las mucosas. A pesar de que en Argentina y en otros países en desarrollo la prevalencia de la infección por VPH alcanza valores elevados, el cáncer cervical sólo afecta a una pequeña proporción (menos del 1%) de las mujeres infectadas. Bajo esta perspectiva es lógico pensar que la persistencia de la infección viral y la posibilidad de transformación celular en el epitelio cervical dependerán en gran medida de la habilidad del hospedador para resolver la infección por VPH.

Para que el VPH pueda establecer una infección persistente debe encontrar un ambiente propicio, en donde diferentes sistemas sean permisivos al ingreso y establecimiento del virus en las células. Por otra parte, debe existir cierta combinación de factores que aumenten o disminuyan el riesgo de transformación celular maligna. En este sentido y en lo que respecta al hospedador, pequeñas variaciones en receptores celulares, en genes que codifican moléculas que intervienen en la inmunidad inespecífica o específica, en genes supresores de tumor (blanco de las oncoproteínas virales) o en los sistemas de reparación podrán modular la respuesta final a la infección. En última instancia, las pequeñas variaciones en el genoma, responsables de un aumento pequeño o moderado

del riesgo, podrían explicar una fracción importante de la susceptibilidad cuando son consideradas en conjunto.

## **2.2. Objetivos**

El objetivo del presente trabajo es determinar la asociación entre el componente genético y la infección por el virus del Papiloma Humano, así como la susceptibilidad al desarrollo de cáncer cervical. Esto se logrará a partir del estudio de una serie de marcadores genéticos que operan bajo el modelo de baja penetrancia, en un estudio de tipo caso-control a gran escala.

Los objetivos específicos perseguidos pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Determinación de la prevalencia de la infección por VPH en muestras cervicales normales, lesiones intraepiteliales y en carcinomas cervicales.
2. Determinación de la prevalencia de los distintos tipos de VPH en las muestras analizadas.
3. Identificación y validación de nuevos polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en genes que codifiquen moléculas involucradas en el proceso de la infección viral y la transformación celular maligna en el cáncer cervical.
4. Identificación de polimorfismos que otorguen susceptibilidad al desarrollo del cáncer cervical.
5. Estimación del riesgo relativo para el desarrollo de la neoplasia cervical en función de la infección del VPH y cada uno de los polimorfismos propuestos.
6. Aumentar la exactitud en la determinación del pronóstico de una mujer VPH positiva según su perfil genético.
7. Desarrollo de metodologías accesibles para la genotipificación de aquellos SNPs asociados a la infección por VPH y la progresión de la enfermedad cervical (PCR-RFLP, ASO-PCR, Pirosecuenciación, etc).

# ***Materiales y Métodos***

### **3.1. Grupo de Estudio**

Se analizaron un total de 512 muestras cervicales, obtenidas de mujeres de la ciudad de La Plata. Las muestras estudiadas corresponden a un banco anónimo de muestras cervicales, que fueron obtenidas bajo las normativas éticas vigentes en el marco de otros proyectos previamente ejecutados, y en convenio con reparticiones del Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires. Las mismas se encuentran resguardadas en el Instituto de Genética Veterinaria “Ingeniero Fernando Noel Dulout” (IGEVET, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP). La totalidad de las muestras presentan diagnóstico cito/histopatológico establecido, de acuerdo a los parámetros del sistema Bethesda. En la tabla 1 se describe la agrupación de las muestras en base a su diagnóstico cito/histopatológico. El diagnóstico definitivo de todas las muestras con citología anormal fue realizado por histología.

La edad media de los pacientes estudiados fue de 37,3 años ( $\pm 10,8$ ), con un rango de edad comprendido entre los 15 y los 73 años. El promedio de edad de los pacientes con carcinomas fue de 44,6 años, mientras que para el grupo normal la media fue de 38,6 años. El grupo de pacientes con Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado tuvo el menor promedio de edad, reportando 31 años, mientras que para el grupo de pacientes con Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado la edad media fue de 32 años.

**Tabla 1-** Descripción del tamaño muestral para cada estadio cito/histológico.

<b>Grupo</b>	<b>Nº</b>
<b>Papanicolaou I/II</b>	200
<b>Lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL)</b>	100
<b>Lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL)</b>	72
<b>Carcinomas de células escamosas (SCC)</b>	140
<b>Total</b>	512

### **3.2. Tipos de muestras**

**Citología exfoliativa:** el sedimento celular fue recogido por citobrush o espátula de Ayre, resuspendido en 5 ml de PBS con 0,05% de Mertiolate en tubos estériles, y conservado a 4°C hasta su procesamiento (dentro de las 24 hs).

**Biopsias embebidas en parafina:** se utilizó de una a tres secciones de 10µm de tejido incluido en parafina. Se procedió a la desparafinización mediante 3 lavados con xilol a 56°C durante 30 min. cada uno. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 500 µl de etanol 100% y dos lavados con etanol 70%. Finalmente, se dejó secar el tejido al aire, siendo procesado dentro de las 24 hs.

### **3.3. Extracción y Purificación del ADN**

Los sedimentos celulares obtenidos de las muestras fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 5 minutos, resuspendidos y lavados con 1ml de PBS e incubados durante 24 hs. a 56° C en 400 ml de buffer de extracción (50 mM Tris-ClH pH 8,5; 1 3 1 mM EDTA; 1% Triton X100 y 0,5% Tween 20) y 250 mg/ml de proteinasa K (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, se inactivó la proteinasa K por incubación a 100° C durante 10 minutos. La purificación del ADN se realizó por medio de precipitación directa de las proteínas por la metodología de “Salting out” (Miller *et al.*, 1988). Se emplearon 5 ul del ADN purificado para las reacciones de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### **3.4. Detección del Genoma del VPH**

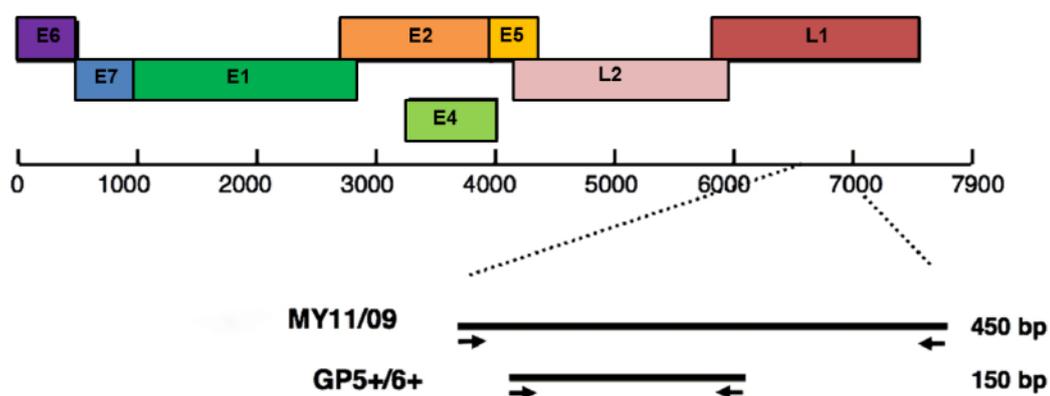
La detección del genoma del VPH se realizó por PCR, utilizando un protocolo anidado, con los oligonucleótidos My 09/11 como cebadores externos en la primera ronda de

amplificación y Gp5+/Gp6+ como cebadores internos en la segunda ronda de amplificación (Jacobs *et al.*, 1997). El cebador Gp6+ fue biotinilado en su extremo 5' (Gp6+Bio) para permitir la realización de la técnica de PCR-Enzima Inmuno Ensayo (PCR-EIA) que se utilizó para la genotipificación del VPH (Véase más adelante).

Los cebadores Gp 05+/06+ definen un fragmento de 145-150 pb, correspondiente a la región L1 del virus. Este conjunto de cebadores permite la genotipificación de un amplio espectro de tipos virales del VPH.

**Tabla 2-** Secuencia de los oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR para la amplificación del genoma viral. M= A, C; R= A, G; W=A, T; Y=C, T.

CEBADOR	SECUENCIA	AMPLICON
<b>My/09</b>	5' - CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC -3'	450 pb
<b>My/11</b>	5' - GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG -3'	
<b>Gp5+</b>	5' - TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC -3'	150 pb
<b>Gp6+ Bio</b>	5' - GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3'	



**Figura 13-** Representación del genoma del VPH 16 y ubicación de los cebadores específicos.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando 3µl (1ng/µl) de los plásmidos conteniendo los clones correspondientes a cada tipo del VPH (como controles positivos) o 5µl del ADN extraído de las muestras. Las reacciones de PCR para la primer ronda de amplificación se realizaron utilizando 5 µl de ADN en cada tubo; 3 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 160 µM de cada uno de los dNTPs; 0,15 pmol de cada cebador y 0,625 U de Taq DNA polimerasa (Inbio – Highway) en buffer de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 9; 50 mM KCl), en un volumen final de 25 µl. Los ciclos de amplificación fueron: 1 ciclo a 92°C durante 3 min como desnaturalización inicial, 20 ciclos de 30 seg a 92°C, 1 min y 30 seg a 50°C y 1 min a 72°C, con un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min.

La segunda ronda de PCR se realizó utilizando 5 µl del producto de amplificación de la reacción anterior, 2 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 160 µM de cada uno de los dNTPs, 0,375 pmol de cada cebador y 1 U de Taq DNA polimerasa (Inbio – Highway) en buffer de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 9; 50 mM KCl), en un volumen final de 50 µl. Los ciclos de amplificación fueron: 1 ciclo a 92°C durante 3 min como desnaturalización inicial, 35 ciclos de 30 seg a 92°C, 1 min a 46°C y 1 min a 72°C, con un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min.

La detección de los productos de amplificación se realizó por corrida electroforética en geles de agarosa al 2%, coloreados con SYBR-Safe™ (Invitrogen, USA), excitado con transiluminador de luz azul a 450 nm. (Safe Imager™ - Invitrogen, USA). Como controles positivos se utilizaron los ADN de los clones plasmídicos.

En cada reacción de amplificación se incorporaron controles negativos para el ADN-VPH cada once muestras estudiadas.

Para evitar la contaminación por arrastre se tomaron las precauciones necesarias entre las dos rondas de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando equipos

separados de insumos, reactivos y utilizando micropipetas automáticas con tips con filtros resistentes a los aerosoles.

### **3.5. Tipificación del Genoma del VPH**

La tipificación del genoma del VPH se efectuó mediante dos metodologías, el análisis del Polimorfismo Conformacional de Cadenas Simples en Solución de Baja Fuerza Iónica, protocolo denominado LIS-SSCP (*Low Ionic Strength Single Strand Conformational Polymorphisms*), y PCR Enzima Inmuno Ensayo (PCR-EIA).

#### **3.5.1. LIS-SSCP (*Low Ionic Strength Single Strand Conformational Polymorphisms*)**

El principio de esta técnica involucra la desnaturalización del ADN de doble cadena, obtenido de una amplificación por PCR anidada. El ADN de cadena simple es separado por electroforesis, en soluciones con baja fuerza iónica y en condiciones no desnaturalizantes. Ello permite que se formen estructuras secundarias o variantes conformacionales que, de acuerdo a su movilidad, producirán patrones de bandas diferenciales y repetibles (Maruya *et al.*, 1996). Con este propósito se diluyeron 4 µl de cada producto de amplificación en 10 µl de solución de siembra LIS (*Low Ionic Strength*, constituida por 10% sacarosa, 0,01% azul de bromofenol y 0,01% xilen cianol FF). Las muestras se desnaturalizaron durante 6 minutos a 94°C e inmediatamente se colocaron en hielo durante 2 minutos. Se sembraron y corrieron en minigeles de poliacrilamida al 10% (en una proporción acrilamida: bisacrilamida de 39:1) a temperatura constante de 4°C. La corrida electroforética fue llevada a cabo en solución TBE 1X (45 mM tris-borato / 1mM EDTA), a 45 mA durante 6 hs. En cada corrida se sembraron simultáneamente, como controles positivos, los productos amplificados de los patrones virales obtenidos a partir de clones plasmídicos de los genomas del HPV6,

11, 16, 18, 31 y 33. Para detectar el patrón de bandas obtenido en cada SSCP, los geles se colorearon por medio de una tinción rápida con nitrato de plata.

### **3.5.2. PCR- Enzima Inmuno Ensayo (PCR-EIA)**

Para confirmar los resultados obtenidos por LIS-SSCP, se recurrió al método PCR-EIA. Este ensayo combina la amplificación de la región L1 del VPH con los primers Gp5+ y Gp6+Bio, hibridación líquida de los amplicones con sondas marcadas con fluoresceína y un ensayo de tipo ELISA para la detección de los híbridos sonda-amplificado. El procedimiento fue realizado de acuerdo al método descrito por Jacobs y col., (1995), con algunas modificaciones.

#### **3.5.2.1. Protocolo de PCR-EIA**

##### ***Captura de los productos biotinilados***

- Se tapizaron microplacas Nunc™ con estreptavidina a una concentración de 5 mg/ml.
- Se agregaron 5 µL de los productos de PCR biotinilados en 100 µL de solución SSC 5X + 0,5% Tween 20.
- La placa fue cubierta con un film adherente e incubada a 37°C por 1 hora.

##### ***Desnaturalización del ADN***

- Se lavó tres veces la placa con solución SSC 0,5X + 0,5% Tween 20.
- El sobrante de líquido fue retirado mediante inversión de la placa en un papel absorbente, y se agregó 100 µL de NA(OH) a 0,2N.
- Se cubrió la placa y se dejó reposar durante 15 min. a temperatura ambiente.

##### ***Hibridación de las sondas***

Las sondas utilizadas para la hibridación correspondieron a regiones específicas del amplificado GP para cada tipo viral. Se utilizaron cuatro pocillos por muestra, con sondas que correspondieron a:

- A) VPH 6 y 11
- B) VPH 16
- C) VPH 18
- D) VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58.

En cada placa se incorporaron los controles positivos y negativos correspondientes. Las muestras que fueron positivas para el grupo de alto riesgo fueron sometidas a una segunda placa de PCR-EIA, esta vez con los tipos virales de alto riesgo discriminados individualmente. Para cada celda se agregaron 3 picomoles de cada sonda en solución 5x SSC + Tween 20 al 0,5%. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se encuentran detalladas en la **tabla 3**.

**Tabla 3**-Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de VPH por PCR-EIA.

<b>VPH</b>	<b>Secuencias</b>
<b>6</b>	5'-ATCCGTA ACTACATCTTCCACATACACCAA-3'
<b>11</b>	5'-ATCTGTGTCTAAATCTGCTACATACTAA-3'
<b>16</b>	5'-GTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGA-3'
<b>18</b>	5'-TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA-3'
<b>31</b>	5'-TGTTTGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATAC-3'
<b>33</b>	5'-TTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTAC-3'
<b>35</b>	5'-GTCTGTGTGTTCTGCTGTGTCTTCTAGTG-3'
<b>39</b>	5'-TCTACCTCTATAGAGTCTTCCATACCTTCT-3'
<b>45</b>	5'-ACACAAAATCCTGTGCCAAGTACAT-3'
<b>51</b>	5'-AGCACTGCCACTGCTGCGGTTTCCCAACA-3'
<b>52</b>	5'-TGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAA-3'
<b>56</b>	5'-GTACTGCTACAGAACAGTTAAGTAAATATG-3'
<b>58</b>	5'-ATTATGCACTGAAGTAACTAAGGAAGGTAC-3'

- La microplaca fue lavada tres veces con 400  $\mu$ L de 0,5X SSC + 0,5% Tween 20%. El exceso de líquido fue removido por inversión de la placa en papel absorbente.
- Se agregaron 100  $\mu$ L de la solución de sondas con 5x SSC, Tween 20 0,5%
- La placa fue sellada y la incubación se realizó entre 15 y 30 min a 55°C.

#### ***Detección de los híbridos***

- La placa fue lavada tres veces con solución SSC a 0,5X; 0,5% Tween 20, el exceso de solución fue removido mediante inversión de la placa en papel absorbente.
- Se agregaron los anticuerpos anti-fluoresceína a una concentración de 1/1000, y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente.
- Se agregó revelador TMB™ (solución de anticuerpo marcado con enzima y sustrato) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente.
- La reacción fue bloqueada con 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M y el cambio de color fue medido con lector de ELISA a OD<sub>450nm</sub> utilizando un filtro de interferencia de 600 nm (BioRad Microplate Reader 550).

#### ***Interpretación de los resultados y cálculo de valor de corte (Cut-off)***

El valor de *cut-off* fue calculado como tres veces el desvío estándar del OD obtenido a partir de cuatro controles negativos, que bajo las condiciones presentes fue de OD<sub>450nm</sub> 0,1. Las muestras que presentaron OD<sub>450nm</sub> > 0,1 fueron consideradas VPH positivas.

Los genomas plasmídicos utilizados como controles de la técnica de PCR-EIA y los patrones de las muestras en los geles de SSCP han sido generosamente donados por la Dra. De Villers (Deutsches Krebsfor-schungszentrum, Alemania, tipos VPH-6, -11, -16, -18, -33) y el Dr. Ort (Instituto Pasteur, Paris, Francia, VPH-11 y -34). Para el resto de

los controles positivos de VPH se utilizó ADN de muestras cervicales positivas en donde los tipos virales se determinaron por secuenciación.

### 3.6. Análisis de los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs)

Para el análisis de los polimorfismos en estudio se utilizó la técnica de PCR, seguida por la genotipificación de los SNPs mediante dos metodologías: Pirosecuenciación y PCR-RFLP. En las **tablas 4 y 5** se resume la metodología empleada para la caracterización de cada SNP.

**Tabla 4-** Metodología utilizada en el análisis de los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs).

METODOLOGÍA	METODO DE DETECCIÓN	GEN	SNP	AMPLICON	ENZIMA
PCR-RFLP	Electroforesis en minigeles de poliacrilamida 8%.Tinción con SYBR-Safe I®	XRCCI	<b>codón 399</b> <i>Arg/Gln</i>	fragmento de 100 pb	MspI (37°C por 5 hs)
			<b>codón 194</b> <i>Arg/Trp</i>	fragmento de 155 pb	MspI (37°C por 5 hs)
		TNF- $\alpha$	<b>Nucleótido - 308 (G/A)</b>	Fragmento de 90 pb	BstnI (60° C por 5 hs)
			<b>Nucleótido - 238 (G/A)</b>	Fragmento de 137 pb	MspI (37° C por 5 hs)
		FAS	<b>Nucleótido -670 (G/A)</b>	fragmento de 182 pb	BstnI (60° C por 5 hs)

**Tabla 5-** Metodología utilizada en el análisis de los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs). Continuación.

METODOLOGÍA	METODO DE DETECCIÓN	GEN	SNP	AMPLICON
PIROSECUENCIACIÓN	La lectura automática de cada SNP se realizó utilizando el programa PSQ®96SNP.	FASL	Nucleótido -844 (T/C)	Fragmento de 100 pb
		IL-10	Nucleótido -1082 (G/A)	Fragmento de 176 pb
		P53	codón 72 <i>Arg/Pro</i>	Fragmento de 166 pb
		RNASEL	codón 462 <i>Arg/Gln</i>	Fragmento de 110 pb
		INFG	Nucleótido +874 (T/A)	Fragmento de 274 pb

### 3.6.1. Amplificación de los SNPs mediante PCR

El par de cebadores específico para la amplificación de cada polimorfismo fue diseñado a partir de la secuencia del gen correspondiente, obtenida de la base de datos de secuencias genéticas del National Institutes of Health (NIH), denominada GenBank® y utilizando la herramienta bioinformática de alineamiento de secuencias BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), así como el programa informático de diseño de cebadores FastPCR™. Asimismo, la información correspondiente a cada SNP se obtuvo de la base de datos de Polimorfismos de Nucleótido Simple (dbSNP) desarrollada por el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Tabla 6-** Secuencias de oligonucleotidos utilizados en las reacciones de PCR, para la amplificación de los SNPs en estudio.

GEN	SNP	SECUENCIA	AMPLICON
FAS	Nucleótido -670 (A/G) rs1800682	F 5'-CTA CCT AAG AGC TAT CTA CCG TTC-3'	182 pb
		R 5'-GGC TGT CCA TGT TGT GGC TGC-3'	
XRCC1	Arg194Trp rs1799782	F 5'-CAA GCT TGG CCA GTT CCG TG-3'	155 pb
		R 5'-ACC CAC GAG TCT AGG TCT CAA CC-3'	
	Arg399Gln rs25487	F 5'-GCA TCG TGC GTA AGG AGT G-3'	100 pb
		R 5'-CAG GAT AAG GAG CAG GGT TGG CGT -3'	
TNF- $\alpha$	Nucleótido - 238 (G/A) rs361525	F 5'-GAA GAC CCC CCT CGG AAC-3'	137 pb
		R 5'- GTA GTG GGC CCT GCA CCT TCT G-3'	
	Nucleótido - 308 (G/A) rs1800629	F 5'-AAA AGA AAT GGA GGC AATAGG TTT TGA GGG GCC TG- 3'	90 pb
		R 5'-CTT CTG GGC CAC TGA CTG ATT TGT GTG TAG GAC AC -3'	
P53	Codón 72 Arg/Pro rs1042522	F 5'- TCC CCC TTG CCG TCC CAA -3'	166 pb
		R 5'- CTG GTG CAG GGG CCG CCG GTG TAG - 3'	
RNASEL	codón 462 Arg/Gln rs486907	F 5' - GTG TCA CCC TCT GTG AGC AGA C -3'	162 pb
		R 5' - GCA GAT CCT GGT GGG TGT ATC C - 3'	
INFG	Nucleótido +874 (T/A) rs2430561	F 5' -TCGTTGCTCACTGGGATTTTGAAG - 3'	274 pb
		R 5' -GTTCCAAACATGTGCGAGTG -3'	
IL10	Nucleótido -1082 (G/A) rs1800896	F 5' - GAG CAA CAC TCC TCG CCG CAA - 3'	178 pb
		R 5' - TGG AGG CTG GAT AGG AGG TCC CTT AC -3'	
FASL	Nucleótido -844 (T/C) rs763110	F 5'-CTG CTA CAC CCA CTT TAG AAA TTA GA -3'	100 pb
		R 5'- GGG CAA ACA ATG AAA ATG AAA ACA TTG -3'	

Las reacciones de amplificación para el análisis de los polimorfismos en los genes *INFG*, *IL10*, *FASL*, *FAS*, *P53* y *RNASEL* fueron realizadas en un volumen final de 50 ul, mientras que para los polimorfismos en los genes *TNF* y *XRCC1* se utilizó un volumen final de 25 ul. La tabla 7 resume el protocolo utilizado para cada reacción de amplificación por PCR. Los protocolos de ciclado para cada reacción de amplificación se muestran en la tabla 8.

**Tabla 7-** Protocolos de amplificación por PCR para el análisis de cada SNP.

	TNF -238	TNF -308	IL10 -1082	FAS -670	FASL -844	P53 c.72	RNaseL c.462	XRCC1 194	XRCC1 399	INFG +874
<b>dNTPs</b>	0,2mM	0,2 mM	0,14mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2mM	0,2 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,5 mM	1,35mM	0,75mM	3 mM	3 mM	2,7 mM	2 mM	1,2 mM	1,2 mM	2 mM
<b>Buffer</b>	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
<b>Primer</b>	0,5 pmol/ul	0,75 pmol/ul	0,3 pmol/ul	0,5 pmol/ul	0,6 pmol/ul	0,65 pmol/ul	0,5 pmol/ul	0,85 pmol/ul	1 pmol/ul	0,5 pmol/ul
<b>ADN</b>	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul	5 ul
<b>Taq</b>	0,75 U	0,75 U	1 U	0,75 U	0,75 U	0,75 U	0,75U	0,75U	0,75U	1,25U
<b>BSA</b>	-	-	-	9 mM	9 mM	-	-	-	-	9mM
<b>VOL F</b>	25 ul	25 ul	50 ul	50 ul	50 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	50 ul

La detección de los productos de amplificación se realizó por corrida electroforética en minigeles de poliacrilamida al 8% (en una proporción acrilamida: bisacrilamida de 19:1) a temperatura ambiente, coloreados con SYBR-Safe® (Invitrogen, USA), y visualizados con transiluminador de luz azul a 450 nm (Safe Imager™ - Invitrogen, USA).

**Tabla 8-** Protocolos de ciclado para las reacciones de amplificación por PCR.

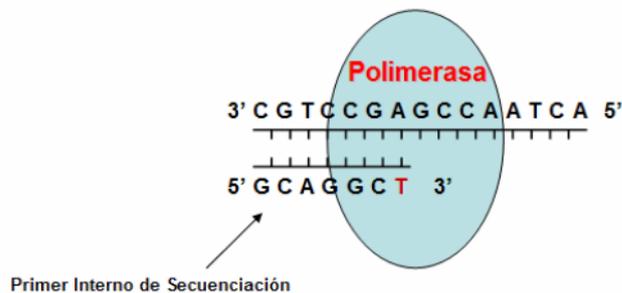
	Ciclos	TNF -238	TNF -308	IL10 -1082	FAS -670	FASL -844	P53 c.72	RNaseL c.462	XRCC1 194	XRCC1 399	INFG +874
Desnaturalización inicial	1	92°C 3 min.									
Desnaturalización	35	92°C 30''	92°C 30''	92°C 30''	92°C 40''	92°C 30''	92°C 30''	92°C 30''	92°C 30''	92°C 30''	92°C 30''
Annealing		62°C 40''	65°C 40''	64°C 15''	62°C 40''	57°C 40''	63°C 40''	61 °C 40''	60°C 50''	59°C 40''	65,5°C 40''
Extensión		72°C 40''	72°C 30''	72°C 15''	72°C 40''	72 °C 25''	72°C 40''	72 °C 40''	72°C 40''	72°C 40''	72°C 40''
Extensión final	1	72 °C 5 min.									

### 3.6.2. Genotipificación de SNPs por Pirosecuenciación

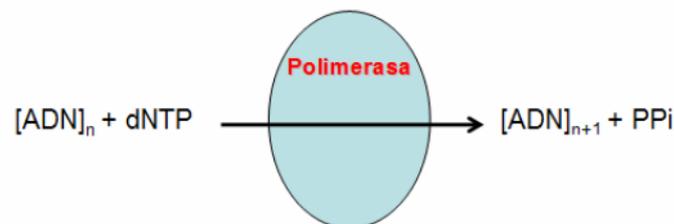
Para la genotipificación de los polimorfismos en los genes p53, FASL, INFG, IL 10 y RNase L, se empleó el método de pirosecuenciación. Esta tecnología se basa en la detección de la formación de pirofosfato durante la reacción de polimerización del ADN. El pirofosfato producido durante dicha reacción es convertido en ATP, el cual es utilizado por una luciferasa para convertir la luciferina en oxiluciferina. Por cada adición de un nucleótido en el proceso de extensión de la polimerización de ADN, se genera emisión de luz (Nordström *et al.*, 2000). La intensidad de luz generada es proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados.

La reacción de Pirosecuenciación se encuentra detallada a continuación:

**PASO 1:** El cebador interno de secuenciación se hibrida con una de las cadenas del amplicón de PCR, que sirve como molde, y se incuba con las enzimas ADN Polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa, así como con los sustratos, adenosina 5' fosfosulfato (APS) y luciferina.

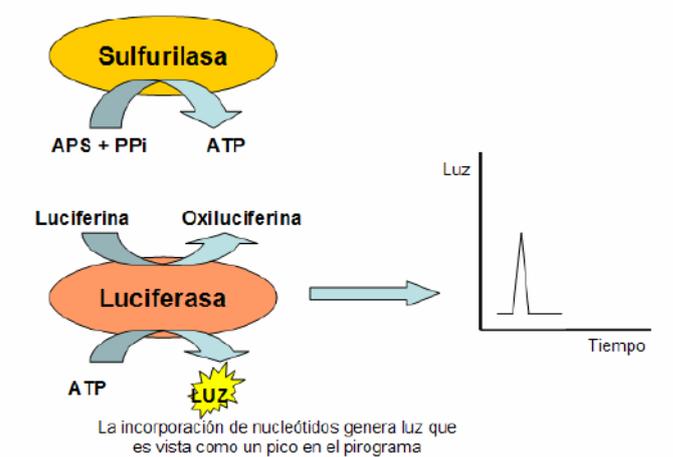


**PASO 2:** La ADN Polimerasa cataliza la incorporación del primer dNTP a la cadena de ADN si éste es complementario a la base de la cadena molde. Cada incorporación es acompañada por la liberación de un pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad del nucleótido incorporado.

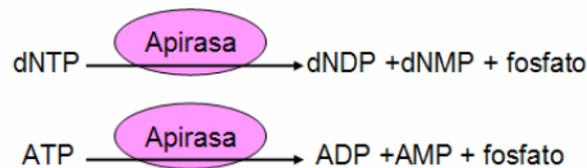


**PASO 3:** La ATP sulfurilasa convierte el PPi en ATP en presencia de adenosin 5' fosfosulfato (APS). Este ATP conduce la conversión, mediada por la luciferasa, de la luciferina a oxiluciferina, que genera luz visible en cantidades proporcionales al ATP

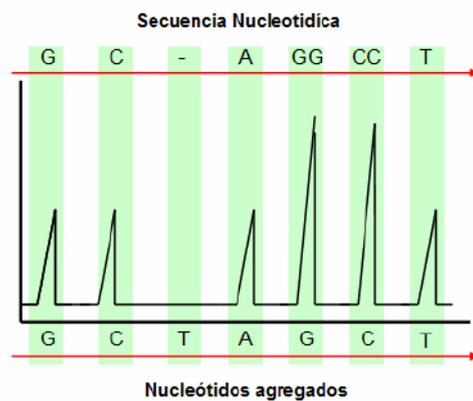
presente. La luz producida en la reacción catalizada por la luciferasa es detectada por un dispositivo y es vista como un pico en el pirograma. La altura de cada pico (señal de luz) es proporcional al número de nucleótidos incorporados.



PASO 4: La apirasa continuamente degrada los nucleótidos no incorporados así como el ATP. Cuando la degradación se completa, otro nucleótido se agrega a la reacción.



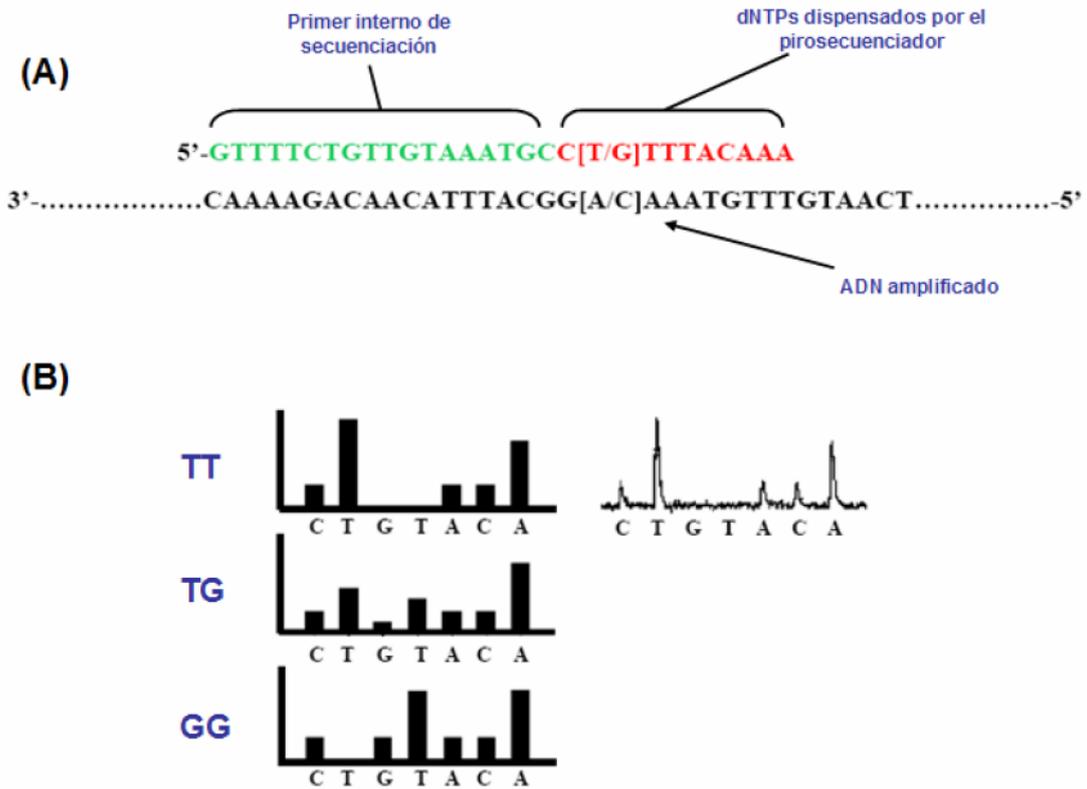
La adición de los dNTP es realizada secuencialmente. A medida que el proceso continúa, la cadena de ADN complementaria es construida y la secuencia nucleotídica es determinada a partir de los picos de señal en el pirograma.



### 3.6.2.1. Pirosecuenciación como herramienta para genotipificar SNPs

La pirosecuenciación es una técnica que permite secuenciar hasta 20 bases. Una característica de este método es que en la tipificación de SNPs, cada combinación alélica (heterocigoto u homocigoto) confiere un patrón específico comparado con las otras dos variantes. La determinación del SNP comienza con el análisis de nucleótidos precedentes a la posición investigada. Este paso sirve como control del proceso de amplificación así como para la calibración de los picos y las condiciones de reacción (Ahmadian *et al.*, 2006) (Figura 14).

Para genotipificar los SNPs propuestos en este trabajo, se tomaron los amplicones obtenidos por PCR, que contienen el residuo de biotina, y se prepararon para pirosecuenciación de acuerdo al protocolo estándar de los fabricantes (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia) (Pérez-Pérez *et al.*, 2007).



**Figura 14** –Análisis de un SNP por pirosecuenciación. (A) El amplificado es hibridado con el cebador de secuenciación. La reacción inicia con la incorporación de una base C (que sirve como calibración de la señal) y el orden de dispensación de los nucleótidos siguientes es T-G-T-A-C-A. (B) El orden de dispensación proporciona tres distintos patrones de pirosecuenciación.

Tomado y modificado de Ahmadian et al., 2006.

El cebador interno de secuenciación para la genotipificación de cada polimorfismo fue diseñado utilizando los programas informáticos FastPCR™ y PSQ® 96 MA 2.1.1 (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia). La tabla 9 muestra las secuencias de los cebadores internos de secuenciación utilizados para la genotipificación de cada SNP.

**Tabla 9-** Secuencias de los oligonucleotidos utilizados en las reacciones de Pirosecuenciación.

<b>Cebador Interno de Secuenciación</b>	<b>Secuencia</b>
<b>P53 int</b>	5'-CAG AGG CTG CTC CCC - 3'
<b>RNASEL int</b>	5'-GAT GAC AGG ACA TTT - 3'
<b>FASL Int</b>	5'-GAG CTG CTT TGT ATT-3'
<b>INFG Int</b>	5'-ACA CAA AAT CAA ATC-3'
<b>IL10 int</b>	5'-TAT CCC TAC TTC CCC-3'

### 3.6.2.2. Protocolo de Pirosecuenciación

#### Unión de los productos de PCR biotinilados a las perlas de sefarosa.

- Se utilizaron 20 µL de producto de PCR al que se le agregaron: 17 µL de agua destilada, 3 µL de perlas Dynabeads™ cubiertas con estreptavidina (Dynal, Oslo, Noruega) y 40 µL de buffer de binding (10 mmol/L Trizma base, 2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, y 0.1% Tween 20, pH 7.6).
- Se sellaron las placas de PCR y se agitaron con vórtex por 10 minutos a temperatura ambiente.

#### Desnaturalización del ADN y preparación de la cadena biotinilada

- Para aislar las cadenas biotiniladas del ADN complementario no marcado se utilizó un dispositivo de trampa de vacío (Workstation, Uppsala, Suecia) (Figura 15) que desnaturaliza el ADN dejándolo como cadena simple y atrapa los complejos perla-estreptavidina- biotina- ADN. Para ello, las muestras son transferidas a diferentes soluciones consecutivamente: etanol 10% por 10 segundos, NaOH 0,2 M por 10

segundos para desnaturalizar el ADN y buffer de lavado por 10 segundos para lavar los complejos.

- Las perlas con estreptavidina acopladas a las cadenas simples de ADN marcadas con biotina son entonces transportadas a una placa con buffer de annealing (20 mmol/L Trizma acetato y 5 mmol/L acetato de magnesio, pH 7.6) y el cebador interno de secuenciación.

- A continuación, las muestras se calientan a 80°C durante 2 minutos y se dejan a temperatura ambiente por 5 minutos antes de la reacción de pirosecuenciación.

#### *Pirosecuenciación e interpretación de los resultados*

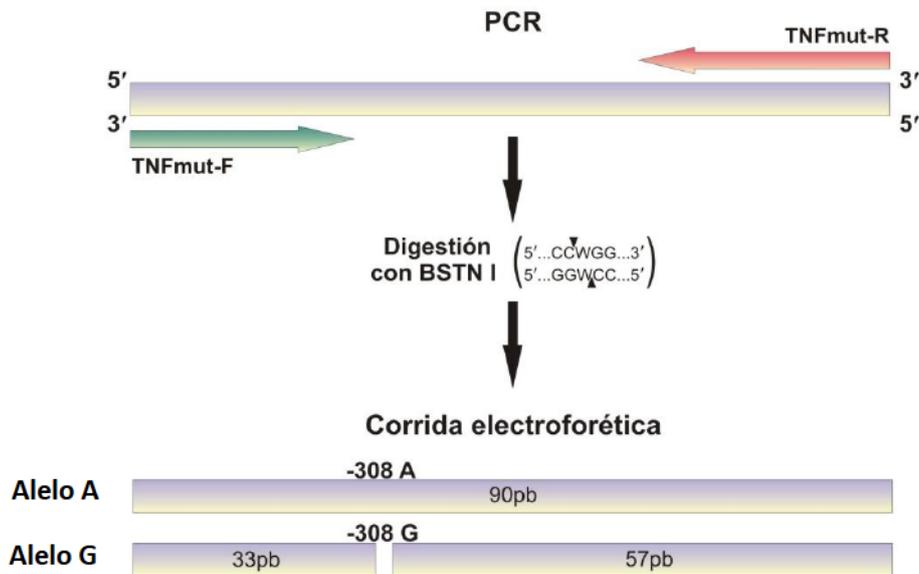
La genotipificación fue realizada mediante el empleo del pirosecuenciador automático PSQ® 96 MA (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia) (Figura 15) y la lectura automática se realizó utilizando el software informático PSQ® 96 MA 2.1.1 (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia). El equipo de pirosecuenciación está diseñado para analizar simultáneamente hasta 96 muestras, admitiendo incluso el análisis de SNPs diferentes.



**Figura 15-** Equipo de purificación y separación de cadenas de los amplificadores de ADN (izquierda), y pirosecuenciador PSQ96MA (Derecha).

### **3.6.3. PCR-RFLP como técnica de genotipificación**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa seguida por la digestión con enzimas de restricción, denominada PCR-RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), ha demostrado ser útil para la detección de polimorfismos puntuales causados por el cambio de una base nitrogenada (SNP), que crean o eliminan un sitio de restricción. Se basa en la detección de fragmentos de ADN de diferentes longitudes, de manera que, mediante el análisis del tamaño de los fragmentos de restricción, es posible determinar la presencia de un alelo u otro, y por lo tanto determinar el genotipo de un individuo. La figura 16 muestra un esquema de la metodología de esta técnica.



**Figura 16- Esquema de la metodología de PCR-RFLP.** Luego de la amplificación del fragmento deseado mediante PCR, se procede a la digestión del amplicon con enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes son detectados por corrida electroforética en minigeles de poliacrilamida.

### 3.6.3.1. Genotipificación de SNPs por PCR-RFLP

La genotipificación de los polimorfismos *Arg194Trp* y *Arg399Gln* del gen *XRCC1*, -238 (G/A) y -308(G/A) del gen *TNF-α* y -670 (A/G) del gen *FAS* se realizó por medio de la técnica de PCR-RFLP. Para ello, entre 7 ul a 10 ul de los productos de PCR fueron digeridos con 5 unidades de la correspondiente enzima de restricción. Los fragmentos resultantes fueron detectados por corrida electroforética en minigeles de poliacrilamida al 8% (en una proporción acrilamida: bisacrilamida de 19:1), coloreados con SYBR-Safe® (Invitrogen, USA), y visualizados con transiluminador de luz azul a 450 nm (Safe Imager™ - Invitrogen, USA). La tabla 11 resume el protocolo utilizado para la genotipificación de cada SNP.

Para el polimorfismo *Arg194Trp de XRCC1*, la banda de 55 pb es generada por un sitio de restricción constante y fue utilizada como control interno de digestión.

Para los polimorfismos en el gen *TNF- $\alpha$*  se utilizó una variante de la técnica, denominada ARMS-PCR (*Artificial Mutation Restriction System*) (Little S., 2001), la cual implica el empleo de cebadores que contengan la variante deseada. En este caso, se modificó una base en el cebador *forward*, de modo de crear un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción utilizada.

**Tabla 10-** Secuencias de oligonucleotidos utilizados en las reacciones de PCR, para la amplificación de los SNPs -238(G/A) y -308 (G/A) de *TNF- $\alpha$* .

<b>TNF - 308</b> (G/A) <i>rs1800629</i>	Secuencia Salvaje 5'-AAA AGA AAT GGA GGC AATAGG TTT TGA GGG GCA TG- 3'
	Cebador Forward 5'-AAA AGA AAT GGA GGC AATAGG TTT TGA GGG GCC TG- 3'
	Secuencia Salvaje 5'-CTT CTG GGC CAC TGA CTG ATT TGT GTG TAG GAC CC -3'
	Cebador Reverse 5'-CTT CTG GGC CAC TGA CTG ATT TGT GTG TAG GAC AC -3'

<b>TNF - 238</b> (G/A) <i>rs361525</i>	Secuencia Salvaje 5'- GAA GAC CCC CCT CGG AATC - 3'
	Cebador Forward 5'- GAA GAC CCC CCT CGG AACCC - 3'
	Secuencia Salvaje 5'- GTA GTG GGC CCT GCA CCT TCT G -3'
	Cebador Reverse 5'- GTA GTG GGC CCT GCA CCT TCT G -3'

En el caso del polimorfismo *TNF- $\alpha$  -238* existen dos posiciones desapareadas ó *mismatches* sobre el cebador forward. El primero corresponde al SNP -244 del gen *TNF- $\alpha$* , mientras que el segundo *mismatch* crea un sitio de corte para la enzima de restricción MspI (Genbiotech, Argentina). De la misma manera, el *mismatch* existente en el cebador forward del polimorfismo *TNF- $\alpha$  -308* crea un sitio de corte para la enzima BstNI (Genbiotech, Argentina).

Con el objetivo de evitar errores en la genotipificación, se seleccionó al azar un 20% del total de las muestras, las cuales fueron redigeridas para confirmar el genotipo.

**Tabla 11-** Protocolos de genotipificación por PCR-RFLP para el análisis de cada polimorfismo de nucleótido simple (SNP).

METODOLOGÍA	GEN	SNP	AMPLICON	ENZIMA	PRODUCTOS DE DIGESTIÓN	
PCR-RFLP	XRCCI	<b>codón 399 Arg/Gln</b>	fragmento de 100 pb	Mspl (37°C por 5 hs)	399Gln (alelo A) 399Arg (alelo G)	Fragmento de 100 pb. Dos fragmentos de 65 pb y 35 pb
		<b>codón 194 Arg/Trp</b>	fragmento de 155 pb	Mspl (37°C por 5 hs)	194Arg (alelo C) 194Trp (alelo T)	Tres fragmentos de 80 pb, 55 pb y 20 pb. Dos fragmentos de 100 pb y 55 pb
	TNF- $\alpha$	<b>Nucleótido - 308 (G/A)</b>	Fragmento de 90 pb	Bstnl (60°C por 5 hs)	Alelo A Alelo G	Fragmento de 90 pb Dos fragmentos de 57 pb y 33 pb.
		<b>Nucleótido - 238 (G/A)</b>	Fragmento de 137 pb	Mspl (37°C por 5 hs)	Alelo A Alelo G	Fragmento de 137 pb Dos fragmentos de 118 pb y 19 pb.
	FAS	<b>Nucleótido -670 (G/A)</b>	fragmento de 182 pb	Bstnl (60°C por 5 hs)	Alelo A Alelo G	Fragmento de 182 pb Dos fragmentos de 150 pb y 32 pb.

### 3.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando los programas SPSS®, EPIDAT 3.1 (Programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados – Organización Panamericana de la Salud) y MDR-Permutation Testing Software Overview™ (Dartmouth Medical School, USA). La estadística descriptiva de los datos se efectuó

mediante el empleo de tablas de tabulación cruzada y representación gráfica en histogramas de frecuencias. El estudio de las asociaciones entre los marcadores moleculares en función a los factores de clasificación fue ensayado de acuerdo a sus distribuciones por medio de la prueba de chi-cuadrado. En las tablas 2x2 y con casillas de valores menores a 5 observaciones se utilizó la corrección de continuidad de Yates. Para cada factor estudiado se obtuvo el *odds ratio* con intervalos de confianza del 95%.

### **3.7.1. Frecuencias génicas y genotípicas:**

Las frecuencias genotípicas ( $X_{ii}$ ,  $X_{ij}$ ,  $X_{jj}$ ) de los polimorfismos en estudio se estimaron por recuento directo de cada uno de los genotipos observados sobre el total de pacientes estudiados. Las frecuencias génicas se obtuvieron según la siguiente fórmula (Nei, 1987).

$$x_i = (2 n_{ii} + n_{ij}) / 2 n$$

Donde:  $n_{ii}$  indica el número de individuos homocigotas para el alelo  $i$  y  $n_{ij}$  indica el número de individuos donde  $j$  es cualquier alelo distinto de  $i$ .

### **3.7.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg**

Según el principio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987), las frecuencias genotípicas esperadas en el equilibrio pueden ser estimadas en base de las frecuencias génicas a partir de la expansión del siguiente binomio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2 x_i x_j + x_j^2$$

Donde:  $x_i^2$  es la frecuencia genotípica esperada en los individuos homocigotos para el alelo  $i$ ,  $2 x_i \cdot x_j$  es la frecuencia esperada de los heterocigotas  $ij$  y  $x_j^2$  es la frecuencia esperada de los homocigotas para el alelo  $j$ .

Para verificar que la población se encuentre en equilibrio se comparan los valores genotípicos observados y los valores teóricos esperados según el equilibrio de Hardy-Weinberg, mediante el empleo de la prueba de Chi-cuadrado de Bondad de ajuste.

### **3.7.3. Prueba de Chi-cuadrado de Pearson:**

La distribución de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), o de Pearson, se refiere a las probabilidades que tienen las sumas de los cuadrados  $(O-C)^2 / C$  formados por “n” número de clases. En ellos “O” es la frecuencia absoluta de una clase de una muestra real que responde a una ley, una hipótesis, una razón, una proporción o un porcentaje, y “C” es la frecuencia absoluta de la clase correspondiente de una clase teórica, calculada sobre la base de los parámetros de la muestra real y teniendo en cuenta el grado de libertad ( $v$ ), o de clases menos el número de condiciones impuestas a esta muestra. La amplitud de la distribución va de cero a infinito.

Función: la función de la densidad de la probabilidad de la frecuencia se expresa:

$$X^2 = \sum_i \frac{(O-C)^2}{C}$$

Para la estimación de la asociación entre dos o más variables del tipo cualitativo se empleó la prueba de chi-cuadrado con la corrección de Yates para las casillas con

valores menores de 5 observaciones (Greenberg *et al.*, 2001). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a los valores de  $p < 0,05$ .

$$X^2_{Yates} = \sum_i \frac{[(O-C)+0,5]^2}{C}$$

**3.7.4. Estimación del riesgo relativo**

El *odds ratio* es una estimación del Riesgo Relativo asociado a la exposición a un factor (Greenberg *et al.*, 2001). Se calcula mediante la razón de los productos cruzados de enfermos por sanos entre los individuos que presentan el factor de riesgo en consideración y los que no lo hacen (OR). Valores mayores a 1 indican que la enfermedad es más común entre los individuos que están expuestos al factor bajo estudio. La situación opuesta ocurre cuando los valores son menores a 1.

La información de la población en estudio se tabula de la siguiente manera:

	ENFERMEDAD	
	SI	NO
EXPOSICIÓN	a	b
NO EXPOSICIÓN	c	d

La fórmula del *odds ratio* (OR) es:

$$\text{OR} = \frac{(a \times d)}{(b \times c)}$$

### **3.7.5. Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial o MDR** (*Multifactor Dimensionality Reduction*)

La Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial (MDR) es un modelo genético no paramétrico que es alternativo a la regresión logística para la detección y la caracterización de interacciones no lineales entre atributos genéticos y ambientales discretos. Este método sirve para detectar y caracterizar las combinaciones de variables predictoras (atributos) o variables independientes que interactúan para influenciar las variables de clase o dependientes. MDR fue diseñado específicamente para identificar interacciones entre variables discretas que influyen una respuesta binaria, y es considerada una alternativa no paramétrica a los métodos estadísticos tradicionales.

La base del método de MDR es la construcción de un algoritmo que convierte dos o más variables (polimorfismos) en una sola. En lugar de comparar todas las combinaciones de genotipos entre casos y controles, la nueva única variable es asociada con la variable de clase (sano-enfermo). De manera que un análisis multivariado pasa a ser uno bivariado, el cual puede ser abordado con cualquier técnica conocida de asociación no paramétrica. El objetivo final es crear un modelo simple que facilite la detección de interacciones no aditivas o no lineales entre los atributos, tal que la predicción de la variable de clase sea mejorada más que en la representación original de los datos. El MDR es directamente aplicable a estudios de caso-control y distintos grupos han demostrado que este

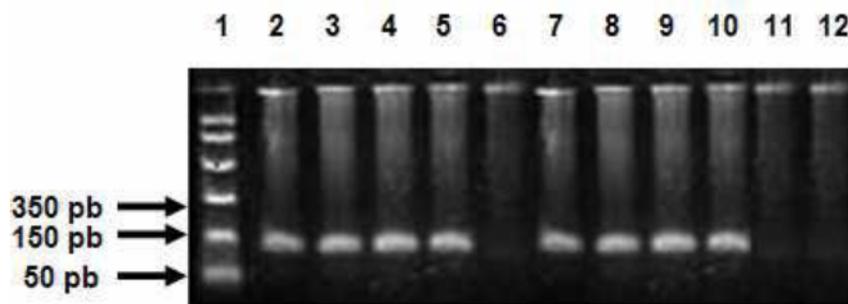
programa tiene un valioso poder para identificar asociaciones entre dos o más loci en muestras relativamente pequeñas (Ritchie *et al.*, 2001; Lavender *et al.*, 2009). El software utilizado en este trabajo fue MDR-Permutation Testing Software Overview™ (Dartmouth Medical School, USA).

# *Resultados*

## 4.1. Virus del Papiloma Humano y su asociación con el Cáncer Cervical

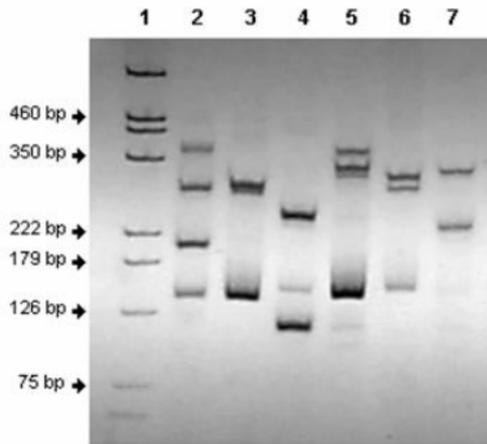
### 4.1.1. Detección del ADN del virus del Papiloma humano.

El ADN fue extraído exitosamente de la totalidad de las muestras analizadas para el diagnóstico cito/histológico, resultando aptas para la detección y tipificación del ADN-VPH. Todas las muestras fueron analizadas mediante la técnica de PCR con protocolo anidado MY/GP+. Estos cebadores delimitan un segmento de la región *L1* del genoma viral conservado entre los tipos virales (cebadores MY09/11 y GP05+/06+) (Figura 17).

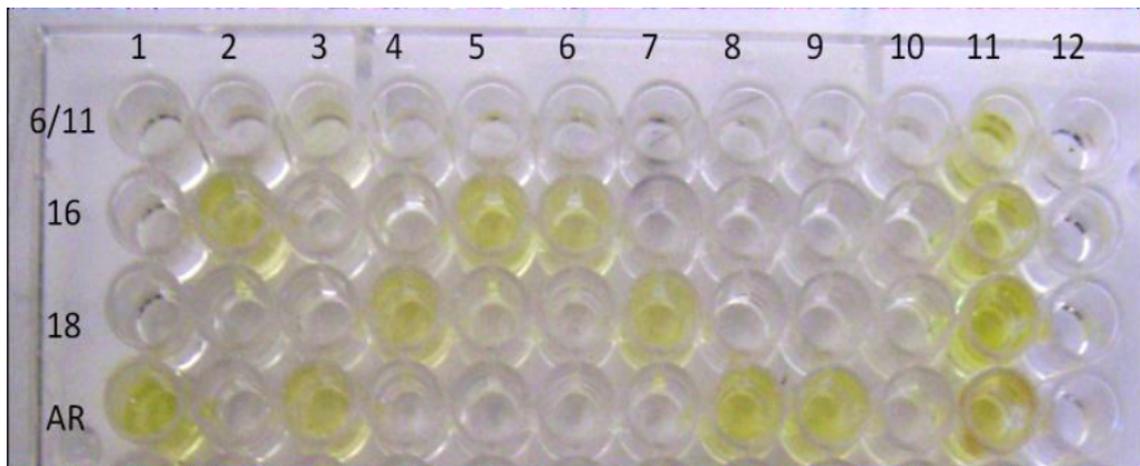


**Figura 17**– Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Calle 1: marcador de peso molecular AmpliSize 50- 2000 pb (Bio-Rad, Hercules, EEUU); Calle 2-5 y 7-10: amplificados de muestras cervicales ADN-VPH positivas; Calles 6 y 11: muestras ADN-VPH negativos; Calle 12: control negativo de la reacción.

La genotipificación fue realizada mediante el procedimiento PCR enzima-immunoensayo (PCR-EIA) con sondas específicas, como está descrito en Materiales y Métodos. En la figura 19 se observan los resultados obtenidos en una micro-placa de PCR-EIA. Para la tipificación viral también se utilizó la técnica de Polimorfismos en la Conformación de Cadenas Simples (SSCP) (**figura 18**).



**Figura 18**– Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Patrón de bandas de LIS-SSCP de los productos de amplificación del VPH. Calle 1: marcador de peso molecular pGEM (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU); Calles 2 a 7: controles positivos de tipo 6, 11, 16, 18, 31 y 33 (plásmidos).

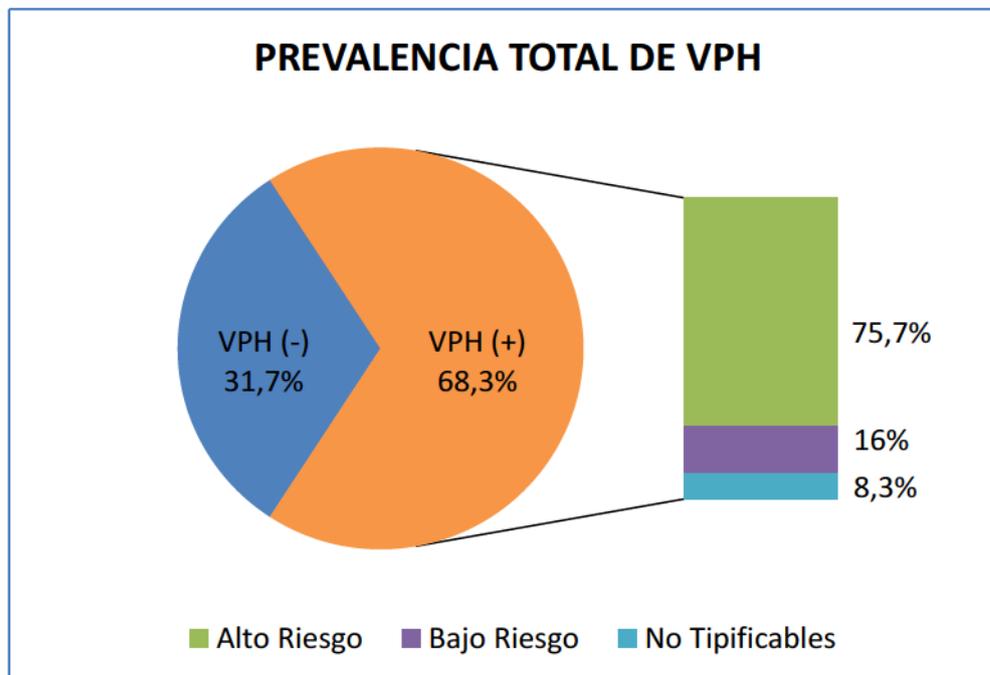


**Figura 19**– Microplaca de PCR enzima-inmunoensayo de muestras positivas para la infección por VPH. Calle 1, 3 y 8: VPH-31; calle 2, 5 y 6: VPH-16; calle 4 y 7: VPH-18; calle 9: VPH-51; calle 10: VPH (-); calle 11: controles positivos; calle 12: controles negativos.

#### 4.1.1.1. Prevalencia del Papilomavirus Humano

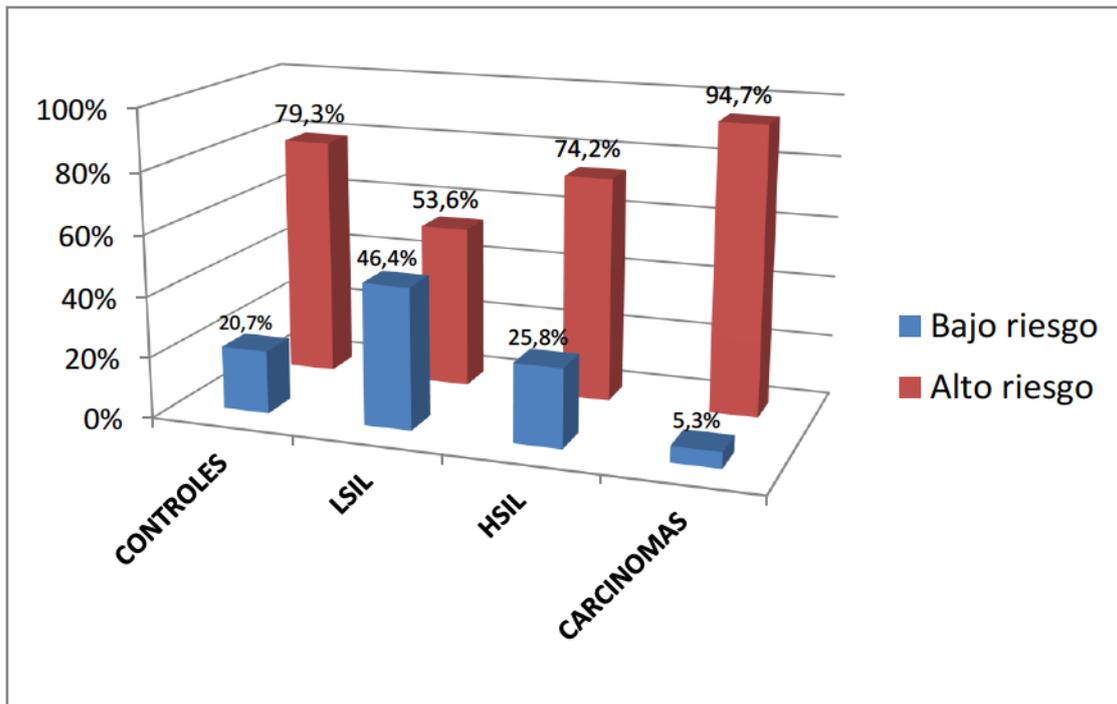
La prevalencia de la infección por VPH en las 512 muestras clínicas fue de 68,3%, presentando los tipos virales de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52) una prevalencia del 70,8%, mientras que la prevalencia de los tipos virales de bajo riesgo (VPH 6, 11, 34, 42) fue de 22,8%, y el 6,4% constituyeron muestras no tipificables, que

no coincidieron con ningún patrón de bandas de los tipos virales empleados como controles positivos ni con las sondas utilizadas en la PCR-EIA. Asimismo, el 16,2% de las muestras VPH (+) presentaron infecciones múltiples.

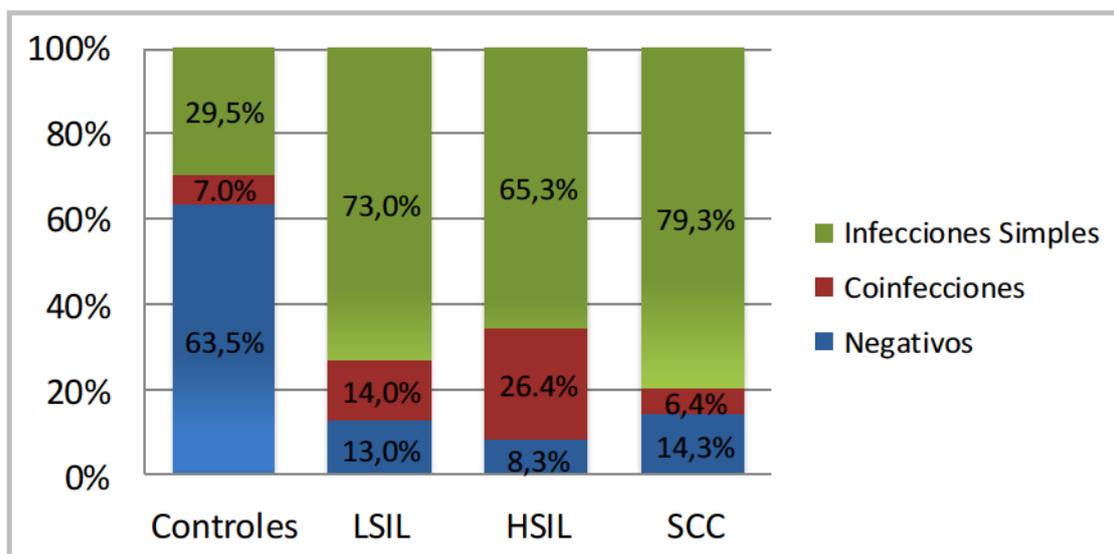


**Gráfico 3-** Distribución de la prevalencia total de VPH, tipos virales de bajo/alto riesgo y No Tipificables.

En el grupo control, formado por muestras clasificadas como Pap I/II, se detectó un 36,5% de prevalencia para el ADN-VPH. Del total de controles, el 29,3% correspondieron a mujeres mayores de 30 años infectadas con VPH de Alto Riesgo. En el grupo de mujeres con lesiones precancerosas la prevalencia viral fue del 84,0% en muestras clasificadas como LGSIL y de 91,4% para las muestras clasificadas como HSIL, mientras que en el grupo de carcinomas de células escamosas la prevalencia del ADN del VPH fue de 86,0%. (**Gráficos 4 y 5**).



**Gráfico 4-** Distribución de la prevalencia de tipos virales de bajo/alto riesgo en los grupos estudiados.



**Gráfico 5-** Distribución de Infecciones Simples y Coinfecciones en los grupos estudiados.

El tipo viral 16 fue el más frecuente, seguido por el VPH-18, en controles, HSIL y carcinomas. En las lesiones de bajo grado (LSIL), el VPH-6 fue el tipo viral más prevalente, seguido por los tipos VPH-16 y VPH-18. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la prevalencia de la infección con la severidad de la lesión diagnosticada ( $\chi^2=103,83$   $p<0,0001$ ; tau-c=0,42  $p<0,0001$ ). La estimación del incremento en el riesgo de desarrollo de lesión cervical adjudicada al VPH, resultante de la comparación de la prevalencia del VPH entre el grupo control y las lesiones cervicales fue: OR=12,78; IC<sub>95%</sub>=7,43-21,99 ( $\chi^2=102,57$   $p<0,0001$ ).

**Tabla 12-** Distribución de la prevalencia de la infección, tipos virales de bajo/alto riesgo, coinfecciones y no tipificables en los grupo estudiados.

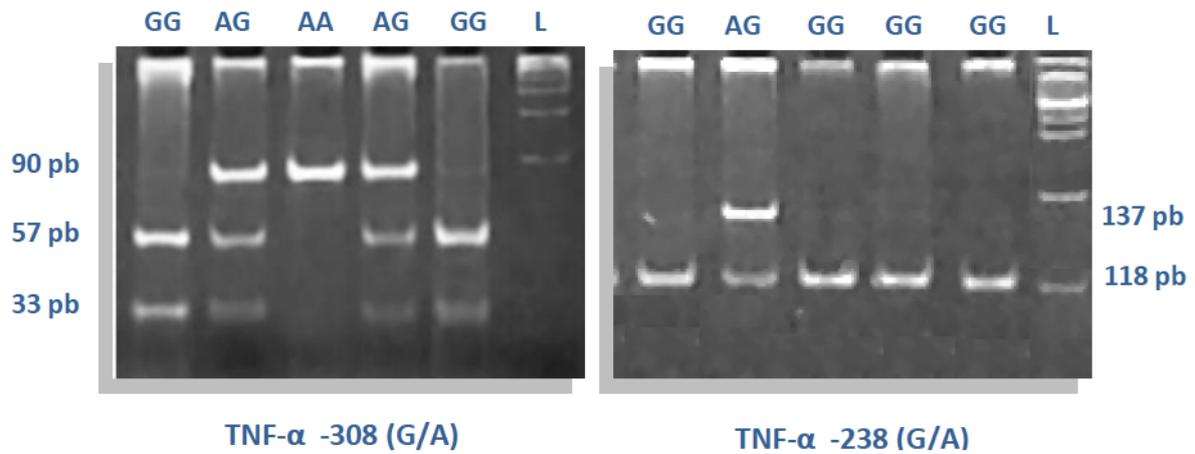
CONTROLES		LSIL		HSIL		CARCINOMAS	
VPH	Tipo Viral	VPH	Tipo Viral	VPH	Tipo Viral	VPH	Tipo Viral
<b>ALTO RIESGO</b> 64 (74,5%)	16 44 (51,2%)	<b>Alto Riesgo</b> 50 (51,0%)	16 31 (31,6%)	<b>Alto Riesgo</b> 56 (71,8%)	16 35 (44,8%)	<b>Alto Riesgo</b> 105 (83,3%)	16 82 (65,1%)
	18 15 (17,4%)		18 13 (13,2%)		18 15 (19,2%)		18 13 (10,3%)
	31 4 (4,6%)		31 3 (3,1%)		31 3 (3,8%)		31 6 (4,7%)
	33 1 (1,2%)		33 3 (3,1%)		33 3 (3,8%)		33 4 (3,2%)
<b>BAJO RIESGO</b> 16 (18,6%)	6 8 (9,3%)	<b>Bajo Riesgo</b> 44 (44,9%)	6 36 (36,7%)	<b>Bajo Riesgo</b> 22 (28,2%)	6 17 (21,8%)	<b>Bajo Riesgo</b> 6 (4,7%)	6 2 (1,6%)
	11 8 (9,3%)		11 8 (8,2%)		11 5 (6,4%)		11 4 (3,2%)
<b>NO TIPIFICABLES</b>	6 (6,9%)		4 (4,1%)		-		15 (11,9%)
<b>TOTAL</b>	86 (100%)		98 (100%)		78 (100%)		126 (100%)
<b>COINFECCIONES</b>	14		14		19		9

La estimación del riesgo relativo según las infecciones con tipos virales de alto riesgo entre el grupo con citología normal y el LGSIL dio como resultado un OR=1,84 IC=1,14-2,97 ( $\chi^2=5,82$  p=0,016); para el grupo HGSIL se obtuvo un OR=4,64 IC=2,71-7,91 ( $\chi^2=32,4$  p<0,0001); mientras para el grupo de pacientes con carcinomas el valor obtenido fue de OR=8,56 IC=5,08-14,4 ( $\chi^2=71,8$  p<0,0001).

#### **4.2. SNPs y su relación con el Cáncer Cervical y la Infección por VPH**

El ADN fue extraído exitosamente de la totalidad de las muestras analizadas para el diagnóstico cito/histológico, sin embargo no todas las muestras resultaron aptas para la genotipificación de los SNPs en estudio. El número de muestras analizadas para cada polimorfismo se muestra en las tablas de distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas. El análisis de las frecuencias genotípicas demostró que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg,  $p>0,05$ .

Mediante el empleo de la técnica PCR-RFLP fue posible la genotipificación de las variantes polimórficas del gen *TNF- $\alpha$*  (posiciones -238(A/G) y -308 (G/A)).



**Figura 20** – Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Patrón de bandas de los productos de digestión del gen TNF. **Gel TNF-A -308(G/A)** Calles 1 y 5: homocigotas GG; Calles 2 y 4: heterocigota AG; Calle 3: homocigota AA; Calle 6: Ladder. **Gel TNF-A -238(G/A)** Calles 1, 3, 4 y 5: homocigotas GG; Calle 2: heterocigota AG, Calle 6: ladder.

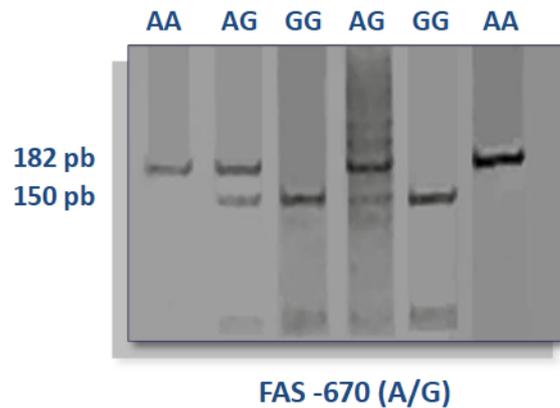
**Tablas 13-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del SNP -238 (G/A) del gen TNF-α de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

TNF-α	DIAGNOSTICO			
-238 (G/A)	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)
AA	0 (0, 0%)	0 (0, 0%)	0 (0, 0%)	3 (2, 6%)
AG	23 (16, 4%)	22 (23, 7%)	9 (13, 2%)	10 (8, 7%)
GG	117 (83.6%)	71 (76, 3%)	59 (86, 8%)	102 (88, 7%)
<b>TOTAL</b>	<b>140 (100, 0%)</b>	<b>93 (100, 0%)</b>	<b>68 (100, 0%)</b>	<b>115 (100, 0%)</b>
<b>Alelos</b>				
A	12 (8, 5%)	11 (11, 8%)	4 (5, 8%)	8 (6, 9%)
G	128 (91, 5%)	82 (88, 2%)	64 (94, 2%)	107 (93, 1%)

**Tablas 14-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del SNP -308 (G/A) del gen TNF- $\alpha$  de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

TNF- $\alpha$		DIAGNOSTICO			
-308 (G/A)	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)	
AA	3 (2, 1%)	1 (1, 1%)	2 (3, 1%)	4 (2, 8%)	
AG	38 (26, 4%)	32 (35, 2%)	9 (14, 1%)	39 (27, 8%)	
GG	103 (71, 5%)	58 (63, 7%)	53 (82, 8%)	97 (69, 4%)	
<b>TOTAL</b>	<b>144 (100, 0%)</b>	<b>91 (100, 0%)</b>	<b>64 (100, 0%)</b>	<b>140 (100, 0%)</b>	
<b>Alelos</b>					
A	22 (15, 3%)	17 (18, 7%)	7 (10,9%)	23 (16, 4%)	
G	122 (84, 7%)	74 (81, 3%)	57 (89,1%)	117 (83, 6%)	

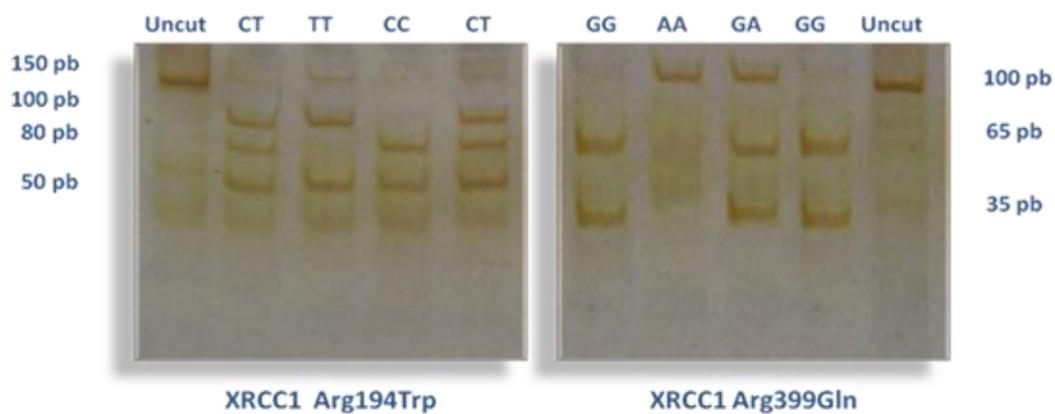
La genotipificación de los SNPs presentes en la posición -670 (G/A) del gen *FAS* y en los codones *Arg399Gln* y *Arg194Trp* del gen *XRCC1* también fue realizada mediante la técnica de PCR-RFLP.



**Figura 21-** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Patrón de bandas de los productos de digestión de *FAS* -670(A/G). Calles 1 y 6: homocigota AA; Calles 2 y 4: heterocigota AG; calles 3 y 5: homocigotas GG.

**Tabla 15-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del SNP -670 (G/A) del gen FAS de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

FAS		DIAGNÓSTICO			
-670 (G/A)	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)	
AA	47 (23, 5%)	11 (32, 3%)	19 (32, 2%)	40 (30, 1%)	
AG	105 (52, 5%)	19 (55, 8%)	21 (35, 6%)	72 (54, 1%)	
GG	48 (24, 0%)	4 (11, 7%)	19 (32, 2%)	21 (15, 8%)	
<b>TOTAL</b>	<b>200 (100, 0%)</b>	<b>34 (100, 0%)</b>	<b>59 (100, 0%)</b>	<b>133 (100, 0%)</b>	
<b>Alelos</b>					
A	100 (50, 0%)	20 (58, 8%)	30 (50, 8%)	76 (57, 1%)	
G	100 (50, 0%)	14 (41, 2%)	29 (49, 2%)	57 (42, 9%)	



**Figura 22-** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Patrón de bandas de los productos de digestión de *XRCC1* codón *Arg194Trp* y codón *Arg399Gln*. Calle 1 y 10: amplicon sin digerir.

**Tablas 16 y 17-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs del gen *XRCC1* de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

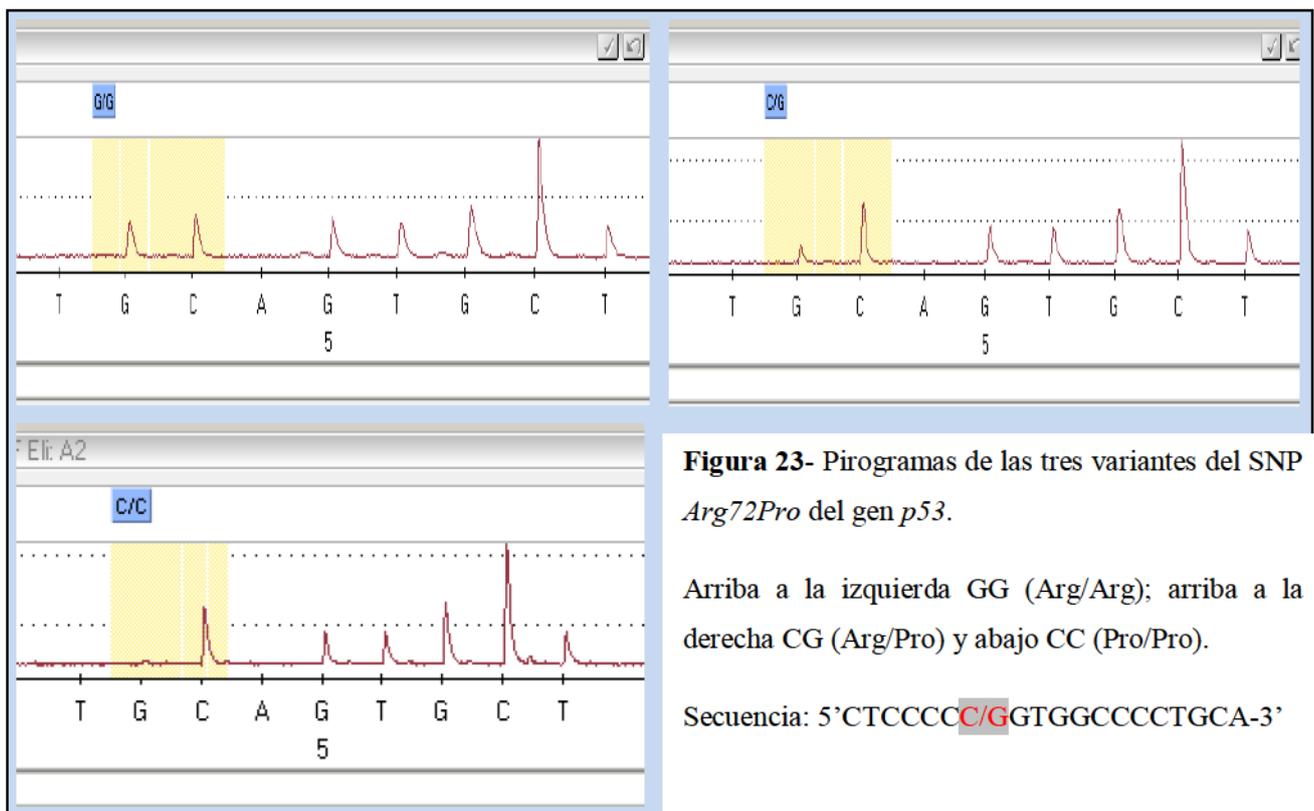
**Tabla 16-** Polimorfismo *Arg194Trp* del gen *XRCC1*.

XRCC1	DIAGNÓSTICO			
	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)
<b>Codon 399</b>				
Gln/Gln (AA)	21 (14, 7%)	36 (61, 0%)	7 (17, 9%)	20 (17, 7%)
Gln/Arg (AG)	70 (49, 0%)	6 (10, 1%)	5 (12, 8%)	35 (31, 0%)
Arg/Arg (GG)	52 (36, 4%)	17 (28, 8%)	27 (69, 2%)	58 (51, 3%)
<b>TOTAL</b>	<b>143 (100, 0%)</b>	<b>59 (100, 0%)</b>	<b>39 (100, 0%)</b>	<b>113 (100, 0%)</b>
<b>Alelos</b>				
Gln (A)	56 (39, 2%)	39 (66, 1%)	10 (25, 6%)	37 (32, 8%)
Arg (G)	87 (60, 8%)	20 (33, 9%)	29 (74, 3%)	76 (67, 2%)

**Tabla 17-** Polimorfismo *Arg194Trp* del gen *XRCC1*.

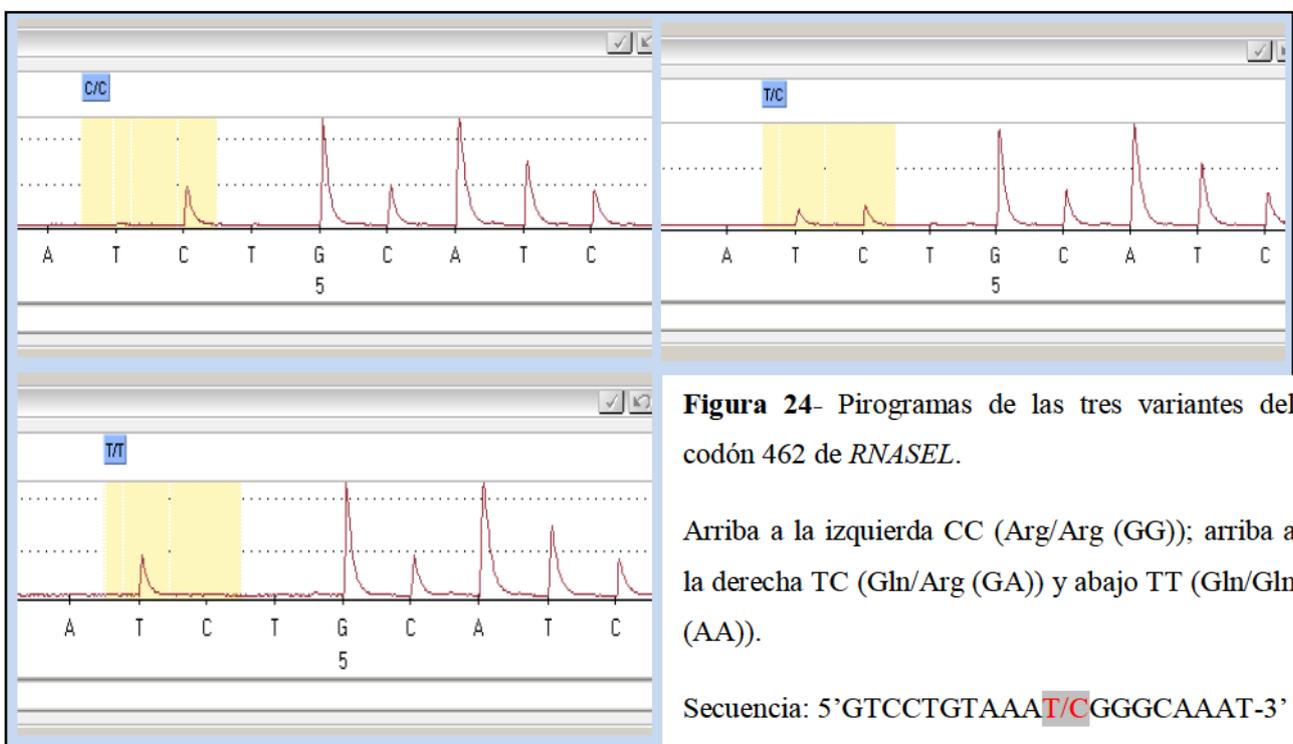
XRCC1	DIAGNÓSTICO			
	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)
<b>Codon 194</b>				
Arg/Arg (CC)	123 (87, 9%)	47 (92, 1%)	39 (88, 6%)	83 (76, 1%)
Arg/Trp (CT)	13 (9, 3%)	4 (7, 8%)	5 (11, 3%)	22 (20, 2%)
Trp/Trp (TT)	4 (2, 9%)	0 (0, 0%)	0 (0, 0%)	4 (3, 7%)
<b>TOTAL</b>	<b>140 (100, 0%)</b>	<b>51 (100, 0%)</b>	<b>44 (100, 0%)</b>	<b>109 (100, 0%)</b>
<b>Alelos</b>				
Arg (C)	130 (92, 8%)	49 (96, 0%)	41 (93, 2%)	94 (86, 2%)
Trp (T)	10 (7, 2%)	2 (4, 0%)	3 (6, 8%)	15 (13, 8%)

La genotipificación de los polimorfismos presentes en el codon 72 de *P53*, codón 462 del gen *Rnase L*, y posición -844 (T/C) del gen *FAS-Ligando*, fue realizada con tecnología de pirosecuenciación. El perfil de picos de luminiscencia para cada genotipo individual se encuentra graficado en las figuras 23-25.



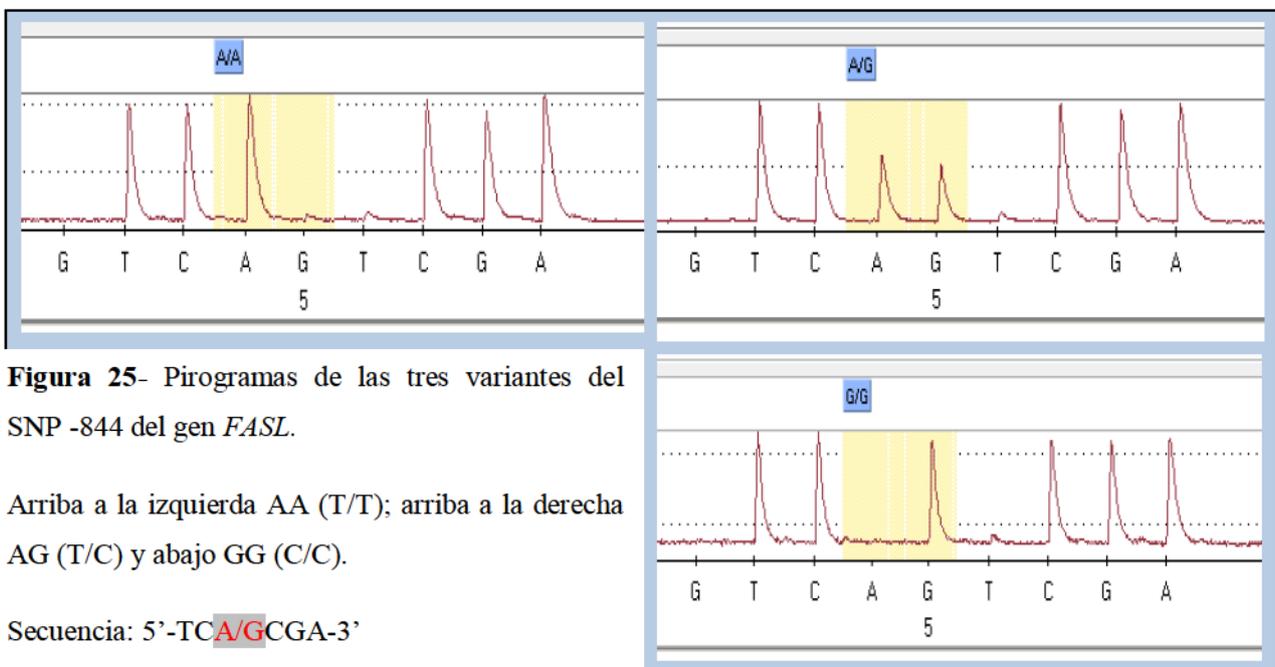
**Tabla 18-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *Arg72Pro* de *P53* de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

P53	DIAGNÓSTICO			
Arg72Pro	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)
Pro/Pro (CC)	13 (10, 7%)	2 (4, 4%)	3 (5, 7%)	3 (2, 7%)
Arg/Pro (CG)	40 (33, 1%)	20 (44, 4%)	19 (36, 5%)	61 (54, 5%)
Arg/Arg (GG)	68 (33, 1%)	23 (51, 1%)	24 (46, 1%)	48 (33, 1%)
<b>TOTAL</b>	<b>121 (100, 0%)</b>	<b>45 (100, 0%)</b>	<b>46 (100, 0%)</b>	<b>112 (100, 0%)</b>
<b>Alelos</b>				
<b>C</b>	<b>33 (27, 2%)</b>	<b>12 (26, 6%)</b>	<b>12 (26, 1%)</b>	<b>34 (30, 3%)</b>
<b>G</b>	<b>88 (72, 8%)</b>	<b>33 (73, 3%)</b>	<b>34 (73, 9%)</b>	<b>78 (69, 7%)</b>



**Tabla 19-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *Arg462Gln* del gen *RNASEL* de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

RNASEL	DIAGNÓSTICO			
	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)
Arg462Gln				
Gln/Gln (AA)	22 (18, 0%)	1 (2, 2%)	6 (12, 7%)	6 (5, 7%)
Gln/Arg (GA)	56 (45, 9%)	23 (51, 1%)	22 (46, 8%)	49 (46, 7%)
Arg/Arg (GG)	44 (36, 1%)	21 (46, 6%)	19 (40, 4%)	50 (47, 6%)
<b>TOTAL</b>	<b>122 (100, 0%)</b>	<b>45 (100, 0%)</b>	<b>47 (100, 0%)</b>	<b>105 (100, 0%)</b>
<b>Alelos</b>				
A	50 (41,0%)	12 (26, 6%)	17 (36, 2%)	31 (29, 6%)
G	72 (59,0%)	33 (73, 3%)	30 (63, 8%)	74 (70, 4%)



**Figura 25-** Pirogramas de las tres variantes del SNP -844 del gen *FASL*.

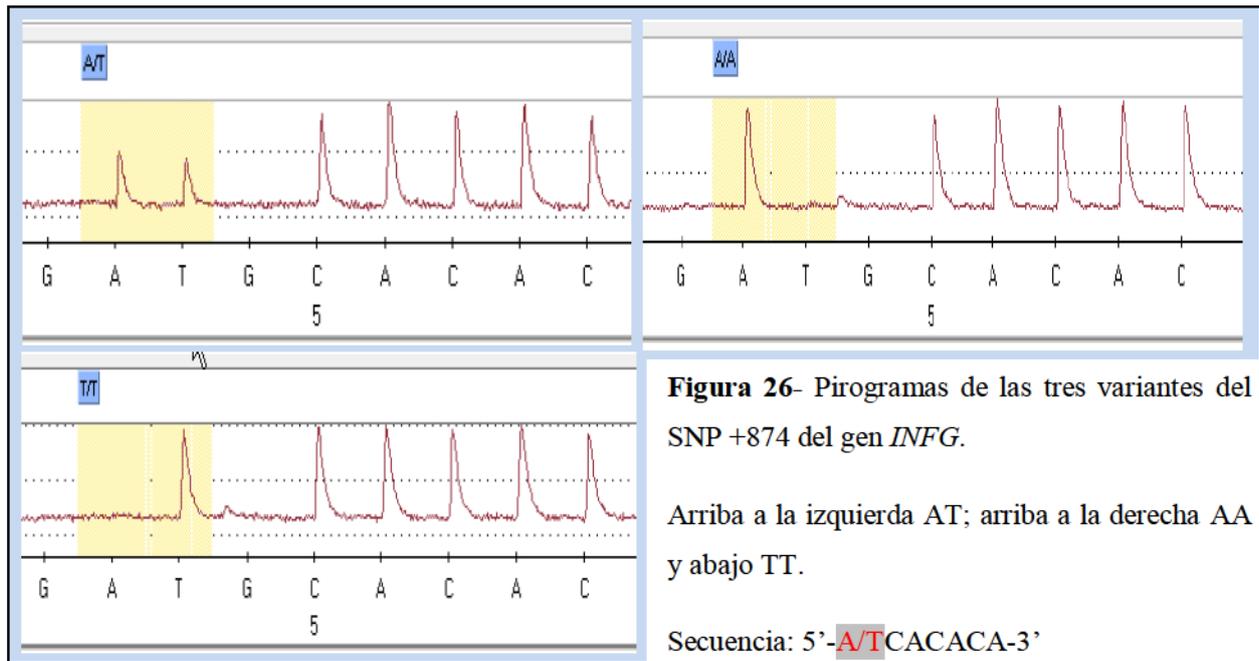
Arriba a la izquierda AA (T/T); arriba a la derecha AG (T/C) y abajo GG (C/C).

Secuencia: 5'-TCA**A**GCGA-3'

**Tabla 20-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -844 del gen *FASL* de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

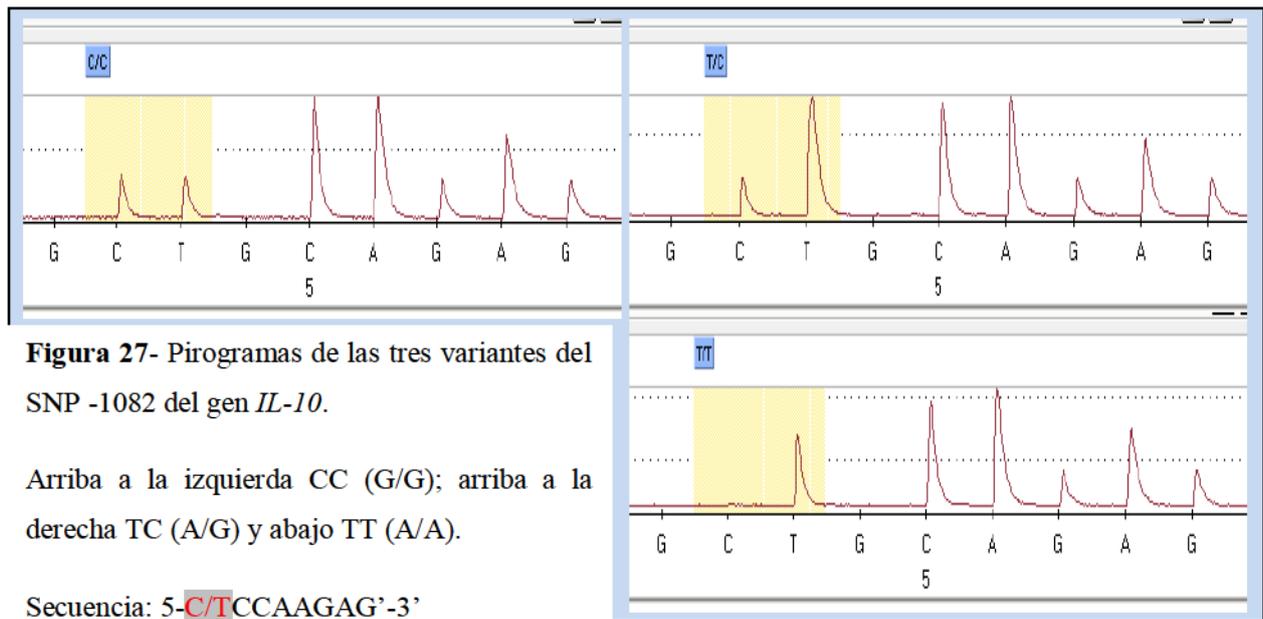
FASL	DIAGNÓSTICO				
	-844 (T/C)	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)
CC		69 (34, 5%)	12 (26, 7%)	18 (32, 1%)	46 (39, 7%)
CT		100 (50, 0%)	26 (57, 7%)	26 (46, 4%)	58 (50, 0%)
TT		31 (15, 5%)	7 (15, 6%)	12 (21, 4%)	12 (10, 3%)
<b>TOTAL</b>		<b>200</b> 100,0%	<b>45</b> 100,0%	<b>56</b> 100,0%	<b>116</b> 100,0%
<b>Alelos</b>					
C		119 (59, 5%)	25 (55, 5%)	31(55, 4%)	75 (64, 6%)
T		81 (40, 5%)	20 (44, 5%)	25 (44, 6%)	41 (35, 4%)

Para el análisis de los polimorfismos presentes en las posiciones +874 (T/A) del gen *INFG* y -1082 (G/A) del gen *IL-10* también se utilizó el método de Pirosecuenciación. En las figuras 26 y 27 se grafica el perfil de picos de luminiscencia para cada genotipo. En las tablas 21 y 22 se muestran las distribuciones de frecuencias alélicas y genotípicas para ambos polimorfismos.



**Tabla 21-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo +874(T/A) del gen *INFG* de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

INFG	DIAGNÓSTICO				
	+874 (T/A)	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)
AA		39 (29, 5%)	24 (42, 1%)	13 (38, 2%)	41 (33, 1%)
AT		65 (49, 2%)	21 (36, 8%)	10 (29, 4%)	70 (56, 4%)
TT		28 (21, 2%)	12 (21, 0%)	11 (32, 3%)	13 (10, 5%)
<b>TOTAL</b>		<b>132 (100, 0%)</b>	<b>57 (100, 0%)</b>	<b>34 (100, 0%)</b>	<b>124(100, 0%)</b>
<b>Alelos</b>					
A		71 (53, 8%)	35 (61, 4%)	18 (52, 9%)	76 (61, 3%)
T		61 (46, 2%)	22 (38, 6%)	16 (47, 0%)	48 (38, 7%)



**Figura 27-** Pirogramas de las tres variantes del SNP -1082 del gen *IL-10*.

Arriba a la izquierda CC (G/G); arriba a la derecha TC (A/G) y abajo TT (A/A).

Secuencia: 5-**C/T**CCAAGAG'-3'

**Tabla 22-** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -1082(G/A) del gen *IL-10*, de acuerdo al estadio cito-histopatológico.

IL -10	DIAGNÓSTICO			
-1082 (G/A)	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)
AA	57 (43, 5%)	23 (39, 6%)	19 (47, 5%)	40 (41, 7%)
AG	61 (46, 6%)	34 (58, 6%)	18 (45, 0%)	46 (47, 9%)
GG	13 (9, 9%)	1 (1, 72%)	3 (7.5%)	10 (10, 4%)
<b>TOTAL</b>	<b>131 100,0%</b>	<b>58 100,0%</b>	<b>40 100,0%</b>	<b>96 100,0%</b>
<b>Alelos</b>				
A	87 (66, 4%)	40 (68, 9%)	28 (70, 0%)	63 (65, 6%)
G	44 (33, 6%)	18 (31, 1%)	12 (30, 0%)	33 (34, 4%)

No se encontraron diferencias significativas al comparar las frecuencias alélicas de los distintos SNPs entre los controles y las lesiones cervicales ( $\chi^2=0,082$ ;  $p>0,05$ ). Sin embargo, el alelo *Gln* (A) del polimorfismo *Arg399Gln* de *XRCC1* mostró un incremento en el riesgo de desarrollo de Lesiones de bajo grado (OR= 3,03;  $p= 0,001$ ) cuando se lo comparó con el alelo *Arg* (G).

**Tabla 23-** Frecuencias alélicas del SNP *Arg399Gln* de *XRCC1* y su relación con el desarrollo de Lesiones de Bajo Grado (LSIL).

XRCC1 Codon 399	DIAGNÓSTICO				OR (IC) 95% ajustado por edad
	CONTROL n (%)	LSIL n (%)	HSIL n (%)	SCC n (%)	CONTROLES vs LSIL
<i>Gln</i> (A)	56 (39, 2%)	39 (66, 1%)	10 (25, 6%)	37 (32, 8%)	OR=3, 03 (IC <sub>95%</sub> =1,60-5,71) $p=0,001^*$
<i>Arg</i> (G)	87 (60, 8%)	20 (33, 9%)	29 (74, 3%)	76 (67, 2%)	1 (referencia)

Para los polimorfismos presentes en los genes *INF-gamma*, *FAS-Ligando*, *IL-10* y *TNF- $\alpha$*  el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa en la distribución genotípica de estos polimorfismos en función del estadio cito-histológico de las muestras ( $\chi^2=3,34$ ;  $p>0,05$ ).

Por el contrario, el análisis de la distribución genotípica de los SNPs presentes en los genes *FAS*, *P53*, *RNASEL* y *XRCC1* demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ) entre controles, carcinomas y lesiones cervicales. De esta manera, para calcular el riesgo otorgado por cada genotipo se compararon las frecuencias de los genotipos por separado y en conjunto contra el genotipo de mayor frecuencia en el grupo control. Los resultados se resumen en la tabla 24.

**Tabla 24-** Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) y su relación con el desarrollo de cáncer cervical y la infección viral.

Marcador	Genotipos			Alelos		LGSIL	HGSIL	SCC	VPH
P53	CC	CG	GG	C	G			OR=2,43 (IC <sub>95%</sub> =1,32-4,46) $p=0,004$	
TNFA - 238	AA	AG	GG	A	G				
TNFA - 308	AA	AG	GG	A	G				
RNASEL	AA	AG	GG	A	G			OR=0,31 (IC <sub>95%</sub> =0,10-0,91) $p=0,034$	
INFG +874	AA	AT	TT	A	T				
XRCC1 194	TT	TC	CC	T	C			OR=2,26 (IC <sub>95%</sub> =1,40-10,45) $p=0,02$	
XRCC1 399	AA	AG	GG	A	G	OR=3, 03 (IC <sub>95%</sub> =1,60-5,71) $p=0,001$			
	AA	AG	GG	A	G	OR=0, 25 (IC <sub>95%</sub> =0,09-0,71) $p=0,009$		OR=0, 48 (IC <sub>95%</sub> =0,25-0,90) $p=0,023$	
	AA	AG	AA	A	G	OR=5, 34 (IC <sub>95%</sub> =2,31-12,32) $p=0,000$			
IL 10 - 1082	AA	AG	GG	A	G				
FAS -670	AA	AG	GG	A	G			OR=2,25 (IC <sub>95%</sub> =1,06-4,80) $p=0,035$	OR=2,53 (IC <sub>95%</sub> =1,07-5,97) $p=0,035$
FASL -844	CC	CT	TT	C	T				

- REFERENCIAS-
-  Marcador no asociado con las lesiones cervicales o con la infección por VPH
  -  Marcador asociado con las lesiones cervicales y/o con la infección por VPH
  -  Genotipo y/o alelo que otorga un riesgo incrementado de desarrollo de lesiones cervicales y/o infección por VPH
  -  Genotipo y/o alelo que otorga una disminución en el riesgo de desarrollo de lesiones cervicales y/o infección por VPH

Al comparar las frecuencias genotípicas del SNP +874 del gen *INF-gamma* entre controles y carcinomas, se observó una disminución en el riesgo de desarrollo de cáncer cervical otorgado por el genotipo homocigota AA (OR=0,34; IC<sub>95%</sub>=0,11-1,06). No obstante, este resultado no alcanzó una significancia estadística ( $p=0,067$ ).

Cuando se analizó la distribución genotípica de los polimorfismos de acuerdo a la infección por VPH (infectados–no infectados) dentro del grupo control, no se encontraron diferencias significativas ( $\chi^2=0,57$ ;  $p>0,05$ ). Sin embargo, en lo que respecta al polimorfismo -670 (A/G) del gen *FAS*, los individuos portadores del genotipo homocigota AA presentaron un incremento en el riesgo de infección por VPH (OR=2,53; IC<sub>95%</sub>=1,07-5,97;  $p=0,035$ ), comparado con los individuos homocigotas GG.

**Tabla 25-** Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) y su relación con el riesgo de infección viral.

FAS	CONTROLES		
-670 (G/A)	VPH (+) (%)	VPH (-) (%)	OR (IC) 95% ajustado por edad
AA	23 (31, 6%)	24(18, 9%)	OR=2,53 ( IC <sub>95%</sub> =1,07-5,97) p=0,035*
AG	35 (47, 9%)	70 (55, 2%)	OR=1,10 (IC <sub>95%</sub> =0,53-2,28) p=0,94
GG	15 (20, 5%)	33 (25, 9%)	1 (referencia)
TOTAL	73 (100, 0%)	127 (100, 0%)	

#### 4.3. Interacciones inter-alélicas entre SNPs

Una segunda etapa en el análisis consistió en evaluar el efecto de la interacción entre los SNPs en estudio, sobre el riesgo de desarrollo de cáncer cervical. Para ello se utilizó una nueva metodología, la cual crea un atributo único (variable) que codifica todas las combinaciones posibles de los genotipos y lo correlaciona con el desarrollo de la enfermedad. Este enfoque tiene una ventaja importante: puede detectar interacciones entre polimorfismos, incluso en ausencia de efectos principales. Este método denominado Reducción de la Dimensionalidad Factorial, o MDR (del inglés *Multifactor Dimensionality Reduction*), permite analizar dichas interacciones de una manera no-paramétrica.

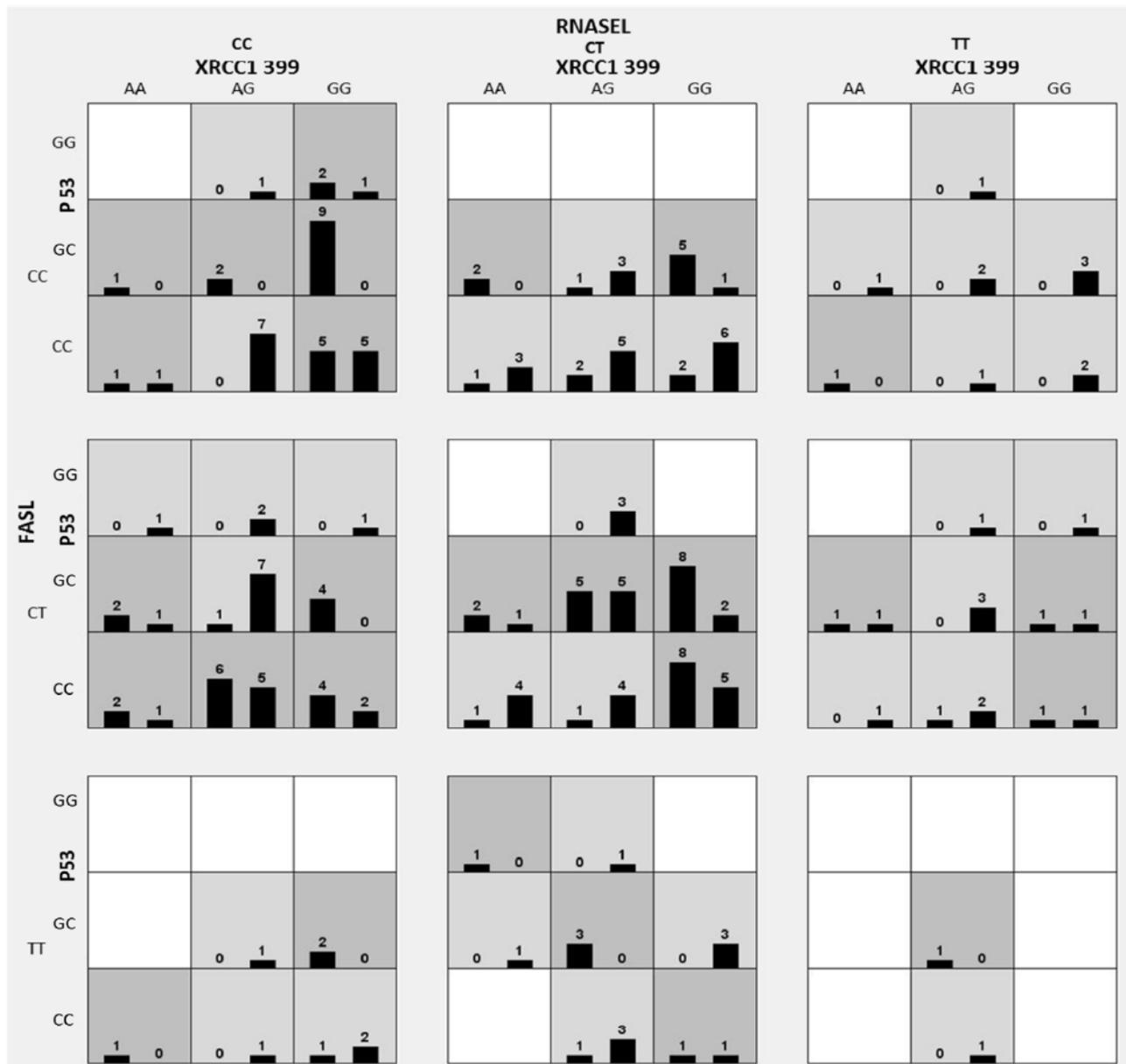
Para este tipo de estudio se ingresan todas las combinaciones de genotipos de los polimorfismos en estudio y se calcula la relación entre controles y casos. Si no existe interacción entre los genes las combinaciones se distribuyen independientemente, y la

probabilidad de encontrar un casillero con mayor número de casos que controles es igual a la probabilidad de que salga cara o cruz al tirar una moneda (TA=0,5).

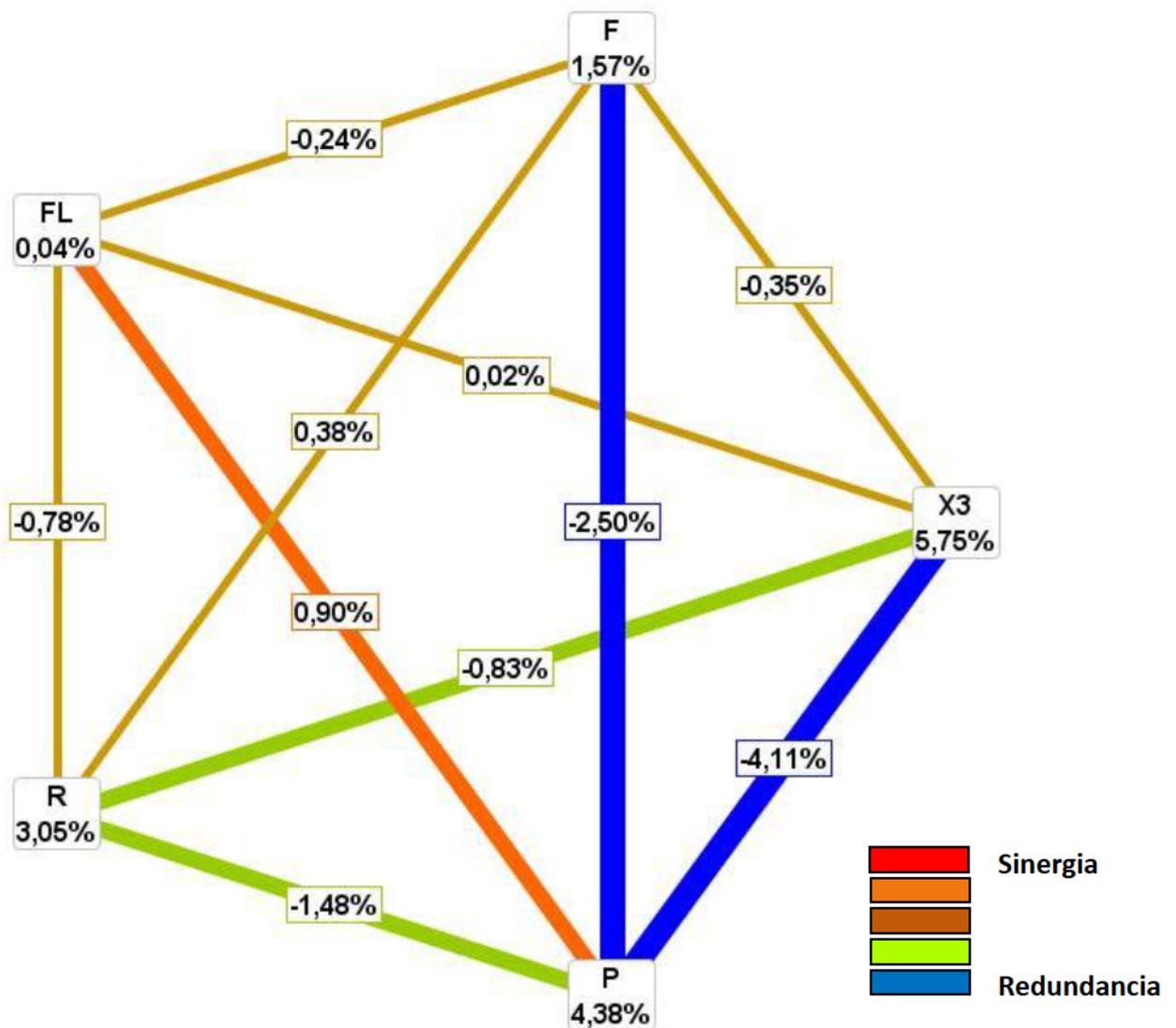
Para este conjunto de datos, el modelo de cuatro-factores (cuatro-loci) conformado por FASL-P53-RNASEL-XRCC1399 fue estadísticamente significativo (TA=0,61;  $p<0,05$ ). La consistencia del análisis fue óptima (Consistencia de validación cruzada= 9/10). **La figura 28** resume las combinaciones de genotipos asociadas al riesgo de desarrollo de cáncer cervical.

Además, se realizó un análisis de entropía para evaluar qué tipo de efectos estaban representados en este modelo de cuatro-factores. El gráfico de entropía resultante de este análisis se muestra en la **Figura 29**. Cada nodo representa un SNP, y el valor de entropía la fuerza del efecto principal o individual de dicho SNP. La línea que conecta dos SNPs y su valor de entropía representan la interacción entre estos dos polimorfismos y la fuerza de esta interacción. Los valores negativos de entropía que se encuentran en el gráfico, indican que existe una pérdida de información como resultado de redundancia y/o correlación entre los genes (por ejemplo la existencia de desequilibrio de ligamiento entre ellos). Un valor positivo de entropía indica una ganancia de información o sinergia, lo cual representa interacciones no aditivas entre los genes.

En el gráfico se observa que la interacción entre los SNPs de FASL y P53 presenta un valor positivo de entropía (0,90%), lo que está indicando que existe una interacción sinérgica entre estos polimorfismos en relación al riesgo de desarrollo de la enfermedad. Si bien el efecto principal del SNP de P53 es mayor que el efecto resultante de la interacción entre los dos polimorfismos, el análisis de entropía demuestra que el SNP de FASL interactúa con P53 para conferir de esta manera, un incremento en el riesgo de desarrollo de la neoplasia cervical.



**Figura 28-** Resultados del análisis de MDR para las interacciones genotípicas de los SNPs en estudio y su asociación con el cáncer cervical. En este modelo de cuatro-loci (cuatro-factores) podemos observar dentro de cada cuadro que las barras izquierdas representan los casos y las derechas los controles. El valor sobre las barras describe el número de individuos. Los cuadros grises oscuros son considerados combinaciones genotípicas de “alto riesgo”, mientras que los cuadros grises claros como combinaciones genotípicas de “bajo riesgo”.



**Figura 29-** El análisis de descomposición de la entropía describe el porcentaje de entropía que es explicada por cada SNP y por la interacción entre SNPs, dentro de la población en estudio. Un porcentaje positivo de entropía indica ganancia de información o sinergia. Sin embargo, un porcentaje negativo indica redundancia o pérdida de información. El esquema de coloración representa un continuo desde la sinergia (rojo, representando una interacción no aditiva), a la redundancia (azul, representando pérdida de información). Referencias: **F**=FAS, **FL**=FASL, **X3**=XRCC1 399, **P**=P53, **R**=RNASEL.

# ***Discusión***

### **5.1. Cáncer Cervical y su relación con el Virus del Papiloma Humano**

El cáncer de cuello uterino es una de las enfermedades neoplásicas más comunes que afectan a las mujeres, con una incidencia mundial que la sitúa en segundo lugar en relación al cáncer de mama. Para el año 2012 se estimaron 528.000 nuevos casos y 266.000 muertes. Más del 85% de la carga viral mundial ocurre en países en vías de desarrollo. Las regiones de alto riesgo incluyen el centro y sur de Asia, sudeste y este de África, América Central y la parte tropical de América del Sur (Vinodhini, 2012).

El cáncer cervical ha sido objeto de estudio desde el siglo XIX y los factores etiológicos de esta enfermedad permanecieron desconocidos hasta principios de la década del 90. Las investigaciones dirigidas hacia el estudio de la etiología de esta neoplasia han mostrado un progreso substancial en las últimas tres décadas. Por mucho tiempo, esta enfermedad fue reconocida como una infección de transmisión sexual, y muchos microorganismos fueron propuestos como posibles agentes etiológicos, incluyendo bacterias de los géneros *Treponem*, *Neisseria*, *Chlamydia trachomatis* y el Virus del Herpes simplex Tipo 2 (HSV-2) (Bosch et al., 2002).

Uno de los descubrimientos de mayor importancia en la etiología del cáncer humano, ha sido el reconocimiento de que el cáncer cervical es una rara consecuencia de una infección no resuelta causada por algunos tipos de VPH. En términos de salud pública, este hallazgo es igual de importante como lo fue el descubrimiento de la asociación entre el consumo de cigarrillo y el cáncer de pulmón, o entre infecciones crónicas por Hepatitis B o C y el riesgo de cáncer hepático (Bosch *et al.*, 2002).

A partir del primer estudio en el cual se señaló el posible rol del VPH como agente etiológico del cáncer cervical (zur Hausen, 1977), se ha logrado obtener un gran número de evidencia concerniente al rol central de este virus en dicha patología. Por otra parte, los estudios epidemiológicos han permitido identificar la relación cercana entre el virus

y la enfermedad. El progreso que se ha logrado en el campo de la biología molecular permitió establecer varias vías de interacción entre el VPH y la célula huésped. (Stoler et al., 2000; zur Hausen, 2002). Además, el genoma viral completo ha sido secuenciado y las funciones proteicas han sido identificadas, indicando que el genoma del VPH codifica al menos seis proteínas tempranas diferentes y dos tardías (Scheffner et al., 1994). Asimismo, casi todas las funciones de los genes virales fueron establecidas, y los blancos moleculares de las células infectadas han sido reconocidos en su mayoría (zur Hausen, 2002). Sin embargo, varios aspectos de la infección viral y la transformación celular aún no son comprendidos en su totalidad (Ferber et al., 2003).

En el presente trabajo, la prevalencia del virus en la población estudiada fue de 68,3%, correspondiendo el 70,8% a infecciones con tipos virales de alto riesgo o carcinogénicos.

En las pacientes con citología normal, correspondientes al grupo control, se detectó un 36,5 % de muestras ADN-VPH positivas, siendo los tipos virales más frecuentes el 16 y el 18 con una prevalencia de 51,2% y 17,4% respectivamente.

Un meta-análisis publicado recientemente, que incluyó más de 70 estudios, estimó que la prevalencia total de VPH en mujeres con citología normal, estaría alrededor del 10,4%. Las estimaciones correspondientes por región fueron: 22,1% en África, 20,4% en América central y México, 11,3% en América del Norte, 8,1% en Europa y 8% en Asia (de Sanjosé *et al.* 2007). Para nuestro país, se sugieren prevalencias que van desde el 17% en Concordia (Matos *et al.*, 2003), 26% en Ushuaia (Sijvarger *et al.*, 2006) y un 43% y 46% en ciudades como Posadas y La Plata, respectivamente (Tonon *et al.*, 1999; Tonon *et al.*, 2003; Abba *et al.*, 2003). Tonon y col. (2003) reportaron como tipo viral más frecuente al VPH-16 (23%) coincidiendo esto con lo estimado por Sijvarger y col. (2006). Otros estudios sugieren prevalencias más altas del VPH tipo 16, como en el caso

de mujeres quechuas jujeñas (52%) (Picconi *et al.*, 2002). Estas variaciones en cuanto a la frecuencia de los principales tipos virales podría ser explicada por la composición de las poblaciones estudiadas, por los hábitos culturales y/o la localización geográfica (Bosch y de Sanjosé, 2002).

La gran sensibilidad del análisis molecular utilizado para la detección del ADN del VPH, permitió detectar un considerable número de mujeres mayores a 30 años, infectadas con VPH de Alto Riesgo (29,3%) pero sin signos cito/colposcópicos de lesión. La importancia de estas infecciones preclínicas con virus de alto riesgo varía con la edad de la paciente, ya que en mujeres menores a 30 años se trata, en su mayoría, de infecciones transitorias con mínimo riesgo de progresión. Sin embargo, las mujeres de mayor edad, en las que estos virus se establecen con infecciones persistentes, pueden desarrollar con el tiempo lesiones premalignas incrementándose el riesgo de progresión a los estadios iniciales de una neoplasia cervical [Abba *et al.*, 2003].

Por otra parte, en el grupo de pacientes con carcinomas cervicales el presente estudio arrojó prevalencias de ADN-VPH del 86,0%. La estimación del riesgo relativo de desarrollo de cáncer cervical adjudicada a la infección con VPH, resultante de la comparación de prevalencias del VPH entre el grupo control y el de casos, dio un OR=35,6 (OR ajustado por edad); IC=10,5-120,5 ( $\chi^2 = 58,2$  p<0,05).

La prevalencia de VPH-16 en mujeres con cáncer de cuello uterino, oscila entre el 50% y el 70% en muchos países, seguida por la del VPH-18, con valores entre el 10% al 12% [Bosh y de Sanjosé, 2002]. Un meta análisis reciente, llevado a cabo por Picconi y col (2011) acerca de la prevalencia del VPH en América latina y el Caribe, reportó valores de prevalencia de 53,2% para el HPV-16 y 13,2% para el HPV-18 en muestras con cáncer de cuello uterino, confirmando que son el primer y segundo tipo viral más frecuentes en pacientes con esta enfermedad. Para Argentina, la prevalencia del HPV-16

en muestras de cáncer fue de 59,5% (resultado obtenido del análisis combinado de 10 estudios), mientras que se encontraron valores de 53,2% para Brasil y 54,9% para México [Ciapponi et al., 2011]. En el presente estudio, se detectó un 65,1% de muestras infectadas con VPH-16 en el grupo compuesto por carcinomas cervicales escamosos, lo que estuvo en concordancia con resultados publicados previamente por Abba y col. (2003) (prevalencia para VPH-16 de 67%).

En el 6,4% del total de muestras infectadas con VPH no se pudo determinar si correspondían a infecciones mixtas, variantes nuevas u otros tipos virales distintos de los ensayados. Si bien se incluyeron como controles los VPH más frecuentes en muestras normales y carcinomas, otros tipos virales parecen estar circulando en la población estudiada.

## **5.2. Vacuna contra el VPH**

Dentro de las medidas implementadas para la prevención del cáncer de cuello uterino, la detección de lesiones cervicales premalignas mediante Papanicolau (PAP) y colposcopia han demostrado ser intervenciones muy exitosas que lograron disminuir la incidencia y mortalidad en el mundo entero. Con el objetivo de reducir la carga de la enfermedad relacionada con la infección por VPH se han desarrollado vacunas no infecciosas, adyuvadas, compuestas por partículas similares al virus (VLPs, del inglés *Virus-Like Particles*) de HPV 16, 18, 6 y 11 (tetraivalente) y de HPV18 y 16 (bivalente). Su aparición generó un enorme entusiasmo en la comunidad médica y el público en general. En los últimos años se han incorporado en los calendarios oficiales de vacunación de numerosos países, (UNICEF, 2011) entre los que se encuentra la Argentina.. El hecho de contar con una vacuna eficaz y segura, capaz de prevenir lesiones asociadas a los tipos 16 y 18 de VPH, es prometedor, aunque aún no existe

evidencia suficiente que respalde el reemplazo de las técnicas de *screening* de rutina por la vacuna (Rey-Ares et al., 2012). Debido a que su eficacia a largo plazo para prevenir la aparición de cáncer de cuello uterino aún no ha sido completamente probada, sólo el seguimiento de las cohortes de pacientes vacunadas mostrarán en un futuro la eficacia real en su prevención.

### **5.3. La carcinogénesis cervical como proceso multifactorial**

Numerosos estudios epidemiológicos, clínicos y de biología molecular han asociado la infección por VPH con el cáncer cervical y sus lesiones precursoras. Sin embargo, la alta prevalencia de la infección por VPH en la población general respecto de la incidencia del carcinoma cervical, muestra que la gran mayoría de las mujeres infectadas con VPH en cualquier momento de su vida, no llegarán a desarrollar una neoplasia intraepitelial severa o cáncer cervical. De esta manera solo una pequeña proporción de mujeres que cursan infecciones persistentes con tipos de VPH de alto riesgo tendrán mayor probabilidad de desarrollar lesiones malignas y displasias progresivas.

Teniendo en cuenta el papel principal que juega la infección por VPH en el desarrollo de la neoplasia cervical, podrían reconocerse características inherentes a la infección viral y por otra parte características inherentes al hospedador, que sumadas a otros co-factores determinarían el riesgo de desarrollar el cáncer cervical.

Entre las características intrínsecas al VPH podrían mencionarse los distintos tipos de bajo y alto riesgo, las variantes genéticas de los tipos virales de alto riesgo, la capacidad de desarrollar infecciones con alta carga y/o de integración del genoma. Por otra parte, dentro de las características inherentes al hospedador podría reconocerse a la constitución genética (susceptibilidad o resistencia a la infección por VPH, etc.) que

junto a las condiciones sanitarias, nutricionales, hormonales y de comportamiento sexual, describirían un estatus fisiológico y principalmente inmunológico sobre el cual la infección por VPH tendría diferentes chances de desarrollar la neoplasia cervical.

Existe gran cantidad de evidencia que demuestra que la combinación de ciertos polimorfismos en genes de baja penetrancia podría contribuir en un porcentaje importante a la susceptibilidad de desarrollo de cáncer (Kotnis et al., 2005). Por lo tanto, la susceptibilidad individual al desarrollo de cáncer estaría principalmente determinada por el medio ambiente, y la combinación de polimorfismos de susceptibilidad o resistencia al cáncer, presentes en una variedad de genes de baja penetrancia (Ewart-Toland et al., 2004). El impacto que poseen estos polimorfismos en el riesgo de desarrollo de cáncer y su contribución en la eficiencia de las distintas terapias, son hoy objeto de numerosos estudios. Como se ha mencionado, la infección persistente con el Virus del Papiloma humano es un prerrequisito para la carcinogénesis cervical. Por lo tanto, las diferencias genéticas del hospedador, que influyan en la respuesta contra la infección viral, podrían determinar un mayor riesgo de desarrollo de lesiones cervicales y progresión hacia un carcinoma invasor. De esta manera, los polimorfismos genéticos presentes en genes relacionados a la infección viral, a la respuesta inmune, a los sistemas de reparación del ADN, y aquellos genes supresores de tumores, podrían influenciar y determinar un riesgo aumentado de desarrollo de la neoplasia cervical (Hemminki et al., 2004; Horng et al., 2004).

Por estas razones, resulta apremiante la identificación de dichos genes, con el fin de entender completamente la biología de esta enfermedad, tanto para el desarrollo de nuevas terapias y métodos de prevención, como para la detección del cáncer. El uso de marcadores moleculares, particularmente SNPs, promete brindar una poderosa

herramienta para el análisis del genoma humano, con el objetivo de identificar aquellos genes o regiones genómicas fuertemente asociadas al cáncer cervical.

#### **5.4. Polimorfismos De Nucleótido Simple y su relación con el Cáncer Cervical**

En el presente trabajo se evaluó el impacto de los Polimorfismos de Nucleótido Simple presentes en los genes FAS, FASL, IL10, TNF- $\alpha$ , P53, RNASEL, INFG Y XRCC1 en relación a la susceptibilidad para el desarrollo de cáncer cervical y la infección por el virus del Papiloma humano. Para ello se llevo a cabo un estudio tipo caso-control, el cual comprendió el análisis de 200 muestras de mucosa cervical normal, 100 Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado (LGSIL), 72 Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (HGSIL) y 140 muestras correspondientes a Carcinomas Cervicales Escamosos (SCC).

Los resultados obtenidos indicaron que los polimorfismos presentes en los genes TNF- $\alpha$  (-308 (G/A) y -238 (G/A)), IL-10 (-1082 (G/A)), Interferón gamma (SNP + 874 (T/A)) y FASL (-844 (T/C)), no mostraron asociación con el desarrollo de cáncer cervical.

En lo que respecta a los polimorfismos en los genes que codifican citoquinas (IL10 y TNF- $\alpha$ ) varios estudios experimentales han demostrado la importancia de las variantes funcionales en estos genes. De esta manera, diferentes trabajos han evaluado el rol de los polimorfismos de TNF- $\alpha$  en la neoplasia cervical y han demostrado que tanto el alelo A, como el genotipo homocigota AA de TNF- $\alpha$  -308 se encuentran asociados con un aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer cervical. De manera similar, el SNPs -238 de TNF- $\alpha$  se encontró asociado a la neoplasia cervical, otorgando en este caso un efecto protector contra la enfermedad (Liu et al., 2012; Badano et al., 2012). Sin embargo, en el presente estudio las frecuencias alélicas de TNF- $\alpha$  -308 observadas para

mujeres de Argentina, difirieron de aquellas reportadas por Badano y col (2012), y la falta de asociación entre dicho polimorfismo y el carcinoma de cuello uterino esta en concordancia con los resultados obtenidos en poblaciones africanas (Govan et al., 2006; Stanczuk et al., 2003) y caucásicas (Ivansson et al., 2010; Calhoun et al., 2002; Barbisan et al, 2012).

El efecto del polimorfismo IL-10 -1082 sobre el riesgo de cáncer cervical también ha resultado ser controversial. Este polimorfismo ha sido asociado con el desarrollo de la neoplasia cervical en poblaciones de Zimbabue y Japón (Stanczuk et al., 2001; Matsumoto et al., 2010), mientras que estudios realizados en Holanda (Zoodsma et al., 2005), Sudáfrica (Govan et al., 2003) y Hungría (Szöke et al., 2004) no demostraron asociación con el desarrollo de la enfermedad. Las discrepancias encontradas entre los distintos estudios pueden ser explicadas por las diferencias en la frecuencia del alelo G en los controles sanos, la cual difiere enormemente de acuerdo a la etnia estudiada. La frecuencia del alelo G obtenida en este trabajo (0,34) fue similar a la reportada por Poli y col (2002) en una población de mujeres caucásicas de Italia (0,37) (Poli et al., 2002), demostrando una falta de asociación de este polimorfismo con el riesgo de cáncer cervical.

A pesar de existir evidencia que apoya la asociación entre los polimorfismos en los genes FAS/FASL y el cáncer cervical, esta relación ha mostrado variaciones entre las distintas poblaciones y los diferentes estudios publicados. Los mayores valores de riesgo han sido encontrados en poblaciones de países asiáticos. En este sentido, tanto Sun y col. (2005) (Sun et al., 2005), como Liu y col (2009) (Liu et al., 2009) encontraron que los pacientes con el genotipo FasL- 844CC presentan un mayor riesgo de desarrollo de cáncer cervical que aquellos individuos portadores del genotipo FasL- 844TT. Contrariamente a estos resultados, dos meta análisis recientes revelaron una

falta de asociación de este polimorfismo con el riesgo de cáncer cervical (Wang et al., 2014; DU et al., 2013). De la misma manera, y en concordancia con otros estudios (Pérez *et al.*, 2006; Chatterjee et al., 2009), en el presente trabajo no se encontró una asociación entre el SNP -844 de FasL y la neoplasia cervical cuando se compararon controles con carcinomas.

Entre los polimorfismos presentes en el gen IFN- $\gamma$ , el SNP +874 T/A ha sido el más ampliamente estudiado. Este polimorfismo puede influenciar la secreción de esta citoquina y por lo tanto se cree que podría estar asociado con diferentes tipos de cáncer. Un meta análisis reciente estudió la asociación entre el polimorfismo +874 T/A de INFG y la susceptibilidad de desarrollo de cáncer, obteniendo como resultado un aumento en el riesgo solo para el caso de la neoplasia cervical (Mi et al., 2011). Asimismo, un estudio realizado por Gangwar y col (2009) reveló que tanto el alelo A, como el genotipo homocigota AA estarían asociados con un riesgo incrementado de cáncer cervical (OR= 2,43, P =0,003) (Gangwar et al., 2009). Este genotipo se encuentra asociado a una baja producción de IFN- $\gamma$ , y en los pacientes con cáncer cervical una disminución en la expresión intratumoral de IFN- $\gamma$  ha sido relacionada con un peor pronóstico de la enfermedad (Tartour et al., 1998; Gey et al., 2003) Contrariamente a estos resultados, en el presente trabajo se observó una disminución del riesgo de desarrollo de cáncer cervical en aquellos individuos portadores del genotipo homocigota AA (OR=0,34; IC<sub>95%</sub>=0,11-1,06). No obstante, este resultado no alcanzó una significancia estadística ( $p=0,067$ ).

Por otra parte, el análisis de aquellos SNPs presentes en los genes FAS, p53, RNASEL y XRCC1 demostró que existe una asociación entre estos polimorfismos y la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad cervical en la población estudiada.

#### 5.4.1. Polimorfismo Arg72Pro de P53

La asociación entre el polimorfismo en el codón 72 de P53 y el cáncer cervical ha sido intensamente estudiada desde el primer trabajo realizado por Storey y col. en el año 1998. Este polimorfismo, que resulta en el reemplazo de una arginina por una prolina en la secuencia aminoacídica de la proteína, posee importantes consecuencias, al menos demostradas *in vitro*, en propiedades químicas y funcionales de la proteína. Estudios tempranos revelaron que la variante prolina es menos eficiente que la arginina en algunas actividades relevantes de p53, como ser la supresión de la transformación celular y la inducción de apoptosis (Thomas *et al.*, 1996). Evidencia adicional fue aportada por Storey y col. (1998), quienes demostraron que la variante alélica arginina del gen *p53* (codón 72) es más susceptible a la degradación por la proteína E6 del VPH que la forma prolina, y que pacientes con la primera isoforma poseen un riesgo incrementado de cáncer cervical. Sin embargo, los trabajos subsecuentes han resultado controversiales, algunos apoyando y otros refutando dicha hipótesis (Jee *et al.*, 2004; Koushik *et al.*, 2004).

En el presente estudio, se encontró que el genotipo heterocigota Arg72Pro de P53 está asociado con un aumento en el riesgo de desarrollo de cáncer cervical (OR= 2,43  $p=0,004$ ). Esta diferencia se mantuvo, aun cuando los datos fueron ajustados por edad y por infección con VPH. Resultados similares fueron reportados por Klug et al. (Klug et al., 2001) y por Kim et al. (Kim et al., 2000), quienes también encontraron un incremento en el riesgo de desarrollo de cáncer cervical asociado al genotipo heterocigota Arg72Pro (Barbisan *et al.*, 2011). Una explicación posible para estos resultados podría ser que la proteína P53 actúa en forma tetramérica, con lo cual puede presumirse que el heterotetrámero formado en las células de aquellos individuos heterocigotas para este polimorfismo tendría una menor eficiencia biológica que

aquellos tetrámeros formados en individuos con genotipos homocigotas (Mabrouk et al., 2003).

Contrariamente a los resultados anteriores, una gran cantidad de estudios epidemiológicos no han encontrado asociación entre el polimorfismo del codón 72 y el incremento en la susceptibilidad al cáncer cervical o a la infección por VPH (Hayes et al., 1998; Yamashita et al., 1999; Malcolm et al., 2000; Madeleine et al., 2000; Dybikowska et al., 2000; Wong et al., 2000; Ngan et al., 2000; Abba et al., 2003; Oliveira et al., 2008).

Hasta la fecha, más de 90 investigaciones han sido publicadas, y sólo algunos han alcanzado los resultados iniciales obtenidos por Storey y colaboradores.

#### **5.4.2. Polimorfismo del codón 462 del gen *RNASEL***

El polimorfismo del codón 462 del gen *RNASEL* ha despertado gran interés por su frecuente asociación con el cáncer de próstata familiar y esporádico (Madsen et al., 2008). Evidencia proveniente de experimentos *in vitro* ha demostrado que la variante Gln (alelo A) posee una actividad enzimática tres veces menor que la variante arginina, y menor eficiencia en la inducción de apoptosis en ensayos con líneas celulares, permitiendo a las células escapar de una potente vía apoptótica (Xiang et al., 2003). Numerosos estudios han vinculado al genotipo homocigoto AA (Gln/Gln) del codón 462, con un riesgo incrementado para el desarrollo de cáncer de próstata (Casey et al., 2002; Rökman et al., 2002). Por su papel como gen supresor de tumores, varios autores han postulado que Rnase L podría estar asociado a otras enfermedades malignas, sin embargo hasta la fecha, pocos estudios han sido publicados con la variante Arg462Gln fuera del cáncer de próstata. Algunos autores han encontrado que la asociación de este polimorfismo depende ampliamente de la etnia (Shook et al., 2007) y de la edad de los

individuos (Krüger *et al.*, 2005). Sin embargo de acuerdo a otros grupos, los resultados son cuestionables (Wiklund *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006, Shea *et al.*, 2008).

La actividad anti-viral que presenta *RNASEL* ha llevado a estudiar los polimorfismos presentes en este gen en relación a carcinomas asociados con la infección de diversos virus, como el virus del Papiloma humano (Pandey *et al.*, 2004).

Madsen y colaboradores (2008) han explorado varios polimorfismos de *RNASEL* en carcinomas de cabeza y cuello, de cuello uterino y de mama. En ninguno de estos casos se encontró asociación con el polimorfismo Arg462Gln.

Para el caso de la neoplasia cervical, los resultados obtenidos en este trabajo revelaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas entre pacientes y controles. Contrariamente a los resultados reportados anteriormente, el genotipo homocigota AA (Gln/Gln) presentó un OR=0,31, sugiriendo que el polimorfismo Arg462Gln del gen *RNASEL* posee un rol protector, disminuyendo de esta manera la susceptibilidad al desarrollo de cáncer cervical en aquellos individuos portadores del genotipo heterocigota.

Hasta la fecha, han sido escasos los trabajos publicados, en los que se explora el rol del polimorfismo Arg462Gln de *RNASEL* en el cáncer cervical.

#### **5.4.3. Polimorfismos en el gen *XRCC1***

Varios estudios han centrado su atención en la identificación del efecto de los SNPs presentes en diversos genes del sistema de reparación del ADN, sugiriendo que estos polimorfismos pueden afectar la susceptibilidad individual al cáncer.

El polimorfismo en el codón 399 de *XRCC1* ha sido ampliamente investigado en relación a diversos tipos de cáncer. Se cree que la variante alélica *Gln* (alelo A) reduce

la actividad de reparación del ADN y por lo tanto conduce a un aumento del daño en el material genético (Li et al., 2009). Este polimorfismo genético ha sido relacionado con un riesgo incrementado de cáncer de pulmón (Schneider et al., 2008; Divine et al., 2001), cáncer de estómago (Shen et al., 2000), y cáncer de cabeza y cuello (Sturgis et al., 1999). Sin embargo, otros estudios han asociado a este polimorfismo con una disminución en el riesgo de desarrollo de cáncer de vejiga (Stern et al., 2001), cáncer de esófago (Sobti et al., 2007), cáncer de piel no-melanoma (Nelson et al., 2002) y cáncer de cabeza y cuello (Olshan et al., 2002).

En el presente trabajo se encontró una asociación significativa donde el genotipo heterocigota Arg399Gln (AG) de XRCC1 estaría actuando como factor protector, otorgando una menor susceptibilidad frente al desarrollo de la neoplasia cervical (OR=0,48  $p=0,023$ ). Estos resultados son consistentes con aquellos estudios que reportaron una disminución en el riesgo de desarrollo de cáncer para este polimorfismo (Stern et al., 2001; Sobti et al., 2007; Nelson et al., 2002; Olshan et al., 2002; Barbisan et al., 2010). Si bien fue demostrado que el alelo Gln (A) disminuye la eficiencia de la proteína XRCC1, los resultados obtenidos en este estudio muestran que el genotipo heterocigota Arg399Gln estaría proporcionando una reducción en el riesgo de desarrollo de cáncer cervical. Un modelo interesante para explicar estos resultados fue propuesto por Stern y col. (Stern et al., 2001), quienes hipotetizaron que aquellas células portadoras de la variante heterocigota, al sufrir un daño oxidativo excesivo tendrían una habilidad reducida para reparar el daño en el ADN, y serían más susceptibles a sufrir apoptosis o senescencia. Por lo tanto, esta eficiencia reducida podría convertirse en una “ventaja”, si actuaría previniendo la transmisión y la expansión clonal de las mutaciones que pudieran surgir durante el mecanismo de Reparación por Escisión de Base (BER).

Sin embargo, otros estudios epidemiológicos reportaron resultados contrarios. Entre ellos, dos estudios de tipo caso-control realizados en mujeres asiáticas (Huang et al., 2007; Niwa et al., 2005) revelaron que los individuos con genotipo homocigota *Gln399Gln* (AA) para *XRCC1* se encontraban con un riesgo incrementado de desarrollo de carcinoma cervical. Resultados similares fueron informados en dos meta-análisis recientes (Mei et al. 2014; Li et al., 2012), donde se reportó un riesgo incrementado de desarrollo de carcinoma de cuello uterino asociado a los polimorfismos *Arg194Trp* y *Arg399Gln* de *XRCC1*, en poblaciones asiáticas.

Vale la pena remarcar que las frecuencias genotípicas observadas en este trabajo son notablemente diferentes de aquellas reportadas para las poblaciones asiáticas. Esta diferencia significativa en la distribución de las frecuencias genotípicas entre poblaciones Caucásicas y Asiáticas ya ha sido verificada por otros autores (Hu et al., 2005) y podría explicar las discrepancias encontradas entre los distintos estudios.

En cuanto a las lesiones cervicales, se observó que tanto el alelo *Gln* (A) como el genotipo homocigota para este mismo alelo *Gln/Gln* (AA) otorgan un incremento significativo en el riesgo de desarrollo de lesiones de bajo grado (LSIL). Ha sido demostrado que el alelo *Gln* (alelo A) reduce los niveles de expresión de la proteína XRCC1 y la actividad de reparación del ADN de la misma (Vodicka et al., 2007), y por lo tanto conduce a un aumento del daño en el material genético (Rodriguez et al., 2003). En un trabajo reciente, Bajpai y col. (2013) observaron que existe una disminución progresiva en la expresión de los genes de reparación, desde las lesiones precancerosas (LSIL y HSIL) al carcinoma invasor. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados observados podemos hipotetizar que la reducción en la expresión de estos genes estaría

jugando un rol importante en la carcinogénesis cervical y se encontraría asociada a un evento temprano en la progresión al cáncer cervical.

Por el contrario, se observó que el genotipo heterocigota *Gln/Arg* (A/G) de este mismo polimorfismo estaría actuando como factor protector, confiriendo una menor susceptibilidad frente al desarrollo de lesiones de bajo grado (LSIL). Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos en este trabajo, al comparar las frecuencias genotípicas de XRCC1 *Arg399Gln* entre controles y carcinomas.

En lo concerniente al polimorfismo *Arg194Trp* de XRCC1, varios trabajos epidemiológicos han reportado resultados controversiales en relación a este SNP y su asociación con la susceptibilidad al desarrollo de diferentes neoplasias. Algunos autores informaron que el genotipo homocigota *Trp194Trp* (TT) estaría asociado con un incremento en el riesgo de ciertos carcinomas, incluyendo el carcinoma colorrectal y el carcinoma esofágico. (Abdel-Rahman et al., 2000; Xing et al., 2002). Por el contrario, este genotipo ha sido considerado en otras investigaciones como un factor protector en el desarrollo del carcinoma gástrico (Ratnasinghe et al., 2004) y del carcinoma de vejiga (Andrew et al., 2006). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el genotipo *Trp194Trp* + *Arg194Trp* (TT+TC) del gen XRCC1 otorgaría un incremento significativo en el riesgo de desarrollo de carcinoma cervical (OR=2,26  $p=0,02$ ). Este polimorfismo ocurre en un sitio conservado evolutivamente, e involucra una sustitución aminoacídica. Se puede pensar que esta sustitución podría ocasionar un cambio importante en la función de reparación de la proteína, y afectar de esta manera la susceptibilidad individual al cáncer. Dos meta análisis recientes encontraron resultados similares. Mei J. y col (2014) (Mei et al., 2014) reportaron un aumento significativo en el riesgo de carcinoma cervical otorgado por el genotipo *Trp194Trp* (TT), mientras que Shuai y col. (2012) (Shuai et al., 2012) encontraron asociación entre este polimorfismo

y el riesgo de cáncer cervical, reportando mayor susceptibilidad para poblaciones asiáticas.

Ya sea que los polimorfismos presentes en el gen *XRCC1* se encuentren asociados con un riesgo incrementado o reducido de desarrollo de cáncer podría ser función del tipo de tumor y de su localización, así como de las discrepancias genéticas entre las distintas poblaciones en estudio.

#### **5.4.5. Polimorfismos en los genes *FAS* y *FASL***

El SNP -670 A/G presente en el promotor del gen *FAS* está situado en un sitio de unión de la señal de activación de Interferón gamma (GAS), el cual es responsable de la activación de la vía IFN-STAT-1 (transductor de señales y activador de la transcripción). Ha sido demostrado que el alelo G de *FAS* -670 interrumpe el sitio de unión del factor de transcripción STAT1, disminuyendo de esta manera la actividad del promotor, así como el nivel de expresión génica de *FAS* (Huang et al., 1997; Sibley et al., 2003; Kanemitsu et al., 2002). Debido a esto, varios trabajos han asociado los SNPs presentes en los genes *FAS* y *FASL* con enfermedades autoinmunes (Goodman et al., 2001; Huang et al., 1999), neoplasias hematológicas (Sibley et al., 2003), y con tumores sólidos, como cancer de esófago (Sun et al., 2004) y cáncer de pulmón (Wang et al., 2003). Para el caso del cáncer cervical, si bien los resultados varían de acuerdo a la población en estudio, los riesgos más elevados fueron encontrados en poblaciones de origen asiático. En un estudio reciente realizado en una cohorte de 354 mujeres Japonesas con diversos tipos de canceres ginecológicos, los autores encontraron que el genotipo *Fas* -670GG y el alelo G tuvieron una prevalencia estadísticamente mayor en casos que en controles (GG vs AA, OR=2,51  $p<0,05$ ; G vs A, OR=1,6  $p<0,05$ ) (Ueda et al., 2005). Otra asociación positiva fue encontrada en una población de la

India, donde el genotipo heterocigota AG presentó un riesgo significativamente incrementado de desarrollo de la enfermedad cervical cuando se lo comparó con el genotipo homocigota AA (OR=3,00  $p<0,05$ ) (Kordi Tamandani et al., 2008)

Por otra parte, en un estudio de tipo caso-control llevado a cabo en una población de China, Lai y col (2003) reportaron un riesgo significativo de cáncer cervical asociado a este polimorfismo. Los autores encontraron que las frecuencias del genotipo Fas-670AA y del alelo A se incrementaban de acuerdo a la progresión de la enfermedad cervical, lo que conduce desde las lesiones cervicales intraepiteliales hasta el carcinoma invasor de células escamosas. Aquellos individuos portadores del genotipo AA presentaron un mayor riesgo de desarrollo de HSIL (OR=1,3  $p<0,05$ ) y SCC (OR=1,6  $p<0,05$ ) en comparación con los portadores del genotipo GG (Lai et al., 2003). Al igual que el trabajo de Lai y col (2003), en el presente estudio la asociación significativa observada entre el alelo A, como el genotipo homocigota AA del gen FAS estaría sugiriendo un incremento significativo en el riesgo de desarrollo de cáncer cervical en las mujeres portadoras de los mismos.

Contrariamente a estos resultados, existen trabajos en los cuales no se ha encontrado asociación entre el polimorfismo -670 de FAS y la neoplasia cervical (Dybikowska et al., 2004) (Kang et al., 2008) (Engelmark et al., 2004) (DU et al., 2013).

### **5.5. Polimorfismos de Nucleotido Simple y su relación con la infección por VPH**

No todas aquellas mujeres que han estado expuestas al VPH llegan a infectarse, hecho que demuestra que existe cierta variabilidad en la susceptibilidad a la infección viral. El VPH infecta las células de la capa basal del epitelio y estas células están generalmente protegidas por la capa exterior de células diferenciadas. Por lo tanto, la accesibilidad del

virus a las células basales parece ser crucial para una infección exitosa. Las diferencias individuales en las propiedades fisiológicas y estructurales del epitelio de células escamosas, podrían determinar el resultado de una infección y estas diferencias podrían estar determinadas genéticamente.

Asimismo, los individuos también pueden presentar variaciones en el grado en que el virus puede llegar a perturbar la maquinaria celular y en el porcentaje en que este proceso conduce al desarrollo de tumores. En este sentido, se pueden encontrar variaciones temporales entre la infección y el primer signo de desarrollo de la neoplasia en mujeres infectadas, hecho que va a depender de muchos factores, tales como la expresión de las proteínas oncogénicas del VPH y la sensibilidad del huésped a estas proteínas. Por lo tanto, el potencial de estas proteínas para iniciar el desarrollo del cáncer podría depender del perfil genético del hospedador.

Adicionalmente, en este trabajo se ha investigado si existe un incremento en el riesgo de infección por VPH de acuerdo al perfil genotípico del paciente. Los resultados obtenidos indican que no existen diferencias significativas en la distribución genotípica de los polimorfismos estudiados, de acuerdo a la infección por VPH. El análisis de cada tipo viral por separado tampoco evidenció asociación significativa. Sin embargo, al analizar el SNP -670 de FAS se observó una asociación positiva entre la infección por VPH y el genotipo homocigota AA de este gen (OR=2,53;  $p=0,035$ ). Esta relación estaría sugiriendo un incremento en la susceptibilidad a la infección por este virus en aquellas mujeres portadoras de dicho genotipo. Estos resultados son concordantes con aquellos reportados por Lai y col (2003) quienes demostraron que la frecuencia del alelo A y del genotipo homocigota AA se incrementa en relación al proceso escalonado de carcinogenesis. Ellos afirmaron que tanto el alelo A como el genotipo homocigota AA

estarían confiriendo un elemento GAS (Señal de Activación de Interferón Gamma ) intacto y una expresión de FAS más eficiente, y que este podría ser el mecanismo que las células utilizarían para evadir la carcinogénesis. Sin embargo, los resultados obtenidos por Nunobiki y colaboradores (2011) (Nunobiki et al., 2011) fueron contrarios a los encontrados en este trabajo. Según estos autores, la frecuencia del genotipo GA + GG y la del alelo G se incrementan desde las Lesiones de Bajo grado (LSIL) a las de Alto grado (HSIL). Además, encontraron un incremento en el riesgo de desarrollo de HSIL para el genotipo GA + GG, entre pacientes con VPH de alto riesgo. En los carcinomas de cuello uterino ha sido reportada una disminución significativa en los niveles de expresión de FAS (Contreras et al., 2000; Das et al., 2000). La mayor frecuencia de los genotipos GA o GG en los casos de HSIL estaría relacionada con una interrupción del sitio de unión del factor de transcripción STAT1 (interrupción en el elemento GAS), y por consiguiente una disminución de la actividad del promotor. Esto resulta a su vez en una reducción significativa de la expresión de FAS y posterior escape de la apoptosis de aquellas células infectadas con VPH de alto riesgo, presentando una relación directa con el proceso de carcinogénesis cervical (Das et al., 2000). La mayor frecuencia de los genotipos GA o GG en los casos de HSIL estaría relacionada con una interrupción del sitio de unión del factor de transcripción STAT1 (interrupción en el elemento GAS), y por consiguiente una disminución de la actividad del promotor. Esto resulta a su vez en una reducción significativa de la expresión de FAS y posterior escape de la apoptosis de aquellas células infectadas con VPH de alto riesgo, presentando una relación directa con el proceso de carcinogénesis cervical. Recientemente, Engelmark y col. (Engelmark et al., 2004) y Dybikowska y col. (Dybikowska et al., 2004] reportaron que el genotipo homocigota AA de FAS-670 no estaría relacionado con la carcinogénesis cervical, ni con la infección por VPH.

Las discrepancias entre los distintos trabajos pueden deberse a las variaciones en la prevalencia del VPH según la composición de las poblaciones en estudio, y a las frecuencias genotípicas del polimorfismo en el promotor del gen FAS en las diferentes regiones geográficas.

### **5.6. Discrepancias entre los estudios**

En los últimos 20 años, alrededor de 200 genes candidatos, con más de 500 variantes genéticas, han sido estudiados buscando una asociación con el cáncer cervical. Existen numerosos trabajos que han encontrado verdaderas asociaciones de estas variantes genéticas con el carcinoma cervical, sin embargo también han sido identificadas varias asociaciones falso-positivas, las cuales no han podido ser replicadas en otras poblaciones. Las amplias discrepancias observadas en los diferentes estudios pueden haber surgido por varias razones.

En primer lugar, una fuente de sesgo particularmente reconocida en los análisis de asociación genética es el error en la genotipificación, el cual puede originarse como consecuencia de la variación en la sensibilidad de los métodos utilizados. En cuanto a esto último, algunos autores han expresado su preocupación con respecto al uso de la metodología PCR alelo-específica para diagnóstico. Aparentemente, la PCR alelo específica podría perder su especificidad cuando se utilizan 100 pg o menos de ADN, y la sensibilidad disminuiría cuando la cantidad de ADN es menor a 10 pg por reacción (Xu et al., 2003; Alexander et al., 2004). Considerando esta situación, y con el objetivo de disminuir significativamente los posibles errores en la genotipificación de las muestras, en el presente trabajo se utilizó la tecnología de Pirosecuenciación para la mayoría de los marcadores estudiados. Este enfoque es una metodología de secuenciación de ADN basada en la detección en tiempo real de la síntesis de ADN,

siendo considerada actualmente como la técnica de referencia (*gold standard*) para la genotipificación de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP). Esta técnica ofrece resultados inequívocos de genotipificación de SNPs, así como información redundante de la secuencia más allá de la posición del polimorfismo, lo cual resulta útil ya que permite contar con un control positivo en el proceso de secuenciación (Nilsson et al., 2004; Ahmadian et al., 2000). La solidez (robustez) de esta técnica en el proceso de secuenciación garantiza la ausencia o al menos una alta reducción de errores en la genotipificación.

Para aquellos marcadores en los que no fue posible su genotipificación mediante Pirosecuenciación, se utilizó la metodología de PCR-RFLP, la cual ha demostrado ser altamente analítica, específica y sensible, y por lo tanto factible de ser utilizada de forma fiable para diagnóstico (Xu et al., 2003). Asimismo, y con el afán de comprobar la fidelidad de los resultados obtenidos por esta técnica, se eligió al azar un 20% del total de las muestras genotipificadas mediante PCR-RFLP, para ser redigeridas y confirmar de esta manera el genotipo.

Mientras que la incorrecta clasificación de las muestras puede conducir a resultados que lleven a conclusiones falsas, otra razón para la incorrecta interpretación de los resultados en los estudios de tipo caso-control, es la desviación del equilibrio de Hardy Weinberg de las frecuencias genotípicas en los controles. En el presente trabajo, el grupo control cumplió con los criterios del equilibrio de Hardy Weinberg para todos los polimorfismos analizados. Si la población no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg, los resultados deben tratarse con precaución porque la distribución genotípica observada en el grupo control no sería representativa de la población de la cual se tomaron los casos, y por lo tanto las conclusiones tendrían un valor limitado (Koushik et al., 2004; Györfy et al., 2004; Esser et al., 2005). Muchas veces, la

desviación del equilibrio de Hardy Weinberg ha sido considerada incorrectamente como consecuencia de errores de muestreo. Sin embargo, debe considerarse también la posibilidad de que fuerzas evolutivas, como la selección o la migración, estén actuando sobre la población en estudio, y por lo tanto la desviación del equilibrio no sería solamente consecuencia de errores metodológicos o de muestreo. Una desviación del equilibrio de Hardy Weinberg también podría implicar una mezcla de etnias en la población estudiada, si el sitio polimórfico analizado varía de acuerdo a la raza o etnia (Schaid et al., 1999; Deng et al., 2001). Por lo tanto, sería inapropiado utilizar poblaciones cuyos controles se aparten del equilibrio, ya que los resultados obtenidos serían cuestionables.

Otra fuente de variación que debe ser considerada es el tamaño muestral. La credibilidad de un estudio se ve reforzada cuando existe gran cantidad de datos o evidencia consistente. Un gran número de datos es necesario para asegurar una potencia adecuada que permita detectar una asociación (si está presente), y alcanzar niveles más estrictos de significancia estadística, o bien tasas de falsos-positivos más bajas (Benjamini et al., 1995). Tamaños muestrales grandes tienden también a disminuir la incertidumbre en la magnitud del efecto genético observado (Balding, 2006). Los estudios más grandes tienden a estar menos afectados por los sesgos que aquellos estudios más pequeños, aunque esto no siempre está garantizado (Ioannidis et al., 2003). La cantidad efectiva de datos o evidencia necesaria depende de los factores que influyen en la potencia del estudio para detectar una asociación verdadera, es decir, el tamaño total de la muestra, el modelo genético subyacente a la asociación, la frecuencia de la variante genética de interés y la magnitud de la asociación.

La credibilidad de un estudio también se ve reforzada cuando una asociación es encontrada en diferentes trabajos, es decir cuando los resultados pueden replicarse y

cuando la magnitud de esta asociación es consistente a través de las distintas poblaciones estudiadas (homogeneidad). La falta de réplica o la heterogeneidad entre estudios pueden ser una señal de errores y sesgos subyacentes, como ser errores de genotipificación, clasificación errónea de fenotipos, estratificación de la población y sesgo en la notificación de resultados. (Balding, 2006; Pompanon et al., 2005; Clayton et al., 2005; Page et al., 2003)

Sin embargo, en varias ocasiones la falta de réplica en una nueva población no refuta necesariamente la asociación reportada originalmente. Esto puede estar reflejando diferentes patrones de desequilibrio de ligamiento a través de distintas poblaciones, o puede estar demostrando la existencia de una interacción génica particular de la población, o inclusive puede deberse a la presencia de interacciones genes-ambiente (Hunter, 2005; Evans et al., 2006). Por lo tanto, muchas veces la heterogeneidad encontrada en diferentes estudios puede indicar una diversidad genuina en el efecto genético de la variante estudiada.

### **5.7. Interacciones génicas en la carcinogénesis cervical**

Uno de los objetivos centrales de la epidemiología genética es la identificación de genes con alelos y/o genotipos que confieran un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de distintas enfermedades. La comprensión de las enfermedades multifactoriales ha planteado un desafío mucho mayor, ya que son el resultado del efecto sinérgico de numerosas variantes génicas de susceptibilidad, junto a la interacción con factores ambientales. El concepto de interacción génica existe desde hace más de un siglo, y ha sido reconocido como una explicación a las desviaciones de la herencia mendeliana simple. La interacción génica es un fenómeno importante en biología, ya que las

interacciones entre moléculas constituyen una parte fundamental en los procesos de regulación génica, transducción de señales, redes bioquímicas, vías fisiológicas, etc.

De esta manera, la interacción entre genes de penetrancia incompleta, particularmente aquellos de baja penetrancia, juega un rol importante en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades, como el cáncer. Aunque el riesgo asociado con cada alelo individual pueda ser pequeño, el efecto aditivo o sinérgico que puede aportar la combinación de un cierto número de variantes alélicas puede presentar una mayor contribución al desarrollo del fenotipo, que aquellos genes de alta penetrancia. Por este motivo, es el efecto acumulativo de los polimorfismos presentes en genes de baja penetrancia el que juega un rol crítico en la predisposición individual al desarrollo de enfermedades como el cáncer, más que el efecto independiente de cualquier gen de susceptibilidad. (Moore, 2003).

En el presente trabajo, una primera etapa de análisis consistió en investigar el efecto principal de los SNPs con respecto al riesgo de desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, por lo mencionado anteriormente se demuestra que un SNP sin efecto principal o individual, o con un efecto demasiado pequeño como para ser detectado, puede interactuar con otros y conferir un incremento en el riesgo de desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, una segunda etapa de análisis consistió en descubrir las interacciones génicas, que aditiva o sinérgicamente contribuyan al riesgo de desarrollo de cáncer cervical o a la infección por VPH. Para investigar estas interacciones se utilizó el método de MDR, el cual fue desarrollado específicamente para aumentar el poder de detección de las interacciones génicas (Ritchie et al., 2001) con respecto a otros métodos.

MDR es un método de reducción de datos para el análisis exploratorio de caracteres cuantitativos (Nelson et al., 2001). Con MDR los genotipos multilocus se agrupan en

grupos de alto riesgo y bajo riesgo, reduciendo efectivamente los predictores del genotipo de N dimensiones a solo una dimensión. La nueva variable unidimensional es evaluada por su habilidad de clasificar y predecir el estado de la enfermedad a través de pruebas de validación cruzada y permutación. Dentro de las ventajas que presenta este método, observamos que facilita la detección y caracterización simultánea de múltiples marcadores (genes) asociados con una determinada enfermedad. MDR es un método no paramétrico (no estima parámetros poblacionales) y además es libre de modelo, es decir que no asume ningún modelo genético en particular. Esta última característica es importante en enfermedades como el cáncer, en las que el modo de herencia es desconocido y probablemente muy complejo (Ritchie et al., 2001)

Del análisis del conjunto de polimorfismos estudiados en este trabajo se ha demostrado que existen interacciones estadísticamente significativas entre SNPs que no presentan un efecto individual sobre el riesgo de desarrollo de cáncer cervical. Estas interacciones estarían sugiriendo un intercambio biológico de información (cross-talk) entre genes del sistema de reparación del ADN, del ciclo celular, del sistema inmune, de la vía apoptótica y genes supresores de tumores.

La mayoría de los estudios de asociación publicados hasta hace unos años, han utilizado una estrategia de análisis donde cada variante genética es evaluada individualmente buscando asociación con un determinado fenotipo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, una razón para la falta de éxito de estos estudios en enfermedades complejas es la existencia de interacciones entre *loci*. Hoy en día se observa un creciente número de trabajos en los cuales se evalúa el efecto conjunto de los SNPs en la susceptibilidad al desarrollo de distintas enfermedades, como el asma (Polonikov et al., 2014), la enfermedad de Parkinson (Kumudini et al., 2013) Alzheimer (Sun et al., 2014) y diversos tipos de cáncer, como cáncer de cabeza y cuello (Choudhury et al.,

2014; Santiago et al., 2014) cáncer de mama (Tulsyan et al., 2014; Wang et al., 2014) cáncer gástrico (Gonzalez-Hormazabal et al., 2014) cáncer colorectal (Yu et al., 2014) y cáncer cervical (Barbisan et al., 2011; Shi et al., 2013)

En este sentido, la elucidación de cómo los alelos de susceptibilidad interactúan entre ellos y con los factores ambientales y de estilo de vida será un desafío clave en el futuro para la genética epidemiológica y molecular de la predisposición al cáncer.

### **5.8. Perspectivas futuras**

Los avances tecnológicos aplicados a la investigación biomédica permiten ahondar en el conocimiento del genoma humano. Con la secuenciación del genoma humano y las nuevas tecnologías de genotipificación de alta densidad, es ahora posible llevar a cabo la genotipificación a gran escala de polimorfismos en varios genes de baja penetrancia en extensos estudios epidemiológicos. Una combinación de tecnologías de genotipificación accesibles, sumada a un diseño experimental eficiente hará que los trabajos empíricos-genómicos sean un prospecto posible en un futuro cercano. Entender las enfermedades a escala genómica puede permitirnos caracterizar específicamente a cada paciente para optimizar y dirigir terapias personalizadas. En todas las ramas de la medicina, la genética tiene el potencial de ser una herramienta que complementa los datos clínicos proporcionando información acerca de la predisposición a enfermedades, lo que permite mejorar la toma de decisiones sobre las medidas de prevención o terapéuticas para cada paciente.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio apoyan el rol de la susceptibilidad genética del hospedador en la etiología del cáncer cervical. El descubrimiento de alelos y genotipos de susceptibilidad provee un marco teórico para futuras investigaciones acerca de los efectos funcionales de estos polimorfismos. En el

contexto de las estrategias de manejo del cáncer cervical, es concebible que algún día una combinación de las técnicas de *screening* utilizadas actualmente de rutina junto a un análisis del perfil genético del hospedador, puedan proveer mejores valores predictivos, que los alcanzados hoy en día.

# *Conclusiones*

## 6.1. Conclusiones

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que:

- Las muestras pertenecientes al grupo control, mostraron una prevalencia de ADN-VPH del 36,5%, siendo los tipos virales más frecuentes: el VPH 16, -18 y el -6. Del total de los controles, el 29,3% correspondió a mujeres mayores a 30 años infectadas con VPH 16 y/o -18. La elevada prevalencia de infección con VPHs oncogénicos en mujeres mayores a 30 años, sin signos cito/colposcópicos de lesión cervical representa una situación de especial importancia, ya que la infección con estos tipos virales otorga un incremento en el riesgo de progresión a los estadios iniciales de la neoplasia cervical.
- La asociación significativa observada entre la infección por VPH y el genotipo homocigota AA del gen FAS estaría sugiriendo un incremento en la susceptibilidad a la infección por este virus en aquellas mujeres portadoras de dicho genotipo. La mayor susceptibilidad a la infección con VPH podría convertir a la población de mujeres portadoras de este polimorfismo en un grupo con un riesgo incrementado de desarrollo de cáncer cervical.
- Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los polimorfismos presentes en las regiones promotoras de los genes *TNF- $\alpha$*  (-308 (G/A) y -238 (G/A)), *IL-10* (-1082 (G/A)) y *FASL* (-844 (T/C)), así como el SNP + 874 (T/A) del gen *Interferon gamma*, no mostraron asociación con el desarrollo de cáncer cervical. De manera similar, no hubo asociación entre dichos polimorfismos y la presencia del ADN del VPH en la población de mujeres estudiadas.

- Sin embargo, los polimorfismos presentes en los genes *FAS*, *p53* y *XRCC1* mostraron asociación con la susceptibilidad de desarrollo del cáncer cervical en la población estudiada. De este modo, los genotipos homocigota AA del gen *FAS*, heterocigota CG del gen *p53* y el genotipo TT+TC del gen *XRCC1* codon 194, otorgarían un incremento significativo en el riesgo para el desarrollo de cáncer cervical en las mujeres portadoras de los mismos. En consecuencia, el estudio de estos polimorfismos podría ser empleado como un marcador molecular para la detección de individuos con un riesgo incrementado de desarrollo de neoplasia cervical.
- De manera similar, el análisis de los SNPs *Arg462Gln* del gen *RNASEL* y *Arg399Gln* del gen *XRCC1* dio como resultado una asociación significativa con la susceptibilidad de desarrollo de cáncer cervical. Sin embargo en este caso, se halló que tanto los genotipos homocigota AA de *RNASEL* y heterocigota AG de *XRCC1* codon 399 estarían actuando como factores protectores, otorgando una menor susceptibilidad frente al desarrollo de una neoplasia de este tipo.
- En cuanto a las lesiones cervicales, se observó para el polimorfismo *Arg399Gln* del gen *XRCC1*, que tanto el alelo *Gln* (A) como el genotipo homocigota para este mismo alelo *Gln/Gln* (AA) otorgaron un incremento significativo en el riesgo de desarrollo de lesiones de bajo grado. Por el contrario, el genotipo heterocigota *Gln/Arg* (AG) de este mismo polimorfismo estaría actuando como factor protector, confiriendo una menor susceptibilidad frente al desarrollo de este tipo de lesiones.
- El análisis de los polimorfismos a través del algoritmo MDR reveló que existe interacción entre ellos. El modelo de cuatro-factores (cuatro-loci) conformado

por *FASL-P53-RNASEL-XRCC1399* fue estadísticamente significativo (TA=0,61;  $p<0,05$ ), y el valor positivo de entropía (0,90%), encontrado entre los SNPs de FASL y P53 estaría indicando que existe una interacción sinérgica entre estos polimorfismos en relación al riesgo de desarrollo de la enfermedad cervical.

- Los resultados obtenidos en este estudio apoyan el rol de la susceptibilidad genética del hospedador en la etiología del cáncer cervical. En base a esto se sugiere que la utilización de estos polimorfismos podría resultar muy conveniente en la identificación de aquellos individuos que se encuentran con mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, para proceder a la implementación de medidas de intervención más eficientes y a largo plazo el desarrollo de terapias dirigidas

# ***Bibliografía***

## 7.1. Bibliografía

**Abba M C, Gómez M A, Golijow C D.** Distribución de los genotipos del virus del papiloma humano en infecciones cervicales en mujeres de La Plata, Argentina. *Rev Arg Microb* 2003, 35:74-79.

**Abba M C, Villaverde L M, Gomez M A, Dulout F N, Laguens M R, Golijow C D.** The p53 genotypes in HPV infection and cervical disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003, 109(1):63-66.

**Abdel-Rahman S.Z., Soliman A.S., Bondy M.L., et al.** Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.* 2000, 159:79–86.

**Abrahamsson J, Carlsson B, Mellander L.** Tumor necrosis factor-alpha in malignant disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1993, 15, 364-9.

**Ahmadian A, Ehn M, Hober S.** Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 2006; 363:83e94.

**Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, et al.** Single nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* 2000; 280:103e110.

**Alexander A, Subramanian N, Buxbaum JN, et al.** Drop-in, dropout allele-specific PCR: a highly sensitive, single-tube method. *Mol Biotechnol* 2004; 28:171e174.

**Alonso P, Lazcano E, Hernández M.** Cáncer cervicouterino: Diagnóstico, Prevención y Control. Ed Panamericana, 2º Edición, 2005.

**Andrew A. S., Nelson H. H., Kelsey K. T., et al.** Concordance of multiple analytical approaches demonstrates a complex relationship between DNA repair gene SNPs, smoking and bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis*.2006, 27:1030–37.

**Arends M J, Buckley C H, Wells M.** Aetiology, Pathogenesis, and Pathology of Cervical Neoplasia. *Clinical Pathology* 1995, 51:96-103.

**Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28; 281(5381):1305-8. Review.

**Badano I, Stietz SM, Schurr TG, et al.** Analysis of TNF- $\alpha$  promoter SNPs and the risk of cervical cancer in urban populations of Posadas (Misiones, Argentina). *J Clin Virol.* 2012; 53:54–9.

**Bajpai D, Banerjee A, Pathak S, Jain SK, Singh N.** Decreased expression of DNA repair genes (XRCC1, ERCC1, ERCC2, and ERCC4) in squamous intraepithelial lesion and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mol Cell Biochem.* 2013 May; 377(1-2):45-53.

**Balding DJ.** A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006; 7:781–91.

**Barbisan G, Pérez L.O., Difranza L., Fernández C.J., Ciancio N.E., Golijow C.D.** XRCC1 Arg399Gln polymorphism and risk for cervical cancer development in Argentine women. *Eur. J. Gynaec. Oncol.* 2010, 32(3):274-9.

**Barbisan G, Contreras A, Pérez LO, Difranza L, Golijow CD.** The effect of TP53 codon 72 and RNASEL codon 462 polymorphisms on the development of cervical cancer in Argentine women. *Cancer Genet.* 2011 May; 204(5):270-7.

**Barbisan G, Pérez LO, Contreras A, Golijow CD.** TNF- $\alpha$  and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk. *Tumor Biol.* 2012, 33:1549–1556.

**Barth Jr RJ, Camp BJ, Martuscello TA, et al. (1996)** The cytokine microenvironment of human colon carcinoma. Lymphocyte expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-4 predicts improved survival. *Cancer* 78:1168-1178.

**Bazzoni F, Beutler B.** The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*, 1996, 334, 1717-25.

**Beckman G, Birgander R, Sialander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L.** Is p53 polymorphism maintained by natural selection?. *Hum Hered* , 1994, 44(5): 266-270.

**Benjamini Y, Hochberg Y.** Controlling the false Discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc B* 1995; 57:289–300.

**Bernard HU.** Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Int Journal Cancer* 1994, 56: 788-796.

**Beutler B, Bazzoni F.** TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? *Blood Cells Mol Dis* 1998, 24, 216-30.

**Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D.** Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem.* 1995 Jan 6;270(1):387-91.

**Bonnez W, Reichman RC.** Papillomaviruses. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia (Pa) 2000, 1630-1640.

**Bosch F X, de Sanjosé S.** Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep* 2002, 4(2):175-183.

**Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV.** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002, 55:244-265.

**Burd EM.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jan; 16(1):1-17. Review.

**Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C.** Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 1999, 9:M57-60.

**Calhoun ES, McGovern RM, Janney CA, et al.** Host genetic polymorphism analysis in cervical cancer. *Clin Chem.* 2002; 48:1218-24.

**Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, Faruque M, Moses T, Ewing C, Gillanders E, et al.** Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* 2002, 30: 181-84.

**Casey G, Neville P J, Plummer S J, Xiang Y, Krumroy L M, Klein E A, Catalona W J, Nupponen N, Carpten J D, Trent J M, Silverman R H, Witte J S.** RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nat Genet* 2002, 32:581-583.

**Chapekar MS, Glazer RI.** The synergistic cytotoxic effect produced by immune interferon and tumour necrosis factor in HT-29 cells is associated with inhibition of rRNA processing and (2',5') oligo (A) activation of RNase L. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 151: 1180-87.

**Chatterjee K, Engelmark M, Gyllensten U, et al.** Fas and FasL gene polymorphisms are not associated with cervical cancer but differ among Black and Mixed-ancestry South Africans. *BMC Research Notes.* 2009; 2:238.

**Chellapan S, Kraus V B, Kroger B, Mungert K, Howley P M, Phelpss W S, Nevins J.** Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Biochemistry* 1992, 89:4549-4553.

**Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM.** FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995 May 19; 81(4):505-12.

**Choudhury JH, Ghosh SK.** Gene-environment interaction and susceptibility in head and neck cancer patients and in their first-degree relatives: a study of Northeast Indian population. *J Oral Pathol Med.* 2014 Aug 28.

**Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA.** Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011; 6(10):25493. Review.

**Clayton DG, Walker NM, Smyth DJ et al.** Population structure, differential bias and genomic control in a largescale, case-control association study. *Nat Genet* 2005; 37:1243–46.

**Clerici M, Merola M, Ferrario E, et al.** Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89(3):245-50.

**Contreras D. N., P. H. Krammer, R. K. Potkul, et al.** Cervical cancer cells induce apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunotherapy*, 2000, vol. 23, no. 1, pp. 67–74.

**Cox T, Buck HW, Kinney W, Rubin MM.** Human Papilloma Virus and Cervical Cancer. *Clinical Proceedings* 2001.

**Cui X, Brenneman M, Meyne J, et al.** The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. *Mutat Res* 1999, 434:75–88.

**Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K.** Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer* 2002, 99(2):260-6.

**Das H., T. Koizumi, T. Sugimoto, et al.** Quantitation of Fas and Fas ligand gene expression in human ovarian, cervical and endometrial carcinomas using real time quantitative RT-PCR. *British Journal of Cancer*, 2000, vol. 82, no. 10, pp. 1682–1688.

**David-Beabes GL, London SJ.** Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-American and Caucasians. *Lung Cancer* 2001; 34:333– 9.

**de Boer JG.** Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutat Res* 2002, 509(1-2):201-10.

**de Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch F X.** Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus

DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007, 7(7):453-459.

**Delius H, Saegling B, Bergmann K, Shamanin V, de Villiers EM.** The genome of three of four novel HPV types, defined by differences of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. *Virology* 1998, 240: 359-365.

**Deng, H. W., Chen, W. M., and Recker, R. R.** Population admixture: detection by Hardy-Weinberg test and its quantitative effects on linkage-disequilibrium methods for localizing genes underlying complex traits. *Genetics*, 2001, 157: 885–897.

**Deshpande A, Nolan JP, White PS, et al.** TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis*, 2005, 191, 969-76.

**DiMaio D, Mattoon D.** Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 2001, 20:7866-7873.

**Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, Stidley CA, Bocklage TJ, Cook DL, et al.** The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res* 2001; 461:273– 8.

**do Carmo Vasconcelos de Carvalho V, de Macêdo JL, de Lima CA, da Conceição Gomes de Lima M, de Andrade Heráclio S, Amorim M, de Mascena Diniz Maia M, Porto AL, de Souza PR.** IFN-gamma and IL-12B polymorphisms in women with cervical intraepithelial neoplasia caused by human papillomavirus. *Mol Biol Rep.* 2012 Jul; 39(7):7627-34.

**Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM.** Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* 1995, 69(12): 7791-7799.

**DU Y, Hu L, Pan Y.** Lack of association between the FAS/FASL polymorphisms and cervical cancer risk: A meta-analysis. *Biomed Rep.* 2013 Mar; 1(2):269-274.

**Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Wiencke JK, Kelsey KT.** A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:4630– 6.

**Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS, Winkel S, Lunn RM, Tse CK, et al.** Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev* 2001; 10:217– 22.

**Duensing S, Münger K.** Centrosomes, genomic instability, and cervical carcinogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003,13:9 –23.

**Duensing S, Münger K.** Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004, 109:157–162.

**Dumont P, Leu JJ, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M.** The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 357-65.

**Dunne E F, Unger E R, Sternberg M, McQuillan G, David C, Swan D C, Patel S S, Markowitz L E.** Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States. *JAMA* 2007, 297(8):813-819.

**Dybikowska A, Dettlaff A, Konopa K, Podhajska A.** p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer patients and healthy women from Poland. *Acta Biochimica Polonica* 2000, 47(4):1179–1182.

**Dybikowska, A., Sliwinski, W., Emerich, J., and Podhajska, A. J.** Evaluation of Fas gene promoter polymorphism in cervical cancer patients. *International Journal of Molecular Medicine*, 2004, vol. 14, no. 3, pp. 475–478.

**Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E.** The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989, 243: 934-937.

**Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun; 35(4):495-516. Review.

**El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D.** Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol* 2001, 195(2): 179-85.

**Engelmark, M. T., Renkema, K. Y., and Gyllensten, U. B.** No evidence of the involvement of the Fas-670 promoter polymorphism in cervical cancer in situ. *International Journal of Cancer*, 2004, vol. 112, no. 6, pp. 1084–1085.

**Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW.** Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:9465–70.

**Esser C, Tomluk J.** Reporting Hardy-Weinberg tests in case control studies: reasons for caution but not for panic reactions. *J Invest Dermatol* 2005;124:1082e1083.

**Evan GI, Vousden KH.** Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411:342–8.

**Evans DM, Marchini J, Morris AP et al.** Two-stage twolocus models in genome-wide association. *PLoS Genet* 2006; 2:157.

**Ewart-Toland A, Balmain A.** The genetics of cancer susceptibility: from mouse to man. *Toxicol Pathol* 2004, 32:26-30.

**Farias-Eisner R, Casey A, Walker D, Shaper A, Berek J.** Cervix, Vagina and Vulva, En: *Clinical Oncology*. Abeloff M, Armitage J, Lichter A, Niederhuber J (eds). New York: Churchill Livingstone Press 1995, 1527-1568.

**Fehrmann F, Laimins L A.** Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003, 22:5201–5207.

**Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, Gostout BS, Cheung TH, Chung TK, Fu WY, Smith DI.** Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 2003, 22:7233-7242.

**Fong CL, Siddiqui AH, Mark DF.** Identification and characterization of a novel repressor site in the human tumor necrosis factor alpha gene. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22, 1108-14.

**Frattini MG, Hurst SD, Lim HB, Swaminathan S, Laiminis LA.** Abrogation of mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increase turnover of the p53 tumor suppressor protein. *Embo J* 1997, 16(2): 318-331.

**Gangwar R, Pandey S, Mittal RD.** Association of interferon-gamma +874A polymorphism with the risk of developing cervical cancer in north-Indian population. *BJOG* 2009, 116(12): 1671–1677.

**Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, Whiteside TL.** Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res*. 1999 Oct 15; 59(20):5356-64.

**Gey A, Kumari P, Sambandam A, Lecuru F, Cassard L, Badoual C, Fridman C, Nagarajan B, Fridman WH, Tartour E.** Identification and characterization of a group of cervical carcinoma patients with profound downregulation of intratumoral Type 1 (IFN gamma) and Type 2 (IL-4) cytokine mRNA expression. *Eur J Cancer*. 2003, 39:595–603.

**Golijow C D, Abba M C, Mourón S A, Laguens R B, Dulout F N, Smith J S.** *Chlamydia trachomatis* and Human Papillomavirus Infections in Cervical Disease in Argentine Women. *Gynecologic Oncology* 2005, 96:181-186.

**Gonullu G, Basturk B, Evrensel T, Oral B, Gozkaman A, Manavoglu O.** Association of breast cancer and cytokine gene polymorphism in Turkish women. *Saudi Med J* 2007, 28:1728–1733.

**Gonzalez-Hormazabal P, Musleh M, Bustamante M, Stambuk J, Escandar S, Valladares H, Lanzarini E, Chiong H, Rojas J, Castro VG, Rubio-Reyes C, Jara L, Berger Z.** Role of cytokine gene polymorphisms in gastric cancer risk in Chile. *Anticancer Res.* 2014 Jul; 34(7):3523-30.

**Goode EL, Ulrich CM, Potter JD.** Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, 11(12):1513-30.

**Goodman MT, McDuffie K, Hernandez B, Bertram CC, Wilkens LR, Guo C, et al.** CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and the risk of cervical squamous intraepithelial lesions in a multiethnic population. *Gynecol Oncol* 2001; 81:263– 9.

**Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, Clarke CJ.** IFN gamma signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19:383–94.

**Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL.** Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinog* 2003, 2(1):3.

**Govan VA, Constant D, Hoffman M, Williamson AL.** The allelic distribution of -308 tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in South African women with cervical cancer and control women. *BMC Cancer.* 2006; 6:24.

**Greenberg R, Daniels SR, Flanders WD, Eley JW, Boring JR.** *Medical Epidemiology*, 3rd ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, USA, 2001.

**Györfy B, Kocsis I, Vászrhelyi B.** Biallelic genotype distributions in papers published in *Gut* between 1998 and 2003: altered conclusions after recalculating the Hardy-Weinberg equilibrium. *Gut* 2004; 53:614-615.

**Harris CC.** p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993, 262(5142): 1980-1.

**Hayes V M, Hofstra R M W, Buys C H C M, Hollema H, van der Zee A G J.** Homozygous arginine-72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. *The Lancet* 1998, 352:1756.

**Hemminki K, Dong C, Vaittinen P.** Familial risks in cervical cancer: is there a hereditary component? *Int J Cancer* 1999, 82:775-781.

**Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.** p53 mutation in human cancers. *Science* 1991, 253: 49-53.

**Horng JT, Hu KC, Wu LC, Huang HD, Lin FM, Huang SL, Lai HC, Chu TY.** Identifying the combination of genetic factors that determine susceptibility to cervical cancer. *IEEE Trans Inf Technol Biomed* 2004, 8:59-66.

**Horvath CM.** The Jak-STAT pathway stimulated by interferon c. *Sci STKE* 2004; 260:8.

**Houlston R S, Peto J.** The Search for low-penetrance Cancer Susceptibility Alleles. *Oncogene* 2004, 23:6471–6476.

**Houston A, O'Connell J.** The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2004 Aug; 4(4):321-6. Review.

**Howard M and O'Garra A.** Biological properties of interleukin-10. *Immunol Today* 1992, 13:198–200.

**Howell WM, Turner SJ, Theaker JM, Bateman AC.** Cytokine gene single nucleotide polymorphisms and susceptibility to and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Immunogenet* 2003, 30:409–414.

**Hu Zhibin, Hongxia Ma, Feng Chen, Qingyi Wei, Hongbing Shen.** XRCC1 Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-analysis of 38 Case-Control Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, 14:1810-1818.

**Huang C M.** Human Papillomavirus and Vaccination. *Mayo Clin Proc* 2008, 83(6):701-707.

**Huang J, Ye F, Chen H, Lu W, Xie X.** The nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of DNA repair gene *XRCC1* and susceptibility to the development of cervical carcinoma and highrisk human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17:668–75.

**Huang QR, Danis V, Lassere M, Edmonds J, Manolios N.** Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38:645–51.

**Huang QR, Morris D, Manolios N.** Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 1997; 34:577–82.

**Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P.** Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005 Nov 15; 162(10):925-42. Review.

**Hunter DJ.** Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 2005; 6:287–98.

**IARC (International Agency for research on Cancer).** Base de Datos GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Enlace: <http://globocan.iarc.fr/>.

**Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD.** The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:95–109.

**Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE et al.** Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet* 2003; 361:567–71.

**Ito H, Matsuo K, Hamajima N, Mitsudomi T, Sugiura T, Saito T, et al.** Gene-environment interactions between the smoking habit and polymorphisms in the DNA repair genes. *Carcinogenesis* 2004; 25:1395–401.

**Itoh N, Nagata S.** A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem.* 1993 May 25; 268(15):10932-7.

**Ivansson EL, Juko-Pecirep I, Gyllensten UB.** Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2010; 116: 544–8.

**Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM.** A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 1997, 35(3):791-5.

**Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS.** Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta analysis. *Int J Gynecol Obst* , 2004, 85: 301-308.

**JO, Hoenil; KIM, Jae Weon.** Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Ther*, 2005, vol. 3, p. 419-434.

**Jones DL, Alani RM, Münger K.** The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21CIP1-mediated inhibition of CDK2. *Genes Dev* 1997, 11: 2101–2111.

**Kamali-Sarvestani E, Merat A, Talei AR.** Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-gamma) among Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett* 2005, 223:113–119

**Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A, Otsuka T, Takeuchi T, Nagayama J, et al.** A functional polymorphism in Fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29: 1183–8.

**Kang S, Dong SM, Seo SS, Kim JW, Park SY.** FAS -1377 G/A polymorphism and the risk of lymph node metastasis in cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008 Jan 1; 180(1):1-5.

**Kim JW, Lee CG, Park YG, et al.** Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma. *Cancer* 2000; 88:2082-2091.

**Kim JW, Roh JW, Park NH, et al.** Interferon, alpha 17 (IFNA17) Ile184Arg polymorphism and cervical cancer risk. *Cancer Letters* 189 2003, 189:183–188.

**Kirkpatrick A, Bidwell J, van den Brule AJC, et al.** TNF $\alpha$  polymorphism frequencies in HPV-associated cervical dysplasia. *Gynecologic Oncology* 2004, 92: 675–679.

**Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME.** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995 Nov 15; 14(22):5579-88.

**Klausner RD.** The fabric of cancer cell biology—weaving together the strands. *Cancer Cell* 2002, 1:3–10.

**Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK.** Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996, 380: 79–82.

**Klug SJ, Wilmotte R, Santos C, et al.** TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1009-1012.

**Kordi Tamandani DM, Sobti RC, Shekari M.** Association of Fas-670 gene polymorphism with risk of cervical cancer in North Indian population. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2008; 35(3):183-6.

**Kordi Tamandani MK, Sobti RC, Shekari M, Mukesh M, Suri V.** Expression and polymorphism of IFN-gamma gene in patients with cervical cancer. *Exp Onco* 2008, 30:224–229.

**Kotnis A, Sarin R, Mulherkar R.** Genotype, phenotype and cancer: role of low penetrance genes and environment in tumour susceptibility. *J Biosci* 2005, 30:93-102.

**Koushik A, Platt R W, Franco E L.** p53 Codon 72 Polymorphism and Cervical Neoplasia: A Meta-Analysis Review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2004, 13:11–22.

**Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ.** The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*, 1997, 34, 391-9.

**Krüger S, Silber A S, Engel C, Görgens H, Mangold E, Pagenstecher C, Holinski-Feder E, von Knebel Doeberitz M , Moeslein G, Dietmaier W, Stemmler S, Friedl W, Rüschoff J, Schackert H K.** Arg462Gln Sequence Variation in the Prostate-cancer Susceptibility Gene RNASEL and Age of Onset of Hereditary nonpolyposis Colorectal Cancer: a case-control study. *Lancet Oncol* 2005, 6:566–72.

**Kumudini N, Umair A, Devi YP, Naushad SM, Mridula R, Borgohain R, Kutala VK.** Impact of COMT H108L, MAOB int 13 A>G and DRD2 haplotype on the susceptibility to Parkinson's disease in South Indian subjects. *Indian J Biochem Biophys.* 2013 Oct;50(5):436-41.

**Lai HC, Chang CC, Lin YW, Chen SF, Yu MH, Nieh S, Chu TW, Chu TY** Genetic polymorphism of the interferon-gamma gene in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 2005, 113(5):712–718.

**Lai HC, Sytwu HK, Sun CA, Yu MH, Yu CP, Liu HS, Chang CC, Chu TY.** Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2003 Jan 10; 103(2):221-5.

**Lalani I, Bhoi K and Ahmed AF.** Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy* 1997, 79:469– 483.

**Lavender N A, Benford M L, VanCleave T T, Brock G N, Kittle R A, Moore J H, Hein D W, Kidd L C R.** Examination of polymorphic glutathione S-transferase (GST) genes, tobacco smoking and prostate cancer risk among Men of African Descent: A case-control study. *BMC Cancer* 2009, 9:397.

**Lee BN, Follen M, Shen DY, et al.** Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, 11(2):239-44.

**Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G.** The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 1992, 7(1):19-25.

**Li H, Tai B C.** RNASEL Gene Polymorphism and the Risk of Prostate Cancer: a Meta-analysis. *Clinical Cancer Research* 2006, 12(19):5713-5719.

**Li M, Han Y, Wu TT, Feng Y, Wang HB.** Tumor necrosis factor alpha rs1800629 polymorphism and risk of cervical lesions: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013 Aug 27; 8(8): 69201.

**Li Y, Liu F, Tan SQ, Wang Y, Li SW.** X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and cervical cancer risk: a huge systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012; 7(9):44441.

**Li Y, Long C, Lin G, et al.** Effect of the XRCC1 codon 399 polymorphism on the repair of vinyl chloride metabolite-induced DNA damage. *J Carcinogenesis.* 2009, 8:14.

**Lindahl T, Wood RD.** Quality control by DNA repair. *Science* 1999; 286:1897–905.

**Little S.** Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet.* 2001;Chapter 9:Unit 9.8.

**Liu L, Yang X, Chen X, et al.** Association between TNF- $\alpha$  polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012; 39:2683–8.

**Liu Y, Wen QJ, Yin Y, Lu XT, Pu SH, Tian HP, Lou YF, Tang YN, Jiang X, Lu GS, Zhang J.** FASLG polymorphism is associated with cancer risk. *Eur J Cancer.* 2009 Sep; 45(14):2574-8.

**Longworth M S, Laimins L A.** Pathogenesis of Human Papillomavirus in Differentiating Epithelia. 2004; 68(2):362-372.

**López P, Gutiérrez C, Suárez A.** IL-10 and TNF $\alpha$  genotypes in SLE. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:838390. Review.

**Lörincz A, Reid R.** HPV. Interlibros 1997, Río de Janeiro, Brasil.

**Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ.** Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common genital types. *Obstet Gynecol* 1992, 79: 328-37.

**Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC, Liavaag PG, Jonsson R.** Suppression of Fas receptor and negative correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1999 Feb; 28(2):82-7.

**Lowe SW, Lin AW.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485–95.

**Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, et al.** XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 1999; 59:2557–61.

**Luscher U, Filgueira L, Juretic A, et al.**(1994) The pattern of cytokine gene expression in freshly excised human metastatic melanoma suggests a state of reversible anergy of tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 57:612-619.

**Mabrouk I, Baccouche S, El-Abed R, et al.** No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010:764-770.

**Madeleine M M, Shera K, Schwartz S M, Daling J R, Galloway D A, Wipf G C, Carter J J, McKnight B, McDougall J K.** The p53 Arg72Pro Polymorphism, Human Papillomavirus, and Invasive Squamous Cell Cervical Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000, 9:225–227.

**Madsen B E, Ramos E M, Boulard M, Katarzyna D, Overgaard J, Nordmark M, Wiuf C, Hansen L L.** Germline Mutation in RNASEL Predicts Increased Risk of Head and Neck, Uterine Cervix and Breast Cancer. *PLoS ONE* 2008, 3(6):2492.

**Magnusson PK, Lichtenstein P, Gyllensten UB.** Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer* 2000, 88(5):698-701.

**Maier C, Haeusler J, Herkommer K, Vesovic Z, Hoegel J, Vogel W, Paiss T.** Mutation screening and association study of RNASEL as a prostate cancer susceptibility gene. *British Journal of Cancer* 2005, 92:1159-1164.

**Malcolm E K, Baber G B, Boyd J C, Stoler M H.** Polymorphism at Codon 72 of p53 Is Not Associated with Cervical Cancer Risk. *Mod Pathol* 2000, 13(4):373–378.

**Marsh M, Helenius A.** Virus entry: open sesame. *Cell*. 2006 Feb 24; 124(4):729-40. Review.

**Maruya E, Saji H, Yokoyama S.** PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-stranded Conformation Polymorphism)--A Simple Method for High-resolution Allele Typing of HLA-DRB1,-DQB1, and -DPB1. *Genome Res* 1996, 6:51-57.

**Matos E, Loria D, Amestoy G M, Herrera L, Prince M A, Moreno J, Krunfly C, van den Brule A J C, Meijer C J L M, Muñoz N, Herrero R.** Prevalence of Human Papillomavirus Infection Among Women in Concordia, Argentina: A Population-Based Study. *Sexually Transmitted Diseases* 2003, 30(8):593-599.

**Matsumoto K, Oki A, Satoh T, et al.** Interleukin-10–1082 gene polymorphism and susceptibility to cervical cancer among Japanese women. *Jpn J Clin Oncol*. 2010; 40: 1113–6.

**Matullo G, Palli D, Peluso M, et al.** XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1437–45.

**Mei J, Duan HX, Wang LL, Yang S, Lu JQ, Shi TY, Zhao Y.** XRCC1 polymorphisms and cervical cancer risk: an updated meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014 Feb; 35(2):1221-31.

**Mi YY, Yu QQ, Xu B, Zhang LF, Min ZC, Hua LX, Feng NH, Yao Y.** Interferon gamma +874 T/A polymorphism contributes to cancer susceptibility: a meta-analysis based on 17 case-control studies. *Mol Biol Rep.* 2011 Oct; 38(7):4461-7.

**Miller S A, Dykes D D, Polesky H F.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988, 16(3).

**Monti P, Leone BE, Zerbi A, Balzano G, Cainarca S, Sordi V, et al.** Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10<sup>high</sup>IL-12<sup>low</sup> regulatory dendritic cell. *J Immunol* 2004, 172:7341-7349.

**Moore JH:** The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum Hered* 2003, 56:73-82.

**Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al.** Interleukin- 10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001, 19:683–765.

**Motoyama S, Ladines-Llave C A, Villanueva S L, Maruo T.** The Role of Human Papillomavirus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. *Kobe J Med Sci* 2004, 50(1):9-19.

**Msal.gov.ar. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud.** Enlace: <http://www.msal.gov.ar/cancercervico-uterino>.

**Münger K, Yee C L, Phelps W C, Pietenpol J A, Moses H L, Howley P M.** Biochemical and Biological Differences between E7 Oncoproteins of the High- and Low-Risk Human Papillomavirus Types Are Determined by Amino-Terminal Sequences. *Journal of Virology* 1991, 65(7):3943-3948.

**Muraki Y, Yoshioka C, Tateishi A, Fukuda J, Haneji T, Kobayashi N.** Localization of Fas antigen in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999 Feb; 37(1):37-40.

**Müschen M, Warskulat U, Beckmann MW.** Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mol Med (Berl).* 2000; 78(6):312-25. Review.

**Nakamura Y.** Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Sci* vol, 2003, 95, 1: 7-11.

**Nakashima J, Tachibana M, Ueno M, et al.** Association between tumor necrosis factor in serum and cachexia in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 1998, 4, 1743-8.

**Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA Jr, Goeddel DV.** Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol*. 1985 Oct; 135(4):2492-7.

**Nei M.** Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, USA, 1987.

**Nelson H. H., Kelsey K. T., Mott L. A., and Karagas M. R.** The XRCC1 Arg399Gln Polymorphism, Sunburn, and Non-melanoma Skin Cancer: Evidence of Gene-Environment Interaction. *Cancer Res*. 2002, 62:152–55.

**Nelson M, SLR Kardia, RE Ferrell, CF Sing.** A combinatorial partitioning method to identify multilocus genotypic partitions that predict quantitative trait variation. *Genome Res*, 11, 2001, pp. 458–470.

**Ngan H Y, Liu V W, Liu S S, Cheng D K, Ng T Y, Wong L C.** Homozygous arginine at codon 72 of p52 has no prognostic significance in cervical cancer. *Tumor Biology* 2000, 21(3):135-138.

**Ni J, Ye Y, Teng F, Wu Q.** Interleukin 10 Polymorphisms and Cervical Cancer Risk: A Meta-Analysis. *International Journal of Gynecological Cancer*: January 2013, 23(1):126–133.

**Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al.** Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989, 342(6250): 705-8.

**Nikolova PN, Pawelec GP, Mihailova SM .** Association of cytokine gene polymorphisms with malignant melanoma in Caucasian population. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:371–379 24.

**Nilsson TK, Johansson CA.** A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the \_13910 C/T polymorphism with pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:287-290.

**Niwa Y, Matsuo K, Ito H, Hirose K, Tajima K, Nakanishi T, Nawa A, Kuzuya K, Tamakoshi A, Hamajima N.** Association of XRCC1 Arg399Gln and OGG1 Ser326Cys polymorphisms with the risk of cervical cancer in Japanese subjects. *Gynecol Oncol*. 2005 Oct; 99(1):43-9.

**Nordström T, Nourizad K, Ronaghi M, Nyrén P.** Method Enabling Pyrosequencing on Double-Stranded DNA. *Analytical Biochemistry* 2000, 282:186–193.

**Oda H, Kumar S, Howley PM.** Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 9557–9562.

**Oliveira S, Sousa H, Santos A M, Pinto D, Pinto-Correia A L, Fontoura D, Moutinho J, Medeiros R.** The p53R72P polymorphism does not influence cervical cancer development in a portuguese population: a study in exfoliated cervical cells. *J of Med Virology* 2008, 80(3):424-429.

**Olshan A. F., Watson M. A., Weissler M. C. and Bell D. A.** *XRCC1* polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Lett.* 2002, 178:181–186.

**Opal SM, Wherry JC and Grint P.** (1998) Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 27:1497–1507.

**Oriss TB, McCarthy SA, Morel BF, Campana MA, Morel PA.** Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. *J Immunol* 1997; 158:3666–72.

**Ortegel JW, Staren ED, Faber LP, et al.** (2002) Modulation of tumor-infiltrating lymphocyte cytolytic activity against human nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 36:17-25.

**Osamu Nunobiki, Masatsugu Ueda, Eisaku Toji, et al.** Genetic Polymorphism of Cancer Susceptibility Genes and HPV Infection in Cervical Carcinogenesis. *Pathology Research International*, vol. 2011, Article ID 364069, 8 pages, 2011.

**Page GP, George V, Go RC et al.** Are we there yet? : Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 2003; 73:711–19.

**Pan F, Tian J, Ji CS, He YF, Han XH, Wang Y, Du JP, Jiang FS, Zhang Y, Pan YY, Hu B.** Association of TNF- $\alpha$ -308 and -238 polymorphisms with risk of cervical cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(11):5777-83.

**Pandey M, Bajaj G D, Rath P C.** Induction of the Interferon-inducible RNA degrading-enzyme, RNase L, by Stress-Inducing agents in the Human Cervical Carcinoma Cells. *RNA Biology* 2004, 1(1):21-27.

**Park JY, Lee SY, Jeon HS, Bae NC, Chae SC, Joo S, et al.** Polymorphism of the DNA repair gene *XRCC1* and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev* 2002; 11:23– 7.

**Pérez, LO, Abba MC, Dulout FN, Golijow CD.** Evaluation of p53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina. *World J Gastroenterol* , 2006, 12(9): 1426-9.

**Pérez-Pérez G I, Portal-Celhay C, Bosques-Padilla F J, Garza-González E.** Desarrollo de un protocolo de pirosecuenciación para la tipificación del polimorfismo -31 del gen de la interleucina 1 $\beta$  en el estudio del riesgo al desarrollo de cáncer gástrico. *Rev Gastroenterol Mex* 2007, 72(1):10-14.

**Picconi M A, Gronda J, Alonio L V, Villa L L, Sichero L, Miranda S, Barcena M, Tevssie A.** Human Papilloma virus in Quechua women from Jujuy with high frequency of cervical cancer: viral types and HPV-16 variants. *Medicina* 2002, 62(3):209-220.

**Platzer C, Docke W, Volk H, et al.** Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J Neuroimmunol* 2000, 105:31-38.

**Platzer, E. Fritsch, T. Elsner, M. H. Lehmann, H. D. Volk, and S. Prosch,** "Cyclic adenosine monophosphate responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells," *European Journal of Immunology* 1999, vol. 29, pp. 3098–3104.

**Poli F, Nocco A, Berra S, et al.** Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. *Eur J Immunogenet.* 2002; 29:237–40.

**Polonikov AV, Ivanov VP, Bogomazov AD, Freidin MB, Illig T, Solodilova MA.** Antioxidant defense enzyme genes and asthma susceptibility: gender-specific effects and heterogeneity in gene-gene interactions between pathogenetic variants of the disease. *Biomed Res Int.*2014; 2014:708903.

**Pompanon F, Bonin A, Bellemain E et al.** Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 2005; 6:847–59.

**Pooja S, Francis A, Bid HK, et al.** Role of ethnic variations in TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  polymorphisms and risk of breast cancer in India. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 126, 739-47.

**Pravica V, Perry C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV.** A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN $\gamma$  gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- $\gamma$  production. *Hum Immunol.* 2000; 61:863–6.

**Raj P.** Classification of medically important viruses. I. DNA Viruses. *Clin Microbiol Newslett* 1994, 16: 121.

**Ratnasinghe L.D., Abnet C., Qiao Y.L., et al.** Polymorphisms of XRCC1 and risk of esophageal and gastric cardia cancer. *Cancer Lett.* 2004, 216:157-64.

**Rebbeck T R, Martínez M E, Sellers T A, Shields P G, Wild C P, Potter J D.** Genetic Variation and Cancer: Improving the Environment for Publication of Association Studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2004, 13(12):1985-1986.

**Rey-Ares, Lucila; Ciapponi, Agustín and Pichon-Riviere, Andrés.** Eficacia y seguridad de la vacuna contra el virus de papiloma humano para la prevención del cáncer de cuello uterino: revisión sistemática y metaanálisis. *Arch. argent. pediatr.* 2012, vol.110, n.6 [cited 2014-09-13], pp. 483-489.

**Ritchie M D, Hahn L W, Roodi N, Bailey R, Dupont W D, Parl F F, Moore J H.** Multifactor- Dimensionality Reduction Reveals High-Order Interactions among Estrogen-Metabolism Genes in Sporadic Breast Cancer. *American Journal of Human Genetics* 2001, 69:138-147.

**Roden RB, Lowy DR, Schiller JT.** Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis* 1997, 176(4): 1076-9.

**Rodriguez M, Yu X, Chen J et al.** Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *J Biol Chem.* 2003, 278:52914–52918.

**Roh J, Kim M, Kim J, et al.** Polymorphisms in codon 31 of p21 and cervical cancer susceptibility in Korean women. *Cancer Lett* 2001, 165(1): 59-62.

**Roh JW, Kim MH, Seo SS et al.** Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. *Cancer Lett* 2002; 184:57–63.

**Rökman A, Ikonen T, Seppälä EH, Nupponen N, Autio V, Mononen N, Bailey-Wilson J, Trent J, Carpten J, Matikainen MP, et al.** Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002, 70: 1299–304.

**Rosenthal AN, Ryan A, Hopster D, Jacobs IJ.** p53 codon 72 polymorphism in vulval cancer and vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2000, 83(10):1287-90.

**Ross DW.** Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine. Springer-Verlag 1998, New York.

**Ruttan CC, Glickman BW.** Coding variants in human double-strand break DNA repair genes. *Mutation Research* 2002, 509(1-2):175–200.

**Santiago MB, DE Lima Marson FA, Secolin R, Ribeiro JD, Lima CS, Bertuzzo CS.** SLC23A2-05 (rs4987219) and KRAS-LCS6 (rs61764370) polymorphisms in patients

with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Lett.* 2014 Jun; 7(6):1803-1811.

**Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, et al.** Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 2000, 74(10):4729-37.

**Schaid, D. J., and Jacobsen, S. J.** Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am. J. Epidemiol.* 1999, 149: 706–711.

**Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM.** The VPH-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993, 75: 495-505.

**Scheffner M, Romanczuk H, Munger K, Huibregtse JM, Mietz JA, Howley PM.** Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994, 186:83-99.

**Schena FP, Cerullo G, Torres DD, Scolari F, Foramitti M, Amoroso A, et al.** Role of interferon-gamma gene polymorphisms in susceptibility to IgA nephropathy: a family-based association study. *Eur J Hum Genet* 2006; 14:488–96.

**Schneider J, Classen V, Helmig S.** XRCC1 polymorphism and lung cancer risk. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008, 8:761-780.

**Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA.** “Interferon-c an overview of signals, mechanisms and functions”. *J Leukoc Biol* 2004; 75:163–89.

**Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H.** Structure and transcription of human papillomaviruses sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 1985, 314: 111-4.

**Scola L, Vaglica M, Crivello A, Palmeri L, Forte GI, Macaluso MC, et al.** Cytokine gene polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1089:104–109 18.

**Seeberg E, Eide L, Bjørns M.** The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 1995, 20: 391–397.

**Shah KV, Howley PM.** Papillomaviruses. En: Fields BN, Knipe DM, (eds). *Fields Virology*, 2nd ed. Eaven Press, New York 1990, 1651-1676.

**Shea P R, Ishwad C S, Bunker C H, Patrick A L, Kuller L H, Ferrell R E.** RNASEL and RNASEL-inhibitor variation and prostate cancer risk in Afro-Caribbeans. *Prostate* 2008, 68(4):354-359.

**Shen H., Xu Y., Qian Y., et al.** Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric carcinoma in a Chinese population. *Int J Cancer*. 2000, 88:601–6.

**Shi TY, Zhu ML, He J, Wang MY, Li QX, Zhou XY, Sun MH, Shao ZM, Yu KD, Cheng X, Wu X, Wei Q.** Polymorphisms of the Interleukin 6 gene contribute to cervical cancer susceptibility in Eastern Chinese women. *Hum Genet*. 2013 Mar; 132(3):301-12.

**Shih CM, Lee YL, Chiou HL, et al.** Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2006, 52, 15-20.

**Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, et al.** Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res*, 2003, 63, 4375-83.

**Shook S J, Beuten J, Torkko K C, Johnson-Pais T L, Troyer D A, Thompson I M, Leach R J.** Association of Rnase L Variants with Prostate Cancer Risk in Hispanic Caucasians and African Americans. *Clin Cancer Res* 2007, 13(19):5959-5964.

**Shuai HL, Luo X, Yan RL, Li J, Chen DL.** XRCC1 polymorphisms are associated with cervical cancer risk and response to chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13:6423–7.

**Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL, Skibola CF, Smith MT, Morgan GJ.** Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2003 Aug 1; 63(15):4327-30.

**Sijvarger C C, González J V, Prieto A, Messmer A G, Mallimaci M C, Alonio V L, Teyssié A R, Picconi M A.** Epidemiología de la infección cervical por virus Papiloma humano en Ushuaia, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2006, 38:19-24.

**Silverman R H.** Implications for Rnase L in Prostate Cancer Biology. *American Chemical Society* 2003, 42(7):1805-1812.

**Smith JR, Freije D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, et al.** Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome1 suggested by a genome-wide search. *Science*, 1996, 274: 1371-4.

**Smith TR, Miller MS, Lohman K, Lange EM, Case LD, et al.** Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett* 2003, 190: 183–190.

**Sobti R. C., Singh J., Kaur P., Pachouria S. S., Siddiquia E. A., Singh Bindrab H.** XRCC1 codon 399 and ERCC2 codon 751 polymorphism, smoking, and drinking and risk of esophageal squamous cell carcinoma in a North Indian population. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007, 175:91-97.

**Sousa H, Breda E, Santos AM, et al.** Genetic risk markers for nasopharyngeal carcinoma in Portugal: tumor necrosis factor alpha -308G >A polymorphism. *DNA Cell Biol,* 2011, 30, 99-103.

**Sousa H, Oliveira S, Santos AM, Catarino R, Moutinho J, Medeiros R.** Tumour necrosis factor alpha 308 G/A is a risk marker for the progression from high-grade lesions to invasive cervical cancer. *Tumour Biol.* 2013 Nov 7.

**Soussi T, May P.** Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol,* 1996, 260(5): 623-37.

**Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, et al.** Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. *Int J Cancer* 2001, 94:792–794.

**Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S.** Polymorphism at the -308 promoter position of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2003; 13:148–53.

**Stern M.C., Umbach D.M., van Gils C.H., Lunn R.M., Taylor J.A.** DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder carcinoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001, 10:125–31.

**Stirdivant S M, Huber H E, Patrick D R, Defeo-Jones D, McAvoy E M, Garsky V M, Oliff A, Heibrook D.** Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein Inhibits DNA Binding by the Retinoblastoma Gene Product. *Molecular and Cellular Biology* 1992, 12 (5):1905-1914.

**Stoler MK.** Human papillomaviruses and cervical neoplasia: A model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol* 2000, 19: 16-28.

**Storey A, Thomas M, Kalita A.** Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998, 393:229-34.

**Sturgis E.M., Castillo E.J., Li L., et al.** Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis.* 1999, 20:2125–9.

**Sun J, Song F, Wang J, Han G, Bai Z, Xie B, Feng X, Jia J, Duan Y, Lei H.** Hidden risk genes with high-order intragenic epistasis in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;41(4):1039-56.

**Sun T, Miao X, Zhang X, Tan W, Xiong P, Lin D.** Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1030–6.

**Sun T, Zhou Y, Li H, Han X, Shi Y, Wang L, Miao X, Tan W, Zhao D, Zhang X, Guo Y, Lin D.** FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med*. 2005 Oct 3; 202(7):967-74.

**Sundelin K, Jadner M, Norberg-Spaak L, Davidsson A, Hellquist HB.** Metallothionein and Fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue. *Eur J Cancer*. 1997 Oct; 33(11):1860-4.

**Szöke K, Szalmás A, Szládek G, et al.** IL-10 promoter nt -1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix. *J Interferon Cytokine Res*. 2004; 24:245–51.

**Tartour E, Gey A, Sastre-Garau X, Lombard Surin I, Mosseri V, Fridman WH.** Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:287–94.

**Thomas L, Matlashewski G, Pim D, Banks L.** Induction of apoptosis by p53 is independent of oligomeric state and can be abolished by VPH 18 E6 through ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene*, 1996, 13: 265-273.

**Thome M, Tschopp J.** Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):50-8. Review.

**Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995 Mar 10; 267(5203):1456-62. Review.

**Tjong MY, van der Vange N, ter Schegget JS, et al.** Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine* 2001, 14:357–60.

**Tonon S A, Picconi M A, Zinovich J B, Liotta D J, Bos P D, Galuppo J A, Alonio L V, Ferreras J A, Teyssi A R.** Human Papillomavirus Cervical Infection and Associated Risk Factors in a Region of Argentina With a High Incidence of Cervical Carcinoma. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 1999, 7:237-243.

**Tonon S A, Picconi M A, Zinovich J B, Nardari W, Mampaey M, Galuppo J A, Bos P D, Badano I, Di Lello F, Basiletti J, González J V, Alonio L V, Teyssié A R.** Prevalence of cervical infection by human papilloma virus (HPV) in the Caucasian and Guaraní populations residing in the province of Misiones, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2003, 35(4):205-213.

**Tulsyan S, Chaturvedi P, Singh AK, Agarwal G, Lal P, Agrawal S, Mittal RD, Mittal B.** Assessment of clinical outcomes in breast cancer patients treated with taxanes: multi-analytical approach. *Gene*. 2014 Jun 10; 543(1):69-75.

**Turek LP.** The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Inf Dis Obstet Gynecol* 1994, 7(5): 237-243.

**Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV.** An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24:1–8.

**Ueda M, Hung YC, Terai Y, Yamaguchi H, Saito J, Nunobiki O, Noda S, Ueki M.** Fas gene promoter -670 polymorphism (A/G) is associated with cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2005 Jul; 98(1):129-33.

**UNICEF.** Immunization Summary, A statistical reference containing data through 2009. New York, USA: World Health Organization; 2011. Accessed: July 7, 2012. Enlace: [http://www.childinfo.org/files/32775\\_UNICEF.pdf](http://www.childinfo.org/files/32775_UNICEF.pdf).

**van Glis CH, Bostick RM, Stern MC, Taylor JA.** Differences in base excision repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk: an example of polymorphisms in the XRCC1 gene. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev* 2002; 11:1279– 84.

**van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo A, McGeoch DJ, Pringle CR, et al.** Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy Viruses. Academic Press, Inc, San Diego, California, 2000.

**Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R.** Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 2001, 75: 4467-4472.

**Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R.** Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100(4): 8211- 8216.

**Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, Natarajaseenivasan K.** Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Mar; 285(3):771-7.

**Vodicka P, Stetina R, Polakova V et al.** Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis*. 2007, 28:657–664.

**Wang GQ, Bao L, Zhao XX, Zhang J, Nan KJ.** Associations between Fas/FasL polymorphisms and susceptibility to cervical cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014 May; 35(5):4107-12.

**Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S.** Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 2001, 20:4740-4749.

**Wang L, Zhou A, Vasavada S, Dong B, Nie H, Church JM, Williams BR, Banerjee S, Silverman RH.** Elevated levels of 2',5'-linked oligoadenylate-dependent ribonuclease L occur as an early event in colorectal tumorigenesis. *Clin Cancer Res*, 1995, 1: 1421–28.

**Wang LE, Cheng L, Spitz MR, Wei Q.** Fas A670G polymorphism, apoptotic capacity in lymphocyte cultures, and risk of lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 42:1– 8.

**Wang T, Wang H, Guo H, Yang S, Zhu G, Guo H, Wang L, Li Y, Yang K, Li H, Min J, Li X, Hu Q, Wang Y, Liu Y, Zhang B, Chen X, Su H.** Polymorphisms in the DNA Repair Gene ERCC2/XPD and Breast Cancer Risk: A HapMap-Based Case-Control Study Among Han Women in a Chinese Less-Developed Area. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014 Aug 12.

**Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, et al.** From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair (Amst)* 2003; 2:901–8.

**Werness BA, Levine AJ, Howley PM.** Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990, 248: 76-79.

**Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, et al.** Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997, vol. 349, no. 9069, pp. 1912–1913.

**White A E, Livanos E M, Tlsty T D.** Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994, 8:666-677.

**Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD, Weinfeld M, Caldecott KW.** XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell.* 2001 Jan 12; 104(1):107-17.

**Wiklund F, Jonsson B A, Brookes A J, Strömquist L, Adolfsson J, Emanuelsson M, Adami H O, Augustsson- Bälter K, Grönberg H.** Genetic Analysis of the RNASEL Gene in Hereditary, Familial, and Sporadic Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* 2004, 10: 7150–7156.

**Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al.** Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94:3195-3199.

**Wong Y F, Chung T K, Cheung T H, Nobori T, Hampton G M, Wang V W, Li Y F, Chang A M.** p53 polymorphism and human papillomavirus infection in Hong Kong women with cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2000, 50(1):60-63.

**Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T.** Human DNA repair genes. *Science* 2001; 291:1284–9.

**Woods DB, Vousden KH.** Regulation of p53 function. *Exp Cell Res*, 2001, 264(1): 56-66.

**World Health Organization International Agency For Research On Cancer.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses 2007, 90:47-49.

**Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, Edberg JC, Cooke J, Xie F, Cooper GS, Kimberly RP.** A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol.* 2003 Jan 1;170(1):132-8.

**Xiang Y, Wang Z, Murakami J, Plummer S, Klein EA, Carpten JD, Trent JM, Isaacs WB, Casey G, Silverman RH.** Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2",5"- oligoadenylates. *Cancer Res* 2003, 63: 6795-801.

**Xing D., Qi J., Miao X., Lu W., Tan W., Lin D.** Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int J Cancer.* 2002, 100:600–5.

**Xu R, Ogino S, Lip V, et al.** Comparison of PCR-RFLP with allele-specific PCR in genetic testing for spinal muscular atrophy. *Genet Test* 2003; 7:277-281.

**Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, Ishikawa M.** Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis* 1999, 20(9):1733-1736.

**Yu Y, Zheng S, Zhang S, Jin W, Liu H, Jin M, Chen Z, Ding Z, Wang L, Chen K.** Polymorphisms of inflammation-related genes and colorectal cancer risk: a population-based case-control study in China. *Int J Immunogenet.* 2014 Aug;41 (4):289-97.

**Zerfass K, Schulze A, Spitkovski D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P.** Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol*, 1995, 69: 6389-6399.

**Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P.** Inactivation of the CDK inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 1996, 13: 2323–2330.

**Zhang HL, Zhang YJ.** A systemic assessment of the association between tumor necrosis factor alpha 308 G/A polymorphism and risk of cervical cancer. *Tumour Biol*. 2013 Jun; 34(3):1659-65.

**Zhang Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Hong WK, Amos CI, Spitz MR, Wei Q.** Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes involved in the death pathway and risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15; 12(18):5596-602.

**Zhou A, Hassel BA, Silverman RH.** Expression cloning of 2–5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 1993, 72: 753–65.

**Zoodsma M, Nolte IM, Schipper M, et al.** Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer*. 2005; 15:282–90.

**Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G.** Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Oct 1; 1551(2):F1-37. Review.

**zur Hausen H.** Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977, 78:1-30.

**zur Hausen H.** Papillomavirus infections- a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996, 1288: 55-78.

**zur Hausen H.** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:342-350.

**zur Hausen H.** Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 2000, 92(9):690-698.