



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Papel del polimorfismo G-308A y
expresión del RNAm del *TNF- α* en la
oncogénesis cervical”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
DANELI GARCIA OCAMPO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. GLORIA FERNÁNDEZ TILAPA

CHILPANCINGO, GRO., JUNIO DE 2008.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica, en colaboración con el Laboratorio de Citopatología y el Laboratorio de Biomédicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, de la Ciudad de Chilpancingo, Gro.

Bajo la dirección de

Dra. Gloria Fernández Tilapa

y la asesoría de

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dr. Vicente Madrid Marina

M. en C. Adolfo Román Román

Esta investigación fue financiada por la Secretaría de Educación Pública a través del Programa Integral de Fortalecimiento Institucional del año 2004 (PIFI 3.1).

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas (de julio de 2005 a julio de 2007) la C. Daneli García Ocampo fue beneficiaria de la beca CONACYT.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	5
III. RESULTADOS	10
IV. DISCUSIÓN	23
V. CONCLUSIONES	28
VI. REFERENCIAS	29

ABREVIATURAS

CaCU	Cáncer cérvicouterino
cDNA	DNA complementario
CMPS	Células mononucleares de sangre periférica
CN	Citología normal (negativo a LEI o malignidad)
CRE	Elementos de respuesta a AMP cíclico
DEPC	Dietilen-pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
IC	Intervalo de confianza
LEI	Lesión escamosa intraepitelial
LEIGA	Lesión escamosa intraepitelial de grado alto
LEIGB	Lesión escamosa intraepitelial de grado bajo
RFLPs	Restricción de fragmentos polimórficos de longitud variable
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
TACE	Enzima que convierte a TNF- α
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral alfa
VPH	Virus del papiloma Humano

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Producto de amplificación del gen de TNF- α .	14
Figura 2	Genotipificación del polimorfismo G-308A de TNF- α .	14
Figura 3	Expresión del RNAm de β -actina y TNF- α .	18
Figura 4	Expresión del RNAm de TNF- α en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU.	19
Figura 5	Distribución de mujeres por nivel de expresión el RNAm de TNF- α en pacientes portadoras del genotipo AA.	22

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1	Prevalencia de tipos de VPH en lesiones premalignas y CaCU. 6
Cuadro 2	Características generales de mujeres con citología normal, LEI y CaCU. 11
Cuadro 3	Diagnóstico citológico e infección por VPH, detectado por PCR, en mujeres con citología normal. 12
Cuadro 4	Frecuencia de infección por VPH en mujeres con citología normal, lesiones premalignas y CaCU. 12
Cuadro 5	Frecuencia de infección por VPH, de acuerdo al riesgo oncogénico, en mujeres con citología normal, lesiones premalignas y CaCU. 13
Cuadro 6	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo G-308A de TNF- α en mujeres con citología normal, lesión escamosa intraepitelial y cáncer cervicouterino. 15
Cuadro 7	Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la presencia de lesión escamosa intraepitelial de grado bajo. 16
Cuadro 8	Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la presencia de lesión escamosa intraepitelial de grado alto. 16
Cuadro 9	Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la presencia de cáncer cervicouterino. 17
Cuadro 10	Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la infección por VPH. 17
Cuadro 11	Frecuencias de expresión de TNF- α y la infección por VPH en mujeres con citología normal. 19
Cuadro 12	Frecuencias de expresión de TNF- α y la infección por VPH en lesiones premalignas y CaCU. 20
Cuadro 13	Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la expresión del RNAm de TNF- α . 21
Cuadro 14	Nivel de expresión del RNAm de TNF- α en CN, lesiones premalignas y CaCU. 22

RESUMEN

Introducción. La expresión de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el sitio de una infección persistente con virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico promueven el proceso de carcinogénesis del cérvix uterino. El desarrollo del tumor puede estar asociado a la producción de niveles altos de TNF- α , relacionados con el genotipo AA del polimorfismo G-308A de TNF- α que se asocia con el aumento en los niveles de expresión del RNAm de esta citocina y con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer cervical invasor. **Objetivo.** Investigar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -308 GA del gen del TNF- α ; determinar si el polimorfismo se relaciona con la expresión de RNAm de TNF- α en el epitelio cervical; y establecer si el polimorfismo G-308A del gen del TNF- α está asociado con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres del estado de Guerrero, así como determinar si el genotipo de riesgo AA se relaciona con la infección por el virus del papiloma humano. **Metodología.** Se estudiaron 100 mujeres citológicamente normales, 47 pacientes con LEIGB, 38 con LEIGA y 33 pacientes con CaCU. En todas las muestras se hizo la detección del DNA del VPH por PCR y la tipificación del virus por RFLPs o por secuenciación. En las 218 muestras de DNA se detectó el polimorfismo G-308A de TNF- α mediante las técnicas de PCR-RFLPs. El mRNA de TNF- α se detectó mediante RT-PCR. **Resultados.** El 89.4% de los casos de LEIGB, 79% de LEIGA, 100% de CaCU y el 54% de las mujeres citológicamente normales fueron positivas al DNA del VPH. Los VPHs de alto riesgo oncogénico fueron los más frecuentes en pacientes con LEI y CaCU. El genotipo GG del polimorfismo G-308A de TNF- α fue el más frecuente en citología normal (84%), LEIGB (70.2%) y LEIGA (81.6%). En CaCU el genotipo GA fue el más frecuente, con un 51.5%. Las pacientes con CaCU portadoras de genotipo GA tienen 9 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo y la infección por VPH. La proporción de pacientes que expresó el RNAm de TNF- α aumentó conforme el grado de lesión, expresándose en el 17.1% de las mujeres con LEIGB y en el 36.4% de casos con CaCU. Las mujeres portadoras del genotipo AA tienen 1.2 veces la probabilidad de expresar el RNAm de la citocina. **Conclusiones.** El polimorfismo G-308A de TNF- α no se relaciona con la expresión de RNAm de TNF- α en el epitelio cervical. El polimorfismo G-308A está asociado con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres del estado de Guerrero.

Palabras claves: Lesión escamosa intraepitelial, cáncer cervical, polimorfismo -308 de TNF- α , México.

ABSTRACT

Introduction. The expression of proinflammatory cytokine, as the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in the site of a persistent infection with the human papilloma virus aid in a high oncogenic risk promotes the process of carcinogenesis of the uterine cervix. The development of the tumor can be associate to the high level productions of TNF- α , relatate with the genotype of AA of polymorphism G-308A of *TNF- α* that is associate with level increase expression of RNAm of this cytokine and with the increase in the risk of developing invasive cervical cancer. **Objective.** Investigate the frequency genotipicas and alelicas of polymorphism -308 GA of gene of TNF- α ; determine if the polymorphism is related with the expression of RNAm of TNF- α in the epitelio cervical; and to establish if the polymorphism G-308A of the gene of TNF- α is associate with the increase the risk to develop cervical cancer in women from the Guerrero state, so as determine if the genotype of risk AA is related with the infection of virus human papilloma. **Methodology.** Studied 100 women cytologically normal, 47 patients with LEIGB, 38 with LEIGA and 33 patients with CaCU. In all the samples we did the DNA of the VPH by PCR detection and the tipification of the aids by RFLPs or by sequencing. In the 218 samples of DNA detected the polymorphism G-308A of TNF- α means of the techniques of PCR-RFLPs. The RNAm of TNF- α it was detected by RT-PCR. **Results.** The 89.4% of the cases of LEIGB, 79% of LEIGA, 100% of CaCU and 54% of the cytologically normal women were positive to the DNA of the VPH. The VPHs of high oncogenico risk were the most frequency in patients with LEI and CaCU. The genotype GG of polimorfismo G-308A of *TNF- α* was most frequent in normal cytology (84%), LEIGB (70.2%) and LEIGA (81.6%). In CaCU genotype GA was most frequent, with a 51.5%. The patients with CaCU carrier of genotype GA have 9 times the risk of developing the disease. Was not statistically significant association between the polymorphism and the infection by HPV. The proportion of patients that expressed the RNAm of TNF- α increased as the degree of injury, expressing in the 17.1% of the women with LEIGB and in the 36.4% of cases with CaCU. The carrier women of genotype AA have 1.2 times the probability of expressing the RNAm of the cytokine. **Conclusions.** The polymorphism G-308A of *TNF- α* is not related with the expression of RNAm of in the cervical epitelio. The polymorphism G-308A of *TNF- α* is associated with the increase in the risk of developing cervical cancer in women of the state of Guerrero.

Key words: Squamous intraepithelial leions, cervical cancer, polymorphism - 308 of TNF- α , Mexico.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvicouterino sigue siendo un problema de salud pública entre las mujeres del mundo; ocupa el segundo lugar entre los tipos de cáncer que afectan a las mujeres y principalmente aquellas que viven en países en vías de desarrollo. En México las tasas de incidencia y mortalidad por esta neoplasia han incrementado durante las pasadas dos décadas. En México, en el año 2003 se reportaron 4,324 defunciones a causa del cáncer cervical. En el periodo de 1990-2000 se registraron 48 761 muertes por cáncer cervical en todo el país; y el estado de Guerrero presentó una de las tasas más altas de mortalidad por esta causa, con 10.91 muertes por cada 100 000 mujeres¹⁻⁷.

La infección por virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico, principalmente VPH tipo 16 y 18, es un factor de riesgo necesario para desarrollar cáncer cervical. Las infecciones por papilomavirus pueden ser transitorias y se estima que del 70 al 90% de las mujeres infectadas pueden eliminar el virus, sin embargo, algunas infecciones persisten y aproximadamente el 1% evoluciona a lesiones que no regresan y pueden progresar a cáncer, esto se debe a diversos factores, entre ellos una deficiente respuesta inmune, predisposición genética, persistencia prolongada de la infección por VPH de alto riesgo oncogénico y la capacidad del virus para evadir la respuesta inmune⁸⁻¹¹.

La respuesta inmune en el epitelio cervical juega un papel importante en la patogénesis del cáncer. Una respuesta inmune deficiente permite que la infección con VPH persista y que algunos de estos casos desarrollen lesiones precancerosas o cáncer invasivo en el cérvix uterino¹². Diversas citocinas que modulan el sistema inmunológico se han visto implicadas en el desarrollo del cáncer; tal es el caso del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), cuyo gen está ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, región p21.3, dentro de la región de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad clase III¹³. TNF- α es una citocina pro-inflamatoria de tipo Th1 que es secretada principalmente por macrófagos activados y linfocitos T; aunque los fibroblastos, queratinocitos, células de Kupffer, células tumorales y células

endoteliales también producen esta citocina en respuesta a estímulos inflamatorios. Esta citocina es sintetizada como un pro-péptido, pro-TNF- α , de membrana de 26 kDa, la cual es cortada y liberada por una metaloproteinasa, enzima que convierte a TNF- α (TACE), como una molécula soluble activa de 17 kDa. TNF- α actúa uniéndose a receptores (TNFRs) que están presentes en todas las células del cuerpo. Los receptores tipo II de TNF- α (TNFRII) tienen alta afinidad por la citocina; por el contrario, los receptores tipo I (TNFRI) requieren altas concentraciones para desencadenar la generación de señales intracelulares. La unión de TNF- α a receptores tipo II induce la producción de señales para activar la proliferación de linfocitos T e inducir una respuesta inflamatoria, mientras que la unión de la citocina a receptores tipo I señala para inducir la muerte de células por citotoxicidad o apoptosis¹³⁻¹⁸.

TNF- α , juega un papel crítico en la patogénesis de enfermedades infecciosas, autoinmunes y malignas. Esta citocina media la carcinogénesis induciendo la proliferación, diferenciación, invasión y metástasis de células tumorales, promueve directamente la angiogénesis estimulando la proliferación de células endoteliales, o de manera indirecta, modulando la expresión de otros factores proangiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor (VEGF2). TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, permitiendo a los neutrófilos y los macrófagos el desplazamiento hacia el tejido dañado y sitios donde hay una infección; actúa como factor de crecimiento incrementando los reguladores positivos del ciclo celular y disminuyendo los niveles de inhibidores de CDK. TNF- α aumenta la expresión de receptores para factores de crecimiento que desencadenan vías de señalización tales como Ras o c-MYC, promueve la remodelación del tumor estimulando la actividad de macrófagos y fibroblastos, la motilidad de células tumorales y la invasión del tumor vía inducción de las metaloproteinasas (MMPs)¹⁵⁻²².

Los niveles de TNF- α en la circulación pueden ser regulados en diferentes etapas: a nivel transcripcional pueden ser modificados por varios polimorfismos que se

encuentran en la región promotora del gen, los cuales se han visto asociados con el nivel de producción de la citocina; a nivel post-transcripcional, en el corte de la proteína de TNF- α para liberarla como proteína soluble y en la expresión de receptores^{23,24}. Varios investigadores han estudiado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la región promotora de *TNF- α* y las implicaciones que éstos pueden tener en diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer cervical. Entre esos SNPs está el G-308A, cerca del sitio de arranque transcripcional del gen, donde hay un cambio del nucleótido guanina (G) por adenina (A), cambio que se ha visto que afecta la expresión de *TNF- α* . El alelo G se asocia con niveles de producción baja de la citocina, mientras que el alelo A se relaciona con niveles elevados de esa proteína. Kroeger *et al.*, informaron que en presencia del alelo -308A se incrementa dos veces el nivel de transcripción de TNF- α , con respecto al alelo -308G. Cabera *et al.*, demostraron que las células que contienen el alelo -308A producen seis veces más RNAm que aquellas que contienen el alelo -308 G. Stanczuk *et al.*, reportaron que los niveles de producción de TNF están relacionados con los genotipos presentes en la posición -308 de la región promotora del gen; así, las personas homocigotas GG producen niveles bajos de TNF, las heterocigotas GA producen niveles medios y los homocigotas AA producen niveles elevados^{12,19,25}. La variación en el nivel de expresión de TNF- α se atribuye a que el cambio de nucleótido afecta los sitios de unión afines a factores de transcripción como NF κ B, elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), proteínas activadoras 1 y 2 (AP) y factor activador nuclear de células T^{19,21,23, 26}. Estos hallazgos sugieren que el desarrollo del tumor puede estar asociado a la predisposición genética del huésped para producir niveles elevados de TNF- α ya que el genotipo AA del polimorfismo G-308A de *TNF- α* se relaciona con el aumento en los niveles de expresión del RNAm de esta citocina y con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer cervical invasor²⁷. Los niveles incrementados de TNF- α favorecen la angiogénesis en el sitio donde se desarrolla el tumor. Se sabe que el genotipo GA puede ser suficiente para modificar la actividad transcripcional de TNF- α y la expresión del RNAm²⁵.

En México no hay estudios publicados que relacionen el polimorfismo G-308A de *TNF- α* con los niveles de expresión del RNAm y el papel que juega este SNP en cáncer cervical. *TNF- α* es una citocina multifuncional, puede participar en los procesos de carcinogénesis; se sabe que la producción excesiva de la citocina se relaciona con la susceptibilidad o severidad de enfermedades como cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer pancreático. La expresión de *TNF- α* es regulada a nivel transcripcional y los polimorfismos en la región promotora se asocian con el nivel de producción de la citocina y con el pobre pronóstico en la enfermedad^{23,24}; por lo tanto, es probable que el genotipo AA del polimorfismo G-308A de la región promotora del gen de *TNF- α* esté relacionado con el aumento en los niveles de RNAm en el sitio de la lesión o del tumor y con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres del estado de Guerrero.

El objetivo de este trabajo fue investigar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -308 GA del gen del *TNF- α* ; determinar si el polimorfismo se relaciona con la expresión de RNAm de *TNF- α* en el epitelio cervical; y establecer si el polimorfismo G-308A del gen del *TNF- α* está asociado con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer cervical en mujeres del estado de Guerrero, así como determinar si el genotipo de riesgo AA se relaciona con la infección por el virus del papiloma humano.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de casos. De marzo de 2006 a agosto de 2007 se realizó un estudio transversal comparativo. Se seleccionaron 118 muestras de DNA y RNA de mujeres atendidas en el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” de la ciudad de Acapulco y en la Clínica de Displasias “Alameda” de la ciudad de Chilpancingo. Con base en el diagnóstico histopatológico, los casos se agruparon en: 47 pacientes de lesión escamosa intraepitelial de grado bajo (LEIGB), 38 de lesión escamosa intraepitelial de grado alto (LEIGA) y 33 de cáncer cervicouterino (CaCU). Todos los casos contaban con una encuesta y con el resultado de la detección y genotipificación del VPH.

El rango de edad de las pacientes con LEIGB fue de 18 a 62 años, en LEIGA de 18 a 71 años y en mujeres con CaCU fue de 29 a 97 años. Se seleccionaron 118 casos, 105 de ellos eran positivos al DNA del VPH. De las mujeres con LEI y CaCU infectadas, el 93.3% (98/105) tenían virus de alto riesgo oncogénico y de ellas el 67.6% (71/105) tenía VPH tipo 16. El 2.9% (3/105) de las mujeres consideradas como caso tenían infección por virus de bajo riesgo oncogénico y el 3.8% (4/105) infección múltiple, cuadro 1.

Cuadro 1. Prevalencia de tipos de VPH en lesiones premalignas y CaCU.

Genotipos de VPH	LEIGB n=47*	LEIGA n= 38*	CaCU n=33*	Total* n (%)
	n (%)	n (%)	n (%)	
Sin infección	5 (10.6)	8 (21)	0	13 (11)
Infectados	42 (89.4)	30 (79)	33 (100)	105 (89)
Tipos virales de alto riesgo	42 (100)	23 (76.7)	33 (100)	98 (93.3)
Tipos virales de bajo riesgo	0	3 (10)	0	3 (2.9)
Infección múltiple	0	4 (13.3)	0	4 (3.8)
VPH de alto riesgo				
16	30 (71.4)	17 (56.7)	24 (72.7)	71 (67.6)
18	3 (7.1)	1 (3.3)	6 (18.2)	10 (9.5)
31	4 (9.5)	3 (10)	2 (6.1)	9 (8.6)
33	1 (2.3)	1 (3.3)	0	2 (1.9)
58	3 (7.1)	0	1 (3.0)	4 (3.8)
59	1 (2.3)	1 (3.3)	0	2 (1.9)
VPH de bajo riesgo				
70	0	1 (3.3)	0	1 (1)
81	0	2 (6.7)	0	2 (1.9)
Infección múltiple	0	4 (13.3)	0	4 (3.8)
Total	42 (100)	30 (100)	33 (100)	105 (100)

*Los porcentajes de cada genotipo se calcularon de acuerdo a las mujeres VPH positivas en cada diagnóstico.

Mujeres citológicamente normales. Se incluyeron 100 mujeres citológicamente normales diagnosticadas mediante la prueba de Papanicolaou, captadas en el servicio de detección oportuna de cáncer cervicouterino del Laboratorio de Citopatología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la ciudad de Chilpancingo. A todas las mujeres se les aplicó una encuesta, y se obtuvieron muestras de células exfoliadas de la zona de transformación del cérvix uterino por medio de un cepillo citológico (citobrush). Las muestras se depositaron en tubos Eppendorf que contenían 1 mL de TRIzol y se almacenaron a -70° C hasta su procesamiento.

Extracción de DNA y RNA de mujeres citológicamente normales y líneas celulares de cáncer cervical. El DNA geonómico y el RNA total se extrajeron por el

método de TRIzol²⁸; la cuantificación se realizó en un Biofotómetro (Eppendorf Biophotometer 22331, Hamburg Germany).

Detección y genotipificación del VPH en mujeres con citología normal. La búsqueda del DNA del VPH se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y RFLPs en el Laboratorio de Biomolécula Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Obtención de RNA de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). A partir de sangre periférica de un paciente con problemas de artritis se obtuvieron CMSP a las que se les extrajo el RNA total que sirvió como control positivo de la expresión del RNAm de TNF- α . Las CMSP fueron aisladas por centrifugación en gradiente con Ficoll-Hypaque y el RNA extrajo por el método de TRIzol²⁸.

Genotipificación del polimorfismo G-308A de TNF- α . El polimorfismo G-308A del gen de TNF- α se detectó por PCR-RFLPs. La PCR se realizó usando los oligonucleótidos: *sentido* 5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGG \underline{C} CAT-3' y *antisentido* 5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3' que amplificaron un fragmento de la región promotora del gen de TNF- α que incluye la posición donde se encuentra el polimorfismo. La mezcla de reacción consistió de 0.2 μ g de DNA geonómico, 0.15 mM dNTPs, 5 pmoles de cada oligonucleótido, 2.5 mM de MgCl₂, 2.5 μ l de Buffer y 1 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, Brazil), en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94° C por 3 min; 35 ciclos a 94° C por 30 s, 59° C por 45 s y 72° C por 1 min; y un ciclo de extensión final a 72° C por 2 min en el Termociclador Eppendorf (Hamburg, Germany). El producto de amplificación fue de 147 pb y se observó en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Cinco μ l de producto de PCR fueron digeridos toda la noche a 37° C en un volumen final de reacción de 10 μ l, que contenían 2 U de enzima de restricción NcoI (BioLabs, New England). Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.5%, teñidos con bromuro de etidio y se observaron en el fotodocumentador Gel

Documentation Systems (Gel Doc 2000TM, BIO-RAD, Italia). La enzima *Nco*I corta al alelo G originando dos fragmentos, uno 124 pb y otro de 23 pb; el alelo A no es reconocido por la enzima, quedando un fragmento de 147 pb^{29, 30}.

Síntesis de DNA complementario. El RNA total resuspendido en 18 μ l de H₂O estéril tratada con DEPC, se trató con 8 U de DNasa I (Amersham Biosciences, USA) para eliminar el DNA contaminante. En la síntesis de DNA complementario (cDNA) se utilizaron 2.5 μ g de RNA total. Para la retrotranscripción (RT) se utilizaron 0.25 μ g de Oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen, Brazil), 100 U MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase), 0.5 mM de dNTP's, Buffer RT, 0.01 mM de DTT, 2.58 U de inhibidor de RNAasas (Amersham Biosciences, USA), en un volumen final de 25 μ l. La reacción se incubó a 70° C por 10 minutos para el alineamiento y la extensión se realizó a 37° C por 1 hora 50 minutos. La enzima MMLV-RT se inactivó incubando la reacción a 90° C por 10 minutos. El cDNA se almacenó a -20° C hasta su procesamiento.

Análisis de la expresión del RNAm de TNF- α . Todas las muestras de cDNA se sometieron a PCR para el gen constitutivo β -actina, con la finalidad de valorar la integridad del RNAm, evaluar la síntesis del cDNA y semicuantificar el nivel de expresión del gen de TNF- α . Para amplificar un fragmento del gen β -actina se utilizaron los oligonucleótidos: *sentido* 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' y *antisentido* 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'; la mezcla de PCR consistió de 2.5 μ l de Buffer, 0.1 mM dNTP's, 2 mM MgCl₂, 5 pmoles de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, Brazil) y 2 μ l de cDNA; la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l. El programa de amplificación fue: 94° C por 5 min, seguida de 29 ciclos a 94° C por 30 s, 57° C por 30 s, 72° C por 30 s y un ciclo de extensión final a 72° C por 5 min, obteniéndose un producto de 540 pb. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en el fotodocumentador Gel Documentation Systems Gel Doc 2000TM, BIO-RAD, Italia).

Las muestras positivas al RNAm de β -actina se sometieron a PCR para valorar la expresión del RNAm de TNF- α , para el efecto se usaron los oligonucleótidos: *sentido* 5'-GAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCA-3' y *antisentido* 5'-GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCAGACT-3'; en cada PCR se utilizaron 2.5 μ l de Buffer, 0.2 mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂, 12 pmoles de oligonucleótido sentido, 10 pmoles de oligonucleótido antisentido, 1 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, Brazil) y 2 μ l de cDNA, la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ l. La PCR se realizó en un Termociclador Eppendor (Hamburg, Germany), el programa de amplificación consistió de un ciclo a 95° C por 5 min y 32 ciclos de 95° C por 50 s, 60° C por 50 s y 72° C por 90 s; con un ciclo de extensión final a 72° C por 5 min, obteniéndose un producto de 444 pb. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en el fotodocumentador Gel Documentation Systems Gel Doc 2000TM, BIO-RAD, Italia).

Para semicuantificar el RNAm de TNF- α se midió la densidad de la banda del producto de PCR en un fotodocumentador Gel Documentation Systems Gel Doc 2000TM, BIO-RAD, Italia) utilizando el programa Quantity one Gel Doc Acquisition Windows y se normalizó con la densidad de la banda del producto de PCR de β -actina. Se calculó la relación de unidades arbitrarias de densidad de TNF- α /unidades de densidad de β -actina.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS versión 12.0 y STATA versión 9.2. Se determinaron frecuencias simples para variables cualitativas; media y desviación estándar para variables cuantitativas con distribución normal. Mediante modelos de regresión logística no condicional se determinó la asociación entre los genotipos de TNF- α y el riesgo de desarrollar cáncer cervical, calculando los valores de razón de productos cruzados (OR) a un intervalo de confianza del 95%, también utilizamos modelos ajustados por riesgo oncogénico de VPH, números de partos e IVSA.

III. RESULTADOS

Características generales de mujeres con citología normal, LEI y CaCU.

Se estudiaron 218 mujeres: 118 casos (LEIGB, LEIGA y CaCU) y 100 mujeres con citología normal (CN). La edad media de las pacientes fue de 35.4 ± 9.5 en mujeres con LEIGB, en LEIGA de 32.5 ± 12.6 , en CaCU de 49.9 ± 15.8 y en mujeres con citología normal fue de 36.4 ± 9.6 ; se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$) entre el promedio de edad de los casos comparado con el de las mujeres con CN.

El 68.1% de las pacientes con LEIGB tenían una edad entre 18-39 años y en CaCU el 75.8% eran mujeres de 40 y más años de edad sin embargo, se encontró que una mujer de 29 años ya padecía esta enfermedad. El 75.7% de las pacientes con CaCU, el 83% de las pacientes con LEIGB y el 50% de mujeres con CN tuvieron su primera relación sexual a los 20 o menos años de edad. La mayor proporción de las mujeres con LEIGA (31.6%) y LEIGB (44.7%) reportaron tener de 1 a 2 hijos, mientras que el 75.8% de las pacientes con CaCU refirieron haber tenido 5 o más hijos; en contraposición, de las mujeres con citología normal el 58% eran nulíparas y solo el 3% reportó haber tenido 5 o más hijos. El 100% de las pacientes con CaCU y el 54% de las mujeres con citología normal cursaban con una infección por virus del papiloma humano, cuadro 2.

Cuadro 2. Características generales de mujeres con citología normal, LEI y CaCU.

Características	Diagnóstico			
	CN ^a n= 100 n (%)	LEIGB ^b n= 47 n (%)	LEIGA ^c n= 38 n (%)	CaCU ^d n= 33 n (%)
Edad (Años)				
18-39	64 (64)	32 (68.1)	25 (65.8)	7 (21.2)
≥40	36 (36)	15 (31.9)	11 (28.9)	25 (75.8)
Sin Datos	0 (0)	0 (0)	2 (5.3)	1 (3.0)
Edad IVSA ^e (años)				
≤20	50 (50)	39 (83.0)	30 (78.9)	25 (75.7)
21-25	35 (35)	5 (10.6)	3 (7.9)	0 (0)
≥26	14 (14)	2 (4.3)	2 (5.3)	2 (6.1)
Sin datos	0 (0)	1 (2.1)	3 (7.9)	6 (18.2)
Paridad				
Ninguno	58 (58)	8 (17.0)	10 (26.3)	1 (3.0)
1-2	31 (31)	21 (44.7)	12 (31.6)	2 (6.1)
3-4	8 (8)	11 (23.4)	8 (21.0)	4 (12.1)
≥5	3 (3)	6 (12.8)	6 (15.8)	25 (75.8)
Sin Datos	0 (0)	1 (2.1)	2 (5.3)	1 (3.0)
VPH ^f				
Negativo	46 (46)	5 (10.6)	8 (21.0)	0 (0)
Positivo	54 (54)	42 (89.4)	30 (79.0)	33 (100)

^aCitología normal, ^bLesión escamosa intraepitelial de grado bajo, ^cLesión escamosa intraepitelial de grado alto, ^dCáncer Cervicouterino, ^eInicio de vida sexual activa, ^fVirus del Papiloma Humano

Las 100 mujeres incluidas en el grupo de citología normal resultaron negativas a infección por VPH en la prueba de Papanicolaou; sin embargo, al confirmar el resultado por diagnóstico molecular (PCR), se detectó el DNA del virus en 54 muestras (54%), cuadro 3.

Cuadro 3. Diagnóstico citológico e infección por VPH, detectado por PCR, en mujeres con citología normal.

Diagnóstico Citológico (PAP)	Diagnóstico molecular de infección por VPH		Total
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	n (%)
Proceso inflamatorio inespecífico y cervicovaginitis aguda incipiente. Negativo a VPH	18 (18)	16 (16)	34 (34)
Sin inflamación. Negativo a VPH	8 (8)	5 (5)	13 (13)
Proceso inflamatorio específico. Negativo a VPH	6 (6)	3 (3)	9 (9)
Proceso inflamatorio inespecífico. Negativo a VPH	22 (22)	22 (22)	44 (44)
Total	54 (54)	46 (46)	100 (100)

Nota: Los % se calcularon por columna tomando en cuenta a las 100 mujeres con citología normal.

Todas las pacientes con CaCU presentaron infección por VPH, en LEI el porcentaje de infección por este virus fue alto y el 54% de las mujeres con citología normal también tenían el virus, cuadro 4.

Cuadro 4. Frecuencia de infección por VPH en mujeres con citología normal, lesiones premalignas y CaCU.

Diagnóstico	Diagnóstico molecular de infección por VPH		Total
	VPH positivo n (%)	VPH negativo n (%)	n (%)
CN	54 (54)	46 (46)	100 (100)
LEIGB	42 (89.4)	5 (10.6)	47 (100)
LEIGA	30 (79.0)	8 (21.0)	38 (100)
CaCU	33 (100)	0 (0)	33 (100)

En lesiones premalignas y CaCU se tipificó el 100% de los casos de infección por VPH. En LEIGB y CaCU solo se detectaron virus de alto riesgo oncogénico; en las mujeres con LEIGA infectadas, el 76.7% tenían tipos virales de alto riesgo, el 10% de bajo riesgo y en el 13.3% se diagnosticó infección múltiple. En mujeres con citología normal se tipificó el 16.7% de los VPH detectados y, de éstos, el 55.6% eran genotipos de bajo riesgo, el 11.1% de alto riesgo y el 22.2% de riesgo no determinado, cuadro 5.

Cuadro 5. Frecuencia de infección por VPH, de acuerdo al riesgo oncogénico, en mujeres con citología normal, lesiones premalignas y CaCU.

Genotipos de VPH	Diagnóstico			
	CN* n=100 n (%)	LEIGB* n=47 n (%)	LEIGA* n=38 n (%)	CaCU* n=33 n (%)
Infectados	54 (54)	42 (89.4)	30 (79)	33 (100)
VPH sin tipificar	45 (83.3)	--	--	--
VPH tipificados	9 (16.7)	42 (100)	30 (100)	33 (100)
VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 58, 59)	1 (11.1)	42 (100)	23 (76.7)	33 (100)
VPH de probable alto riesgo (53)	1 (11.1)	--	--	--
VPH de bajo riesgo (6, 61, 70, 81)	5 (55.6)	--	3 (10.0)	--
Infección múltiple	--	--	4 (13.3)	--
VPH de riesgo no determinado (32, 83)	2 (22.2)	--	--	--

*Los porcentajes de cada genotipo viral se calcularon de acuerdo a los VPH tipificados en cada diagnóstico.

Detección del polimorfismo G-308A de TNF- α .

En mujeres con citología normal, LEI y CaCU se realizó la detección y genotipificación molecular del polimorfismo G-308A del gen de TNF- α por las técnicas de PCR-RFLPs, figuras 1 y 2.

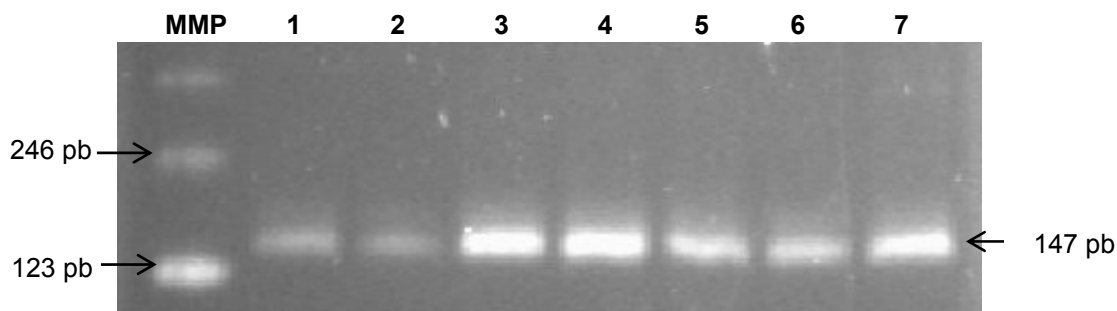


Figura 1. Producto de amplificación del gen de TNF- α . MMP: Marcador de peso molecular DNA Ladder de 123 pb; Carril 1: control negativo de la PCR, en el que se sustituyó el DNA por agua; carril 2 al 7; fragmentos de amplificación de 147pb.

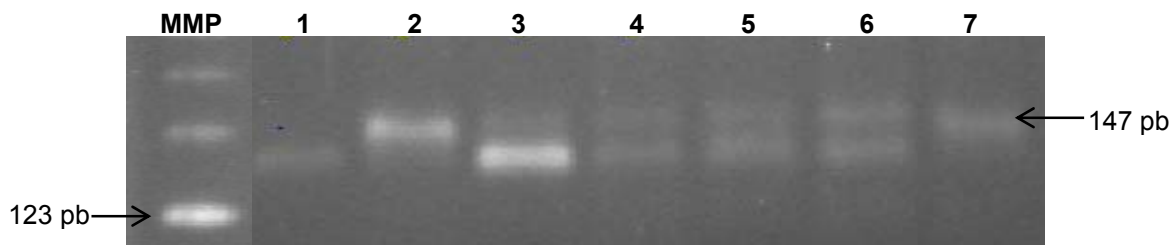


Figura 2. Genotipificación del polimorfismo G-308A de TNF- α . MMP: Marcador de peso molecular DNA Ladder de 123 pb; Carril 1: homocigoto G; Carril 2 y 7: homocigoto A; Carril 3-6 heterocigotos (G/A).

El genotipo GG fue el más frecuente en mujeres citológicamente normales (84%) y en quienes presentaban lesiones escamosas intraepiteliales (70.2% en LEIGB y 81.6% en LEIGA); sin embargo en los casos de CaCU el genotipo GA fue el más prevalente (51.5%). El genotipo AA se encontró con más frecuencia en LEIGB (19.2%) y CaCU (9.1%), mientras que en CN sólo el 4% de las mujeres fue homocigota A. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre los grupos de estudio. El alelo G predominó en la población de mujeres con citología normal con 0.9, en LEIGB con 0.75 y LEIGA con 0.88; en pacientes con CaCU el alelo A se presentó en un 0.35, cuadro 6.

Cuadro 6. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo G-308A de TNF- α en mujeres con citología normal, lesión escamosa intraepitelial y cáncer cervicouterino.

Genotipos	Diagnóstico			
	CN n= 100 n (%)	LEIGB n= 47 n (%)	LEIGA n= 38 n (%)	CaCU n= 33 n (%)
GG	84 (84)	33 (70.2)	31 (81.6)	13 (39.4)
GA	12 (12)	5 (10.6)	5 (13.1)	17 (51.5)
AA	4 (4)	9 (19.2)	2 (5.3)	3 (9.1)
Frecuencias alélicas				
Alelo A	0.1	0.25	0.12	0.35
Alelo G	0.9	0.75	0.88	0.65

Se tipificaron cuatro líneas celulares de cáncer cervical, CaSki, SiHa, HeLa y C33A. Las tres últimas presentaron el genotipo GA y CaSki el genotipo GG.

Asociación del polimorfismo G-308A del gen de TNF- α con LEIGB, LEIGA y CaCU.

El OR crudo obtenido demostró asociación significativa del genotipo de riesgo AA con la presencia de LEIGB (OR crudo de 5.7 con un IC_{95%} de 1.7-19.6), sin embargo al realizar el OR ajustado por riesgo oncogénico del VPH, número de partos e IVSA se encontró que las mujeres portadoras del genotipo AA tienen 2.4 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad en comparación con las portadoras del genotipo GG, aunque dicha asociación no fue estadísticamente significativa, cuadro 7.

Cuadro 7. Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la presencia de lesión escamosa intraepitelial de grado bajo.

Genotipos	CN		LEIGB		OR ⁺	(IC _{95%})	OR ⁺⁺	(IC _{95%})
	n	%	n	%				
GG	84	84	33	70.2	1.0*	—	1.0*	—
GA	12	12	5	10.6	0.9	0.3-2.6	1.4	0.4- 5.2
AA	4	4	9	19.2	5.7	1.7-19.6	2.4	0.6-9.5
AA+GA	16	16	14	29.79	2.2	1.0-5.1	2.0	0.7-5.2

*Categoría de referencia, OR⁺ Razón de momios no ajustada, OR⁺⁺ Razón de momios ajustada por riesgo oncogénico de VPH, número de partos e IVSA estimada mediante regresión logística no condicional.

En los resultados de asociación entre los genotipos del polimorfismo estudiado y la presencia de LEIGA no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, cuadro 8.

Cuadro 8. Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la presencia de lesión escamosa intraepitelial de grado alto.

Genotipos	CN		LEIGA		OR ⁺	(IC _{95%})	OR ⁺⁺	(IC _{95%})
	n	%	n	%				
GG	84	84	31	81.6	1.0*	--	1.0*	--
GA	12	12	5	13.1	1.1	0.4-3.4	1.7	0.5-6.3
AA	4	4	2	5.3	1.3	0.2-7.6	1.0	0.3-3.4
AA+GA	16	16	7	18.4	1.2	0.4-3.2	1.0	0.3-3.2

*Categoría de referencia, OR⁺ Razón de momios no ajustada, OR⁺⁺ Razón de momios ajustada por riesgo oncogénico de VPH, número de partos e IVSA estimada mediante regresión logística no condicional.

Existe una asociación significativa entre el genotipo GA del polimorfismo G-308A de TNF- α con el CaCU. El OR crudo fue de 7.8 (IC_{95%} 3.1-19.4); y cuando se ajusta por riesgo oncogénico del VPH, número de partos e IVSA aumenta a 9.0 con un IC_{95%} de 1.6 a 48.9, cuadro 9.

Cuadro 9. Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la presencia de cáncer cervicouterino.

Genotipos	CN		CaCU		OR ⁺	(IC _{95%})	OR ⁺⁺	(IC _{95%})
	n	%	n	%				
GG	84	84	13	39.4	1.0*	--	1.0*	--
GA	12	12	17	51.5	7.8	3.1-19.4	9.0	1.6-48.9
AA	4	4	3	9.1	2.4	0.5-11.3	0.3	0.1-1.5
AA+GA	16	16	20	60.6	8.1	3.4-19.5	3.1	0.7-14.0

*Categoría de referencia, OR⁺ Razón de momios no ajustada, OR⁺⁺ Razón de momios ajustada por riesgo oncogénico de VPH, número de partos e IVSA estimada mediante regresión logística no condicional.

Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la infección por VPH.

En mujeres con CN, lesiones premalignas y CaCU se encontró asociación del genotipo GA con la infección por VPH, aunque ésta no fue estadísticamente significativa (OR 2.3, IC_{95%} 0.9-5.7), cuadro 10.

Cuadro 10. Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la infección por VPH.

Genotipos	Infección por VPH		OR	IC _{95%}
	VPH Negativas	VPH positivas		
	n	n		
GG	47	114	1.0	---
GA	6	33	2.3	0.9- 5.7
AA	6	12	0.7	0.3-2.0
AA+GA	12	45	1.5	0.7-3.1

Expresión del RNAm de TNF- α en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU.

Todas las muestras positivas al gen constitutivo β -actina, figura 3, se sometieron a PCR para detectar el RNAm de TNF- α .

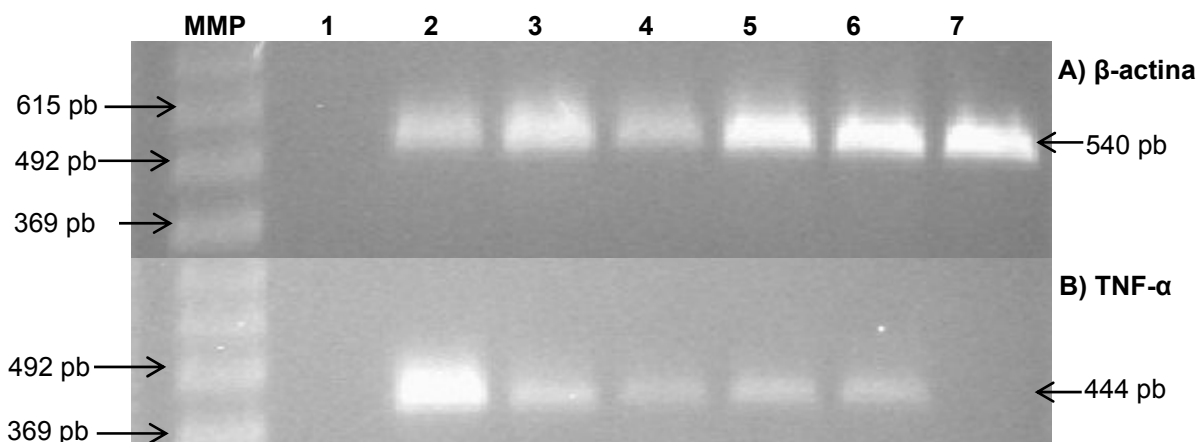


Figura 3. Expresión del RNAm de β -actina y TNF- α . A) MMP: Marcador de peso molecular DNA Ladder de 123 pb; Carril 1: Control negativo; Carril 2: control positivo; Carril 3-7: muestras positivas al RNAm del gen constitutivo β -actina. B) MMP: Marcador de peso molecular DNA Ladder de 123 pb; Carril 1: Control negativo; Carril 2: Control positivo; Carril 3-6: Muestras de CN que expresaron el RNAm de TNF- α ; Carril 7: Muestra de CN negativa a TNF- α .

El 44% de las mujeres con citología normal expresaron el RNAm de TNF- α y entre los casos la proporción de pacientes que expresó el RNAm de esta citocina incrementó gradualmente conforme aumentó el grado de lesión, expresándose sólo en el 17.1% de casos de LEIGB, mientras que en CaCU el 36.4% expresó la citocina, figura 4.

Ninguna de las líneas celulares de cáncer cervical expresaron el RNAm de TNF- α .

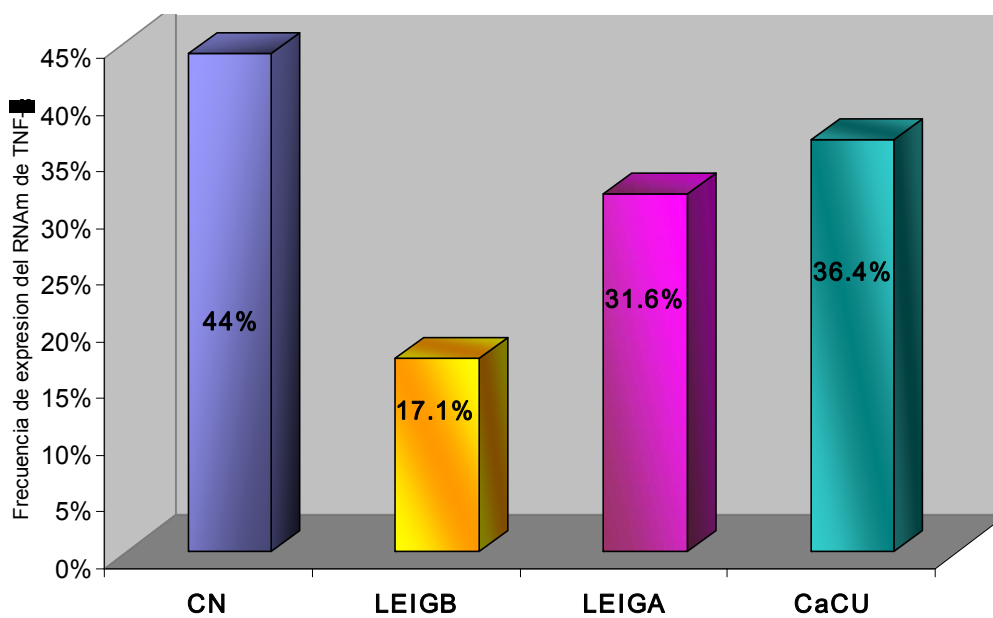


Figura 4. Expresión del RNAm de TNF- α en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU

El 95.5% (42/44) de las mujeres con citología normal que expresaron el RNAm de TNF- α cursaban con un proceso inflamatorio específico o inespecífico, el 50% (21/42) de éstas, además de inflamación inespecífica presentaba cervicovaginitis aguda incipiente. El 56.9% (25/44) expresaron el RNAm de TNF- α y fueron VPH positivas por el método molecular, cuadro 11.

Cuadro 11. Frecuencias de expresión de TNF- α y la infección por VPH en mujeres con citología normal.

Diagnóstico Citológico	RNAm de TNF- α positivo		
	VPH positivo	VPH negativo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Proceso inflamatorio inespecífico y cervicovaginitis aguda incipiente. Negativo a VPH	15 (34.1)	6 (13.6)	21 (47.7)
Sin inflamación. Negativo a VPH	1 (2.3)	1 (2.3)	2 (4.5)
Proceso inflamatorio específico. Negativo a VPH	1 (2.3)	2 (4.5)	3 (6.8)
Proceso inflamatorio inespecífico. Negativo a VPH	8 (18.2)	10 (22.7)	18 (41)
Total	25 (56.9)	19 (43.1)	44 (100)

De los 32 casos de LEI y CaCU que expresaron el RNAm de TNF- α , 28 eran VPH-positivos y 27 de esos tenían genotipos de alto riesgo oncogénico. En LEIBG 6 pacientes expresaron el RNAm de TNF- α y además cursaban con infección por virus de alto riesgo oncogénico; en LEIGA 10 pacientes expresaron TNF- α , 9 de ellas tenían infección por virus de alto riesgo y una paciente cursaba con una infección múltiple; en CaCU, las 12 mujeres que expresaron la citocina cursaban con infección por VPH de alto riesgo, cuadro 12.

Cuadro 12. Frecuencias de expresión de TNF- α y la infección por VPH en lesiones premalignas y CaCU.

Diagnóstico Histológico	RNAm de TNF- α positivo	
	VPH positivo	VPH negativo
	n (%)	n (%)
LEIGB	6 (21.4)	2 (50)
LEIGA	10 (35.7)	2 (50)
CaCU	12 (42.9)	0 (0)
Total	28 (100)	4 (100)

Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la expresión del RNAm de TNF- α .

Al relacionar el polimorfismo del gen de TNF- α con la expresión del RNAm, se encontró que las mujeres portadoras del genotipo AA tienen 1.2 veces la probabilidad de expresar el mensajero de la citocina, en comparación con las que presentan el genotipo GG. No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos y la expresión del mensajero, cuadro 13.

Cuadro 13. Asociación del polimorfismo G-308A de TNF- α con la expresión del RNAm de TNF- α .

Genotipos	Expresión del RNAm de TNF- α		OR	IC _{95%}
	Negativas	Positivas		
GG*	104	57	1.0*	--
GA	27	12	0.8	0.4-1.7
AA	11	7	1.2	0.4-3.3
AA+GA	38	19	0.9	0.5- 1.7

Nivel de expresión del RNAm de TNF- α en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU

Para categorizar el nivel de expresión del RNAm de TNF- α en mínima, moderada y alta se calcularon terciles y aquellas muestras en las que no se detectó el mensajero de esta citocina se clasificaron como de expresión nula. Del total de muestras analizadas, 76/218 (34.9%) expresaron el RNAm de TNF- α , y de éstas el 32.9% (25/76) presentaron una expresión mínima, el 32.9% (25/76) expresión moderada y el 34.2% (26/76) tuvieron una expresión alta. De las 44 mujeres con citología normal que expresaron el RNA mensajero de TNF- α el 40.9% (18/44) tuvo niveles mínimos de expresión; el 31.8% (14/44) niveles moderados y el 27.3% (12/44) niveles altos. En el grupo de LEIGB, 8 pacientes expresaron el RNA mensajero de TNF- α , el 12.5% (1/8) tuvo niveles mínimos; el 50% (4/8) niveles moderados y el 37.5% (3/8) niveles altos. En LEIGA 12 pacientes expresaron el mensajero de TNF- α , el 16.7% (2/12) tuvo niveles mínimos; el 25% (3/12) niveles moderados y el 58.3% (7/12) niveles altos. En CaCU el porcentaje de pacientes que expresaron el RNA mensajero de la citocina fue igual en los niveles mínimo, moderado y alto, cuadro 14.

Cuadro 14. Nivel de expresión del RNAm de TNF- α en CN, lesiones premalignas y CaCU.

Diagnóstico	n	Nivel de expresión del RNAm de TNF- α *			
		Nula (0)*	Mínima ⁺ (0.486-0.755)*	Moderada ⁺ (0.757-0.921)*	Alta ⁺ (0.930-1.379)*
CN	100	56 (56%)	18 (40.9%)	14 (31.8%)	12 (27.3%)
LEIGB	47	39 (83%)	1 (12.5%)	4 (50%)	3 (37.5%)
LEIGA	38	26 (68.4%)	2 (16.7%)	3 (25%)	7 (58.3%)
CaCU	33	21 (63.64%)	4 (33.3%)	4 (33.3%)	4 (33.3%)
Total	218	142	25/76 (32.9)	25/76 (32.9)	26/76 (34.2)

*Unidades de TNF- α /unidades de β -actina. *Los porcentajes de los niveles de expresión mínima, moderada y alta se calcularon de acuerdo a las mujeres positivas al RNAm de TNF- α .

De 218 mujeres incluidas en el estudio, 18 fueron portadoras del genotipo AA. La mayor proporción de mujeres que presentaron el genotipo AA (11/18) no expresaron el RNAm de TNF- α , figura 5.

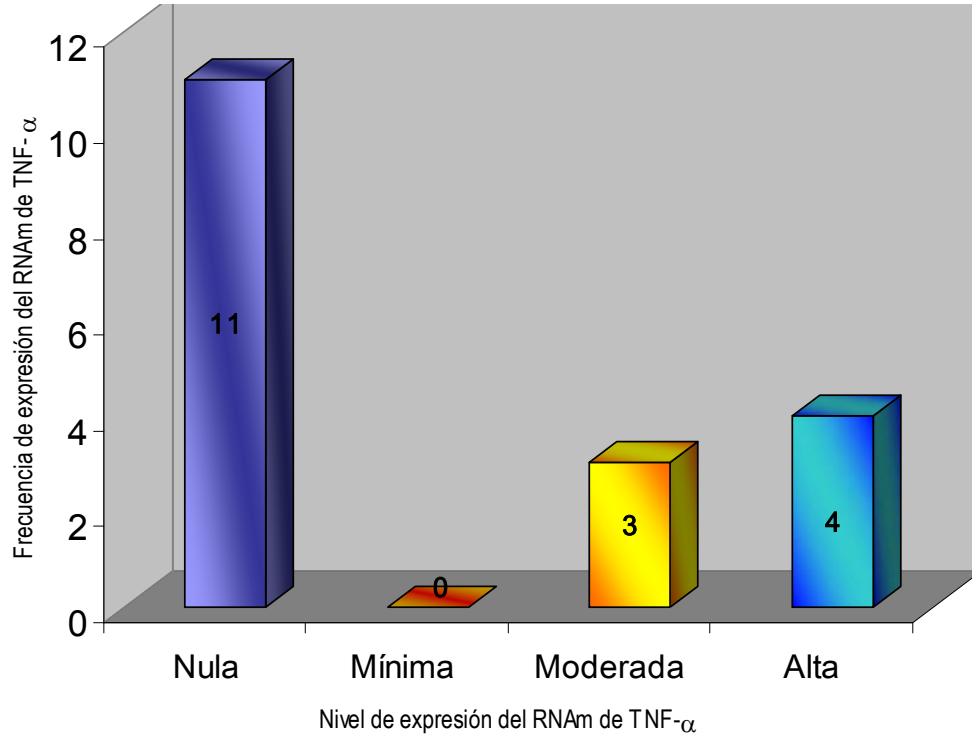


Figura 5. Distribución de mujeres por nivel de expresión el RNAm de TNF- α en pacientes portadoras del genotipo AA.

IV. DISCUSION

En este estudio encontramos que en las pacientes con LEIGA la edad promedio fue de 32.5 años en comparación con el grupo de mujeres con citología normal en donde la media fue de 36.4 años. Estos datos indican que las mujeres guerrerenses están padeciendo lesiones premalignas a temprana edad; en contraste con los hallazgos reportados por Torroella quien reportó que la edad promedio de las mujeres con LEIGA fue de 42.3 años y de mujeres con citología normal de 39.7 años³¹. Del 78.9 al 83% de mujeres con LEI y el 75.7% con CaCU iniciaron su vida sexual entre los 20 y menos años de edad, resultados que son similares a los reportados por Herrero y colaboradores, quienes encontraron que la edad media de la primera relación sexual fue a los 18 años³². Las características de las mujeres que participaron en este estudio están relacionadas con algunos factores de riesgo asociados con la enfermedad como lo es el inicio de vida sexual a temprana edad y multiparidad³³ ya que el 75.8% de las pacientes con CaCU y sólo el 3% de mujeres con citología refirieron tener de 5 a mas hijos.

En este estudio la prevalencia de infección por VPH en pacientes con LEIGA fue de 79% y en CaCU de 100%, los tipos virales de alto riesgo oncogénico fueron los más frecuentes con un 83.1%; datos similares a los reportados por Fernández y col. en el estado de Guerrero, quienes encontraron que en un 77.5% de LEIGA y 100% de CaCU estaba presente el virus del papiloma humano y los VPH mas prevalentes fueron los de alto riesgo oncogénico³⁴. En un estudio realizado en el año 2000 por Herrero y col. en Guanacaste, Costa Rica, reportaron una prevalencia de VPH del 89% en LEIGA y 88% en cáncer cervicouterino³².

La prueba de Papanicolaou arrojó que el 100% de las mujeres con citología normal eran negativas a la infección por VPH, mientras que los métodos moleculares (PCR) detectaron el DNA del virus en el 54% de esas mujeres. Ese hecho puede deberse a que la citología de Papanicolaou detecta los cambios morfológicos de las células ocasionados por una infección viral productiva pero no infección latente; y no es una técnica específica para detectar infección por VPH; la PCR es un método muy

sensible y específico que detecta secuencias de DNA virales en un bajo número de copias³⁵. El Pap no detectó la infección porque aun no había daño celular pero el virus ya estaba presente en las células. La prevalencia de infección por VPH encontrada en este estudio difieren de lo reportado por otros autores; Giuliano y col., demostró que sólo el 10.1% (92/911) de mujeres mexicanas y americanas con citología normal fueron positivas a VPH diagnosticado por métodos moleculares³⁶. Lazcano y col., reportan una prevalencia del 14.5% de VPH en mujeres con citología normal del estado de Morelos³⁷ y Carrillo y col., encontraron un 23.1% de prevalencia del VPH en mujeres mexicanas con citología normal³⁵; las frecuencias de infección por VPH encontradas por estos investigadores son más bajas que las reportadas en este estudio.

El estudio de polimorfismos ha sido objeto de investigación intensa debido a la importancia que pueden tener como factores de susceptibilidad a diversas patologías, incluyendo el cáncer cervicouterino. En México no hay reportes de estudios sobre el polimorfismo -308 GA de *TNF- α* y los efectos que puede tener en el cáncer cervicouterino. En el presente estudio el genotipo GG fue el más frecuente en mujeres con citología normal (84%), LEIGB (70.2%) y en LEIGA (81.6%); sin embargo en CaCU el genotipo GA fue el que predominó, encontrándose en un 51.5%. Los genotipos de CaCU son similares a los encontrados en las líneas celulares de cáncer cervical que se estudiaron, ya que SiHa, HeLa y C33A presentaron el genotipo GA. El alelo G predominó en toda la población, en CN se encontró en un 90%, en LEIGB en 75%, LEIGA en 88% y en CaCU en un 65%. Las frecuencias genotípicas y alélicas de mujeres con CN, LEIGB y LEIGA reportadas en este estudio, son congruentes a lo reportado por Parra y col., quienes realizaron un estudio en población mexicana del estado de Jalisco en el 2006 y encontraron que el genotipo más frecuente fue el GG (87%) y el alelo G estuvo presente en el 93.5% de la población³⁸. Oh y col., realizaron un estudio en el estado de California en el año 2000 en pacientes con cáncer de próstata y reportan altas frecuencias del genotipo GA (72.6%) de TNF- α ³⁹, estas frecuencias son más bajas que las reportadas en este estudio en pacientes con CaCU. Otros autores como Stanczuk y col. en un estudio

realizado en Zimbabwe en el 2003 encontraron que el genotipo GG estaba presente en el 72% de las mujeres con cáncer cervical invasivo y en el 80% de las mujeres sanas; Jang HW y col. en el 2001 en población Koreana, reportan que el genotipo GG se encuentra en el 90.2% de las mujeres con CaCU; Govan y col. en un estudio realizado en 2006 en pacientes con cáncer cervical del Sur de África encontraron al genotipo GG en el 71% de la población^{12, 27, 40}. Los resultados de estos tres autores quienes incluyeron mujeres sanas y sólo pacientes con CaCU, difieren de los encontrados en este estudio, ya que las frecuencias del genotipo GG son más bajas para este genotipo en mujeres con CaCU con una frecuencia de 39.4%.

No encontramos asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo G-308A de TNF- α y el riesgo de padecer una LEIGB y/o una LEIGA, sin embargo en CaCU el genotipo GA confiere 9 veces el riesgo de padecer cáncer cervicouterino en comparación con las portadoras del genotipo GG, siendo esta una asociación estadísticamente significativa (OR 9, IC_{95%} de 1.6 a 48.9), asumiendo que dicho polimorfismo puede influir en el desarrollo del cáncer cervicouterino. Estos resultados concuerdan con los reportados por Oh y col., quienes encuentran que es el genotipo GA el que confiere el riesgo para desarrollar cáncer de próstata (OR= 17) en pacientes, en comparación con los controles sanos³⁹.

Una alta proporción de mujeres con citología normal (44/100) expresaron el mensajero de TNF- α . La presencia del RNAm de TNF- α en ese grupo de mujeres puede deberse a que presentaban procesos inflamatorios agudos específicos o inespecíficos, a que cursaban con infecciones causadas por bacterias, hongos, VPH y/o a traumatismos causados por coito. El RNAm de la citocina puede producirse en respuesta a procesos inflamatorios ocasionados por estímulos traumáticos, químicos, físicos e infecciosos, que son capaces de inducir la síntesis de TNF- α , con la finalidad de modular la respuesta inmune en el sitio de la infección. Romero y col., encontraron niveles incrementados del RNAm de TNF- α en células positivas a VPH comparadas con células control⁴¹.

La proporción de pacientes que expresó el RNAm de TNF- α , aumentó gradualmente conforme el grado de lesión, expresándose en el 17.1% de las paciente con LEIGB, en el 31.6% de LEIGA y en el 36.4% de CaCU y de acuerdo con esos resultados podemos sugerir que la presencia de la TNF- α en lesiones premalignas y en etapas avanzadas (CaCU) de la enfermedad puede jugar un papel importante en la carcinogénesis cérvical, actuando como un promotor del tumor. En ninguna de las líneas celulares de cáncer cervical se expresó el RNAm de TNF- α . Estos resultados sugieren que el TNF- α se puede estar produciendo en CaCU en respuesta a un proceso inflamatorio presente en el epitelio cervical y/o a la activación de vías de señalización inducida por otras citocinas que influyen la producción de TNF- α en el sitio de la lesión. Azmy y colaboradores sugieren que niveles incrementados de la proteína de TNF- α pueden predisponer a una enfermedad más agresiva (metástasis) en pacientes con cáncer de mama⁴². En un estudio realizado por Naylor y col., en 63 biopsias de pacientes con cáncer de ovario, el RNAm de TNF- α se expresó en 45 biopsias, además se encontró RNAm de la citocina en células tumorales y en macrófagos infiltrados, mientras que la proteína se localizó en una subpoblación de macrófagos dentro del área del tumor⁴³. Lo reportado por Azmy y Naylor concuerdan con los hallazgos de este estudio debido a que el TNF- α se expresó en etapas avanzadas de la enfermedad (CaCU).

Con respecto a los niveles de expresión de la citocina se encontró que en LEIGB el mayor porcentaje de mujeres que expresaron el RNA mensajero de TNF- α están en nivel moderado (50%) y alto (37.5%); mientras que en LEIGA el 58.3% de las pacientes está en el nivel de expresión alto y en CaCU los porcentajes son iguales en los 3 niveles de expresión de la citocina (33.3%); estos resultados no se pueden comparar con los de otros autores ya que no hay datos publicados, con respecto al nivel de expresión de TNF- α . Los hallazgos encontrados en este estudio puede deberse a que las células transformadas o tumorales tienen la capacidad de producir e inducir la expresión de TNF- α en el sitio de la lesión, y de esa manera modular la respuesta inmunológica, debido a que TNF- α puede actuar como un promotor

endógeno del tumor⁴³. TNF- α es una citocina pro-inflamatoria que se une a receptores tipo I (TNFRI) desencadenando vías de señalización que activan a factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 los cuales inducen la expresión de genes involucrados en el bloqueo de apoptosis y en la promoción de la tumorigénesis, tales como la transformación celular, supervivencia, proliferación, invasión, angiogenesis y metástasis de células malignas^{44, 45, 46}.

Al relacionar el polimorfismo de TNF- α con la expresión del RNA mensajero, encontramos que las pacientes portadoras del genotipo AA tienen 1.2 veces el riesgo de expresar el mensajero de la citocina, en comparación con las que presentan el genotipo GG; en acuerdo a lo reportado por Kroeger y col. quienes encontraron que el alelo -308A incrementa dos veces el nivel de expresión de TNF- α , en comparación con el alelo -308G, lo cual sugiere que el polimorfismo -308GA puede estar favoreciendo el incremento en la expresión del gen de TNF- α en el sitio de la lesión debido a que el alelo A convierte a la secuencia de DNA en una región de alta afinidad de unión a factores de transcripción^{25, 47}.

V. CONCLUSIONES

- Una alta proporción de mujeres guerrerenses con CaCU son portadoras del genotipo GA, el alelo A estuvo presente en el 35% de estas pacientes, por lo que es probable que el polimorfismo G-308A de TNF- α se relacione con el desarrollo de la enfermedad.
- Se encontró una asociación significativa del genotipo GA de TNF- α con el riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino en comparación con mujeres citológicamente normales, por lo que podemos decir que el alelo de riesgo esta presente en mujeres guerrerenses y este hecho aumenta el riesgo de padecer la patología.
- La expresión de TNF- α y los niveles promedios del RNAm de la citocina se relacionan con el grado de lesión por lo que, es probable que la presencia de la citocina esté jugando un papel importante en el cáncer cervicouterino, actuando como un promotor del tumor.
- Los resultados sugieren que el polimorfismo G-308A de TNF- α no se relaciona con la expresión de RNAm en el epitelio cervical por lo que, pueden estar implicados otros factores moleculares en su producción.
- El polimorfismo G-308A del gen de TNF- α no se relaciona con la infección por el virus del papiloma humano, es probable la citocina sea producida por otro tipo de células, como los macrófagos y los keratinocitos.
- Es importante identificar marcadores genéticos del huésped que puedan facilitar el desarrollo del cáncer cervical, estos marcadores pueden ser útiles en la búsqueda de estrategias para la prevenir efectivamente las infecciones inducidas por el VPH.

VI. REFERENCIAS

1. Anderson SM. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Newsletter* 2002;24(15):113-118.
2. Lörincz AT. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. *Salud Publica Mex* 2003;45(3):376-387.
3. Sánchez-Anguiano LF, Alvarado-Esquivel C, Reyes-Romero MA, Carrera-Rodríguez M. Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC Infect Dis* 2006;6:1-6.
4. Boyle P, Leon ME, Maisonneuve P, Autier P. Cancer control in women. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83:179-202.
5. Palacio-Mejía LS, Rangel-Gómez G, Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce E. Cervical cancer, a disease of poverty: mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Publica Mex* 2003;45(3):315-325.
6. Malvezzi M, Bosetti C, Chatenoud L, Rodríguez T, Levi F, Negri E, *et al.* Trends in cancer mortality in Mexico, 1970-1999. *Ann Oncol* 2004;15(11):1712-1718.
7. Sección preparada por la Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud, México. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2003. *Salud Pública Mex* 2005;47(2):171-187.
8. O'Brien PM, Campo MS. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity?. *Trends Microbiol* 2003;11(7):300-305.
9. Guimaraes-Goncalves MA, Donadi EA. Immune cellular response to HVP: current concepts. *J Infect Dis* 2004;8(1):1-9.
10. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 2006;24(1):1-5.
11. Ghaderi M, Zake LN, Tallin KL, *et al.* Tumor Necrosis Factor A and MHC Class I Chain Related Gene A (MIC-A) Polymorphisms in Swedish Patients with Cervical Cancer. *Human Immunol* 2001; 62:1153-1158.
12. Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S. Polymorphism at the -308 the promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13(2):148-153.
13. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000;50(3):216-228.
14. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10(1):45-65.
15. Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):745-750.
16. Benedict CA, Banks TA, Ware CF. Death and survival: viral regulation of TNF signaling pathways. *Curr Opin Immunol* 2003;15(1):59-65.
17. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296(5573):1634-1635.
18. Choia HS, Jua JS, Leea HJ, Junga CY, *et al.* Effects of Tnf-a injected intracisternally on the nociceptive jaw-opening reflex and orofacial formalin test in freely moving rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2003;27:613-618.

19. Szlosarek PW, Balkwill FR. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol* 2003;4(9):565-573.
20. Albuquerque AG, Moraes M, Vanderborght PR, Romero M, Santos AR, Moraes MO, *et al.* Tumor necrosis factor and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Brazilian population and in Terena Indians. *Transplant Proc* 2004;36(4):825-826.
21. Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, *et al.* G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with and increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334(2):588-592.
22. Yang H, Li M, Chai H, Yan S, Zhang R, Yao Q, *et al.* Expression and regulation of neuropilins and VEGF receptors by TNF-alpha in human endothelial cells. *J Surg Res* 2004;122(2):249-255.
23. Maqsood M., Matata BM. Genetic Diversity of Tumour Necrosis Factor: Implications on Cardiovascular Complications of Polymorphisms at Position – 308 In The Promoter Region. *Cardiol* 2005;1(3):179-188.
24. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF α gene polymorphism on TNF α production and disease. *Human Immunol* 2001;62:1191-1199.
25. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34(5):391-399.
26. Udalova IA, Richardson A, Denys A, Smith C, Ackerman H, Foxwell B, *et al.* Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. *Mol Cell Biol* 2000;20(24):9113-9119.
27. 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):1-6.
28. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JR, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts Harvard: Wiley 1997.
29. Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2005;26(3):631-636.
30. Perri F., Piepoli A., Bonvicini C., Gentile A., Quitadamo M., *et al.* Cytokine gene polymorphisms in gastric cancer patients from two Italian areas at high and low cancer prevalence. *Cytokine* 2005;30:293-302.
31. Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, *et al.* HPV Prevalence among Mexican Women with Neoplastic and Normal Cervixes. *Gynecol Oncol* 1998;70:115–120.
32. Herrero, R., A. Hildesheim and C. Bratt. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:464-474.
33. Canavan TP, Doshi NR. Cervical Cancer. *Am Fam Physician* 2000;61(5):1369-1376.
34. Fernández-Tilapa G, Illades-Aguilar B, Martínez-Carrillo DN, Alarcón-Romero LC, Vences-Velázquez A, Terán-Porcayo MA, *et al.* Prevalence of human papillomavirus types among Mexican women with intraepithelial lesions and cervical cancer: detection with MY09/MY011 and GP5+/GP6+ primer systems. *Am J Infect Dis* 2007;3 (4): 247-252.

35. Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías M, Solorza G, Lizano M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Publica Mex* 2004;46(1):7-15.
36. Giuliano AR, Papenfuss M, Schneider A. Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among mexican-american women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1999;8:615-620.
37. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, *et al.* Epidemiology of HPV infection among mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91:412-420.
38. Parra-Rojas I, Ruiz-Madrigal B, Martinez-Lopez E, Panduro A. Influence of the -308 TNF- α and -174 IL-6 polymorphisms on lipid profile in mexican subjects. *Hereditas* 2006;143:167-172.
39. Oh BR, Sasaki M., Perinchery G, Ryu SB, Park YI, P. Carroll, *et al.* Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene in patients with prostate cancer. *J Urol* 2000;163:1584-1587.
40. Jang WH, Yang Y, Yea SS, Lee YJ, Chun JH, Kim HI, *et al.* The -238 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism is associated whit decreased susceptibility to cancers. *Cancer* 2001;166:41-46.
41. Bequet-Romero M, Lopez-Ocejo O. Angiogenesis moduladors expresión in culture cell lies positives for HPV-16 oncoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:55-61.
42. Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson AG, Stephenson TJ, Cox A, Brown NJ, *et al.* Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res* 2004;6(4):395-400.
43. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link?. *Biochem Pharmacol* 2006;72(11):1605-1621.
44. Simões RT, Gonçalves MA, Donadi EA, Simões AL, Bettini JS, Duarte G, *et al.* Association of tumor necrosis factor α -2 and α -8 microsatellite alleles with human papillomavirus and squamous intraepithelial lesions among women in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):3932-3937.
45. Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K. NF- κ B activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* 2007;98(3):268-274.
46. Herbeinn G, Brien WA. Tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF receptors in viral pathogenesis. *P. S. E. B. M* 2000;223:241-257.
47. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94(7):3195-3199.