

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

**Factores Inmunológicos y Genéticos de la
Infección por el Virus del Papiloma Humano
en la Neoplasia Cervical Intraepitelial:
Estudio de Poblaciones Linfocitarias y
Polimorfismos Genéticos Asociados a
Inflamación**

Aida González Paredes

TESIS DOCTORAL

presentada en el
Departamento de Obstetricia y Ginecología
y realizada en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves
para la obtención del grado de
doctor en Medicina y Cirugía

Granada, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Aida González Paredes
D.L.: GR 608-2011
ISBN: 978-84-694-0158-3

DEDICATORIAS

A Jorge:

Gracias por tu paciencia y por entender mi trabajo fuera y dentro del hospital. Has sido siempre un compañero infatigable y si no he abandonado en los momentos difíciles, es en gran parte mérito tuyo.

Ojalá estés a mi lado en cada nuevo proyecto.

A mis padres:

Por vuestro ejemplo en el trabajo y en la vida. Por los valores que me habéis inculcado y por recordarme la importancia de la humildad ante cada logro. Sois el espejo en el que siempre me he mirado.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento:

Al Dr. Luis Manuel Torres por ayudarme en mis primeros pasos en el mundo de la colposcopia, por confiar en mí y por la propuesta de trabajo que un día me hizo y que culmina con esta tesis.

Al Dr. Ruiz-Cabello por su paciencia y por descubrirme y hacerme partícipe de una parte fascinante de la medicina.

Al Dr. Salamanca por su constante disponibilidad y valiosos consejos.

Al Servicio de Análisis Clínicos y sobre todo a Rafa, Pablo y Julia, por tantas horas de trabajo y porque siempre que he necesitado de ellos, han estado ahí.

A Alicia, Martina y Elisa porque animarme en este proyecto y por su disposición al trabajo y buen humor.

Al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves” de Granada, y a todos los que trabajan en él, por la enseñanza recibida en los cuatro años de formación como especialista y por su colaboración en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CARCINOMA DE CÉRVIX. EPIDEMIOLOGÍA.....	3
2 EVOLUCIÓN NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	12
3 PAPEL DE LOS COFACTORES EN LA CARCINOGENÉISIS	18
3.1 Cofactores medioambientales	18
3.2 Cofactores virales	22
3.3 Cofactores del huésped	23
4 DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE LAS LESIONES PRECURSORAS DEL CÁNCER DE CÉRVIX.....	25
4.1 Cribado del cáncer de cuello uterino	25
4.2 Colposcopia	29
4.3 Determinación del virus del papiloma humano	33
4.4 Tratamiento de la neoplasia cervical intraepitelial	35
4.5 Protocolo de seguimiento de lesiones neoplásicas cervicales intraepiteliales.....	39
5 RESPUESTA INMUNITARIA NORMAL EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR	41

5.1	Conceptos básicos de inmunología	41
5.2.	Papel del sistema inmune en la Infección por virus del papiloma humano y en el desarrollo del cáncer de cérvix	58
6	ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	66
	HIPÓTESIS	69
	OBJETIVOS DEL ESTUDIO	73
	MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
1	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	79
2	SELECCIÓN DE PACIENTES	80
2.1	Criterios de inclusión.....	80
2.2	Criterios de exclusión.....	80
3	PROCEDIMIENTO CLÍNICO.....	84
3.1	Descripción del equipo.....	84
3.2	Descripción del procedimiento.....	84
4	RECOGIDA E INTERPRETACIÓN DE DATOS	88
5	MÉTODO ESTADÍSTICO.....	88
6	MÉTODO BIBLIOGRÁFICO.....	89
7	DOCUMENTOS	90
	RESULTADOS.....	91

1	CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	93
1.1	Edad	93
1.2	Grado de lesión cervical	93
1.3	Seguimiento.....	95
1.4	Tasa de recidiva/persistencia de lesiones	95
2	DIFERENCIA DE FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN FUNCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO	99
2.1	Polimorfismos de RANTES-403 G/A (rs 2107538) SNP	99
2.2	Polimorfismos de MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) SNP	100
2.3	Polimorfismos de TNF α -308 A/G (rs 1800629) SNP	101
2.4	Polimorfismos de IL1A-889 C/T (rs 1800587) SNP	102
2.5	Polimorfismos de NF κ β - 94 ins/del ATTG (rs 28362491) SNP	102
2.6	Polimorfismos de MICA	103
2.7	Polimorfismos de IFN γ	103
2.8	Polimorfismos de IL10-1082 A/G (rs 1800896) SNP	105
2.9	Polimorfismos de IL10-819 C/T (rs 1800871) SNP	105
2.10	Polimorfismos de CTLA-4 A/G (rs 3087243) SNP	106
3	RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y GRADO DE LESIÓN CERVICAL	107

3.1	Polimorfismos de RANTES-403 G/A (rs 2107538) SNP y lesión cervical	107
3.2	Polimorfismos de MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) SNP y lesión cervical	108
3.3	Polimorfismos de TNF α -308 A/G (rs 1800629) SNP y lesión cervical	109
3.4	Polimorfismos de IL1A-889 C/T (rs 1800587) SNP y lesión cervical	110
3.5	Polimorfismos de NF κ β -94 ins/del ATTG (rs 28362491) SNP y lesión cervical	110
3.6	Polimorfismos de MICA y lesión cervical	111
3.7	Polimorfismos de IFN γ y lesión cervical.....	111
3.8	Polimorfismos de IL10-1082 A/G (rs 1800896) SNP y lesión cervical	112
3.9	Polimorfismos de de IL10-819 C/T (rs 1800871) SNP y lesión cervical	112
3.10	Polimorfismos de CTLA-4 A/G (rs 3087243) SNP y lesión cervical	113
4	RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y RECIDIVA/PERSISTENCIA DE LESIONES.....	113

4.1	Polimorfismos de RANTES-403 G/A (rs 2107538) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	114
4.2	Polimorfismos de MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	114
4.3	Polimorfismos de TNF-308 A/G (rs 1800629) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	115
4.4	Polimorfismos de IL1A-889 C/T (rs 1800587) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	115
4.5	Polimorfismos de NFκβ-94 ins/del ATTG (rs 28362491) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	116
4.6	Polimorfismos de MICA y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	116
4.7	Polimorfismos de IFNγ y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	117
4.8	Polimorfismos de IL10-1082 A/G (rs 1800896) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	118
4.9	Polimorfismos de de IL10-819 C/T (rs 1800871) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	118
4.10	Polimorfismos de CTLA-4 A/G (rs 3087243) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical.....	119

5	DIFERENCIAS EN SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN FUNCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO	120
6	EVOLUCIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS TRAS TRATAMIENTO DE NEOPLASIA CERVICAL INTRAEPITELIAL	125
7	POBLACIONES LINFOCITARIAS, LESIÓN EN EL MOMENTO DEL LEEP Y RECIDIVA/PERSISTENCIA DE LESIÓN.....	127
7.1	Poblaciones linfocitarias y grado de lesión	127
7.2	Poblaciones linfocitarias en el momento del LEEP y a los seis meses y recidiva/persistencia de lesiones.....	129
	DISCUSIÓN.....	135
1	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	141
2	POLIMORFISMOS GENETICOS ASOCIADOS A DESARROLLO DE RESPUESTAS INFLAMATORIAS.....	143
2.1	Regulación de la migración transendotelial (quimiocinas): RANTES y MCP-1	143
2.2	Polimorfismos que regulan la respuesta inmunológica innata: TNF α , IL1A, NF κ β y MICA.....	145
2.3	Polimorfismos que regulan la respuesta inmunológica adaptativa: IFN γ , IL10, CTLA-4.....	152

3 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS: DISTRIBUCIÓN, EVOLUCIÓN TRAS EL TRATAMIENTO Y RELACIÓN CON RECIDIVA/PERSISTENCIA DE LESIONES.....	159
CONCLUSIONES.....	173
ACTIVIDAD CIENTÍFICA.....	173
ANEXOS	177
BIBLIOGRAFÍA.....	201

INTRODUCCIÓN

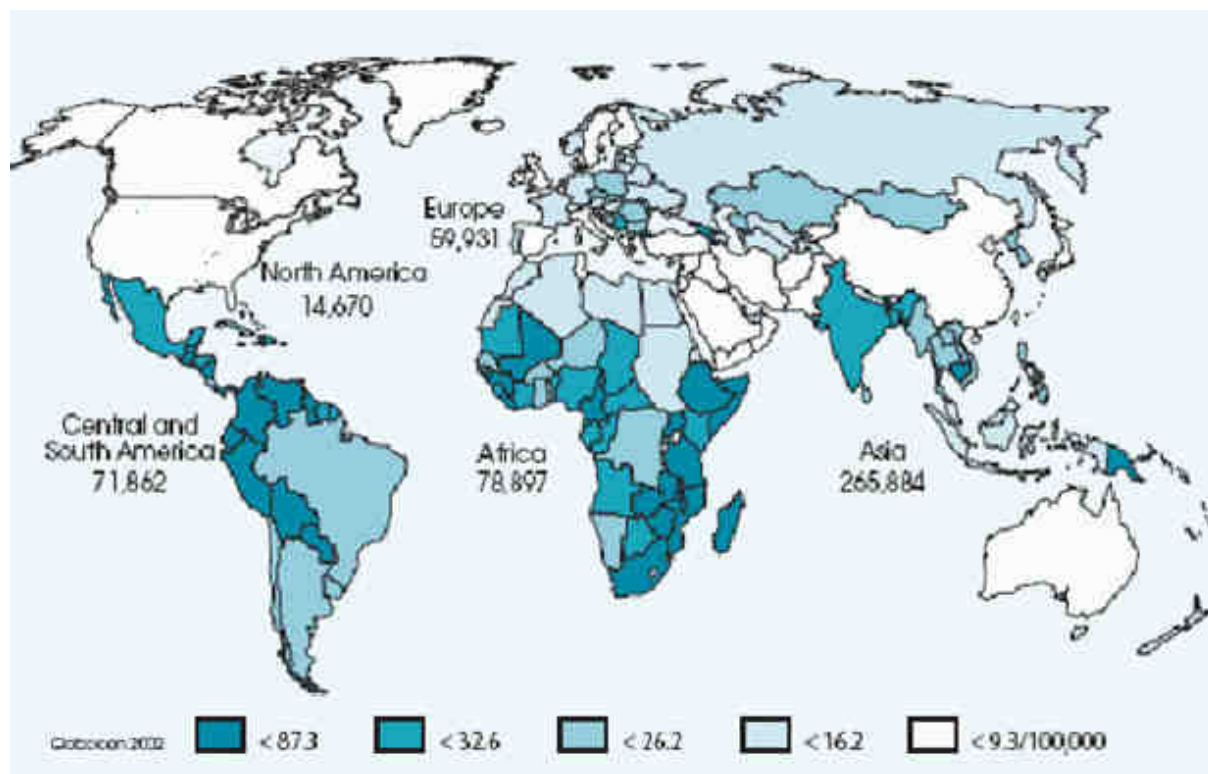
1 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CARCINOMA DE CÉRVIX. EPIDEMIOLOGÍA.

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) constituye una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes. Aunque resulta complicado establecer el volumen de mujeres portadoras de infecciones ocultas por VPH, se estima que la prevalencia de ADN del virus en la población femenina es del 5-10% en países desarrollados y del 10-15% en países en vías de desarrollo. Por otra parte, hasta un 80% de las mujeres habrán padecido en algún momento la infección activa por el virus del papiloma humano a lo largo de su vida^{1,2}.

Las mujeres jóvenes presentan tasas elevadas de adquisición de VPH, así Winer y cols. hallaron una tasa acumulada de infección por VPH de casi el 40% en los primeros 24 meses tras el inicio de las relaciones en 148 mujeres universitarias^{3,4}.

Recientemente, se ha observado un nuevo pico en cuanto a la adquisición de la infección por VPH en torno a los 55 años, que aún es objeto de estudio, aunque probablemente, sea debido al cambio en los hábitos sexuales en estas mujeres (separaciones, nuevos compañeros sexuales, etc.)⁵.

A nivel mundial, el cáncer de cuello uterino es una de las neoplasias más frecuentes y letales en las mujeres. Se estima que cada año se diagnostican aproximadamente 500.000 casos nuevos, de los cuales el 83% se dan en países en vías de desarrollo⁶, mientras que en países desarrollados sólo representa el 3,6% de los casos nuevos de cáncer. La baja incidencia en países desarrollados se debe, al menos en parte, a la efectividad de los programas de cribado poblacional y/o cribado oportunista basados en la citología cervical⁷.

FIGURA 1: Estimación de número de casos e incidencia de cáncer de cérvix⁸

Por otra parte existen evidencias de que, en ausencia de intervenciones exitosas, se experimentará una tendencia al incremento de cáncer de cuello uterino, sobre todo, a nivel de países en vías de desarrollo. Investigaciones llevadas a cabo consideran que si nada cambia para interrumpir la propagación del VPH, como la introducción generalizada de vacunas contra este virus, y los programas para la prevención del cáncer siguen en la misma situación actual, para el año 2020 se prevé un aumento del 42% en el cáncer de cuello uterino en el Mundo, siendo de un 56% en regiones menos desarrolladas y del 11% en países desarrollados⁹.

En España, el carcinoma invasor de cuello uterino tiene una incidencia relativamente baja, con unas tasas ajustadas por edad a la población estándar mundial de entre 3,4 y 12,2 casos por 100.000 mujeres-año según los datos de los diferentes registros

de cáncer de base poblacional. Este tipo de neoplasia se sitúa en el sexto lugar en frecuencia y supone el 4,8% de todos los cánceres en la mujer. Su incidencia varía además en las diferentes regiones españolas.

La mayoría de los cánceres de cérvix son carcinomas escamosos celulares, siendo el adenocarcinoma menos común. En general, la proporción de casos de adenocarcinoma es mayor en las zonas de baja incidencia, pudiendo representar hasta el 25% de los cánceres de cérvix diagnosticados. Esto, probablemente es secundario al cribado citológico, ya que es menos eficaz a la hora de detectar de forma precoz el adenocarcinoma por desarrollarse normalmente en el canal endocervical⁹.

TABLA 1: Incidencia estandarizada por edad/100.000 habitantes referida por los registros de tumores de España

Registro de Tumores	Incidencia estandarizada por edad/100.000
Cuenca	3,4
Navarra	3,7
Albacete	5,4
Zaragoza	5,6
Granada	6,1
Gerona	7,4
Murcia	7,4
Canarias	7,9
Asturias	8,1
Tarragona	9
Mallorca	12

La supervivencia global a los cinco años para todos los estadios, se ha estimado en un 69% de las pacientes (IC 66%-72%), siendo una cifra intermedia entre las más bajas de Inglaterra y Austria (64%) y las más altas de Europa que se dan en Suecia (70%)¹⁰. En los países en vías de desarrollo el diagnóstico suele ser en estadios avanzados, reduciéndose la supervivencia global hasta el 30%¹¹.

Los estudios epidemiológicos y clínicos, apoyados por la biología molecular ponen de manifiesto la relación causal entre el VPH y el cáncer de cuello de útero,

detectándose ADN del virus en el 99,7% de dichos tumores, por lo que se cuestiona su existencia en ausencia de infección viral, considerándose a este agente como causa necesaria para la aparición del cáncer de cérvix¹². El riesgo relativo de la asociación entre infección por VPH y neoplasia cervicouterina es de alta magnitud, en un rango de 20 a 70. Este rango es mayor que para la asociación entre tabaquismo y cáncer pulmonar y es comparable solamente al de la asociación entre hepatitis B crónica y cáncer hepático, relaciones causales que son indiscutibles¹³. Además ciertos genotipos de VPH han demostrado la capacidad de transformar líneas celulares humanas en cultivo y causar anomalías en las mismas similares a las detectadas en las lesiones intraepiteliales de bajo grado¹⁴.

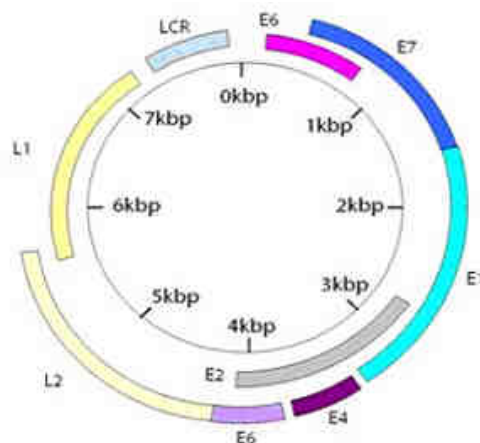
Los papilomavirus forman un género dentro de la familia Papovaviridae. Son virus pequeños (55 nm de diámetro) de estructura icosaédrica con una cápside compuesta por 72 capsómeros que encierran un genoma de ADN circular de doble banda que contiene alrededor de 8000 pares de bases¹⁵.

Los genes que codifican las proteínas residen exclusivamente en una de las dos cadenas de ADN y se constituyen en secuencias de lectura abierta (Open Reading Frames -ORF-). A efectos funcionales puede dividirse el genoma en tres regiones:

- Genes tempranos (early): Son genes (E) que codifican proteínas involucradas en la replicación de ADN viral, regulación transcripcional y transformación celular. Hay ocho tipos diferentes (E1-E8) y representan el 45% del genoma.
- Genes tardíos (late): Son genes (L) que codifican las proteínas de la cápside viral (L1-L2).

- Región de genes reguladores (LCR) no codificadora donde se localizan los promotores que inician la replicación y muchos de los elementos de control de la transcripción y regulación.

FIGURA 2: Mapa del genoma de VPH



E1 y E2 tienen acciones moduladoras muy importantes sobre la replicación del ADN viral ya que codifican proteínas que actúan sobre los promotores de la zona LCR. Las funciones principales de E2 incluyen la regulación de la replicación de ADN viral y la expresión de genes virales. E2 suprime la expresión de E6 y E7 en líneas celulares transformadas por VPH con la consiguiente detención del ciclo celular. Sin embargo, esta actividad de E2 depende de la estructura de la cromatina y el ADN. Así, E2 sólo es efectivo en el control de E6 y E7 cuando se encuentra integrado en el ADN celular y no en forma episomal¹⁶.

E4 se expresa en gran cantidad en lesiones condilomatosas vulvares, codificando proteínas asociadas con el efecto citopático viral; las proteínas que codifican interactúan con proteínas (citoqueratinas) del citoesqueleto celular.

La L1 codifica la proteína mayor de la cápside viral, que es muy parecida en las diferentes especies. El marco de lectura abierto L2, codifica la proteína menor de la cápside, y su secuencia presenta una mayor variabilidad entre los diferentes tipos. L1 y L2 se transcriben cuando los viriones completos se están ensamblando. Este proceso es regulado por factores de transcripción que únicamente se producen en las células epiteliales más diferenciadas de la capa más superficial del epitelio infectado¹⁷.

E5, E6 y E7 están relacionadas con la capacidad transformante y se consideran verdaderos oncogenes virales, capaces de causar por separado transformación in vitro^{1,15,18,19}. E6 codifica una proteína de 150 aminoácidos, cuya importancia en el cáncer parece residir en su efecto sobre el gen supresor tumoral celular p53. Las alteraciones en dicho gen, incluyendo las deleciones, inserciones y mutaciones puntuales, son los acontecimientos genéticos más frecuentes en numerosos tipos de carcinomas. La función normal del p53 incluye un incremento transitorio de su expresión cuando se produce una lesión del ADN, que lleva a detener el ciclo celular en la fase G1. Este paro permite la reparación del ADN; si ésta no es posible, la célula sufrirá apoptosis.

La proteína E6 estimula también la degradación de p53 a través de una vía proteolítica selectiva dependiente de ubiquitina. Las proteínas E6 de los tipos de VPH de alto riesgo oncogénico, tienen una mayor afinidad por la p53, si se comparan con los tipos de bajo riesgo oncogénico.

La importancia de E7 respecto al cáncer reside en su efecto sobre el producto del gen del Rb. E7 se une a la proteína Rb y disocia el complejo E2F-Rb, estimulando la transcripción de los genes celulares¹⁷.

Sin embargo, ciertos experimentos han demostrado que la expresión basal de E6 y E7 en los VPH es muy baja, ya que la proteína E2, por medio de la región reguladora URR, mantiene prácticamente silenciada la expresión de las mismas. Ante esto parece claro que únicamente una infección con gran cantidad de virus sería capaz de producir las suficientes unidades de E6 y E7 como para iniciar este proceso. Sin embargo, se ha demostrado que ciertas infecciones persistentes con baja carga viral generan un fenotipo tumoral efectivo. En la mayoría de los casos, esto se debe a que una porción de los virus se fragmenta por E2, por lo que ésta pierde su capacidad de reprimir la expresión de E6 y E7.

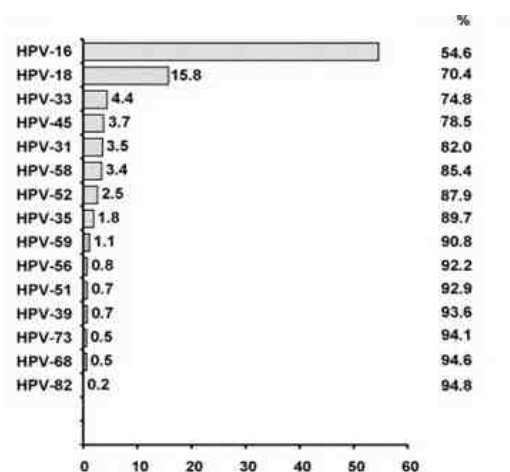
Existen más de 150 genotipos de VPH, que se clasifican en cutáneos o mucosos en función de su tropismo. Los primeros pueden producir verrugas cutáneas, epidermodisplasia verruciforme y, probablemente se asocian también a cáncer de piel no melanocítico. Los VPH mucosos, se dividen en función de su potencial oncogénico, en VPH de bajo riesgo oncogénico, que pueden generar fundamentalmente verrugas genitales y, con menor frecuencia, neoplasias cervicales y papilomatosis respiratoria recurrente, y VPH de alto riesgo oncogénico, asociados a cáncer de cérvix, lesiones anogenitales cancerosas y precancerosas y a cánceres orofaríngeos²⁰.

TABLA 2: Principales VPH y riesgo oncológico

VPH	Serotipo
Alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82
Bajo Riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
Alto riesgo potencial	26, 53 y 66

En un meta-análisis de 85 estudios publicados hasta febrero de 2002, que ha sido recientemente actualizado incluyendo estudios realizados hasta 2006 y que comprendía a 14500 pacientes con carcinoma de cérvix, los VPH de alto riesgo identificados con más frecuencia han sido, en orden decreciente, los VPH 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52, 35, 59, 56, 51, 39, 6, 73, 68 y 82^{21,22}.

FIGURA 3: Porcentaje de casos de cáncer de cuello uterino atribuibles a los diferentes tipos de VPH



2 EVOLUCIÓN NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

La evolución natural de una enfermedad puede definirse como el curso clínico de la misma, cuando no sufre alteraciones por intervenciones terapéuticas.

La infección por VPH se transmite fundamentalmente de persona a persona a través de las relaciones sexuales, aumentando conforme lo hacen el número de parejas sexuales, sobre todo parejas recientes, ya que, en general, se trata de una infección transitoria. Aunque son posibles, las vías de transmisión genital del VPH distintas al coito, son menos comunes. A pesar de que la infección oral y digital de tipos del VPH genitales es un hecho establecido, el riesgo de transmisión por contacto digital-genital u oral-genital parece ser mínimo. De modo similar la infección por el VPH mediante transmisión perinatal o en niños también ocurre, ya que se ha detectado

ADN del VPH y anticuerpos séricos en bebés y niños. Los datos disponibles sugieren que se trata de casos poco frecuentes y con pocas probabilidades de desencadenar una infección persistente²³.

Por otra parte, la transmisión por fómites es en teoría posible basándonos en los hallazgos de ADN de VPH en instrumental ginecológico y en prendas íntimas.

Al igual que la mayor parte de los virus, las infecciones por VPH pueden manifestarse de tres maneras: clínica, subclínica y latente. La manifestación clínica habitual de la infección son los condilomas acuminados. El estudio histológico muestra acantosis, elongación de las papilas dérmicas, presencia de células vacuoladas con núcleos densos y arrugados y con cuerpos de inclusión basófilos compuestos por partículas virales e inclusiones eosinofílicas de queratina anormal en las capas superficiales de la epidermis (coilocitos).

La infección subclínica por VPH es de gran importancia, ya que al no ser aparentes las lesiones, se facilita el contagio. Las lesiones pueden objetivarse mediante visión colposcópica tras aplicación de ácido acético.

La infección latente, sin evidencia clínica ni histológica, sólo es posible detectarla con métodos de determinación de ADN viral. Se desconoce el tiempo y las condiciones para que una infección latente evolucione a clínica o subclínica²⁴.

El periodo de incubación de la infección por VPH se ha determinado experimentalmente en humanos, siendo de 3 a 4 meses, aunque algunas lesiones aparecen hasta dos años después de la inoculación.

La duración típica de la infección es corta, por lo que se estiman una incidencia y prevalencia similares¹⁴. El tiempo medio hasta la regresión de dicha infección oscila

desde 4-6 meses hasta 1-2 años en distintos estudios, dependiendo de las estrategias de seguimiento y de las definiciones empleadas²⁵.

En un estudio realizado en mujeres jóvenes se encontró que la media de duración de la infección fue de 8 meses, encontrando que al año de la infección ésta persistía sólo en el 30% y en un 9% a los dos años²⁶.

Por razones que se desconocen, la infección por el VPH tiende a causar cáncer en áreas denominadas “zonas de transformación”, que son áreas en las que un tipo de epitelio entra en contacto con otro y lo sustituye progresivamente mediante un proceso de transformación llamado metaplasia. En lo referente al cuello uterino, la zona de transformación es aquella en la que el epitelio columnar se transforma en epitelio escamoso.

Los VPH, al ser inoculados, aprovechan las pequeñas efracciones que se producen en el epitelio alcanzando las células basales. Aunque conocemos poco de los primeros estadios de la infección por VPH, se asume que el ciclo de multiplicación viral comienza con su entrada en el estrato germinativo. Dado que estas células basales son las únicas del epitelio escamoso capaces de dividirse, el virus debe infectar estas células para inducir una lesión que pueda persistir. La replicación viral se asocia a una proliferación excesiva de todas las capas epidérmicas excepto las basales. Este proceso produce acantosis, paraqueratosis e hiperqueratosis^{10,27}. La expresión de los genes virales tempranos (E) determina la replicación y el mantenimiento del genoma viral como un plásmido de ADN con alto número de copias, y da lugar a la proliferación concomitante de células para formar la lesión benigna. En la capa exterior del epitelio y con la activación de la expresión de los genes tardíos (L) tiene lugar la síntesis de las proteínas de la cápside y el

ensamblaje de los viriones, ligado al patrón normal de queratinización. En las lesiones benignas del VPH el ADN se encuentra en situación extracromosómica en el núcleo de las células en forma de episoma.

En las neoplasias cervicales intraepiteliales severas y en el cáncer el ADN se encuentra generalmente integrado en el cromosoma celular. Esta integración se produce preferentemente en algunos lugares del cromosoma, así se une rompiendo la ORF E2 que regula a E6 y E7, de manera que estos se expresan de forma incontrolada.

La persistencia se puede definir de modo general, como la detección del mismo tipo del VPH en dos o más ocasiones dándose un intervalo de tiempo determinado entre las exploraciones que oscila entre 1 y 2 años. La persistencia de la infección es mucho menos frecuente que su aclaramiento. Menos de la mitad de las mujeres infectadas por VPH con citología normal, tiene una persistencia de la infección durante más de seis meses y sólo el 7% después de 5 años²⁸.

A juzgar por las observaciones de cohortes existentes, tras la regresión viral no suelen observarse casos de reaparición del mismo genotipo del VPH. Cuando se detecta una reaparición, no está claro si se trata de infecciones nuevas o de una reactivación de un estado latente mal definido.

Richart fue uno de los primeros en afirmar en la década de los sesenta que el cáncer de cérvix era consecuencia de la evolución de lesiones premalignas no invasoras que denominó neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN)²⁹. Éstas se clasificaron en CIN 1, CIN 2 y CIN 3 en función del grado de afectación epitelial:

- CIN 1: La actividad mitótica y las atipias sólo se observan en el tercio inferior del epitelio.
- CIN 2: Las alteraciones afectan a los 2/3 inferiores del epitelio, conservándose la madurez celular en el tercio superior.
- CIN 3: Se afecta todo el epitelio sin invadir el estroma.

Desde entonces se han utilizado múltiples nomenclaturas y clasificaciones para describir las anomalías citológicas e histológicas.

TABLA 3: Clasificación de las alteraciones citológicas e histológicas

Terminología displasia	CIN	Bethesda	Papanic olau
Normal	Normal	Normal	Pap 1
Atipia benigna	Atipia inflamatoria	Cambios celulares benignos	Pap 2
Células atípicas	Atipia escamosa	ASC-US	Pap 2
Displasia leve	CIN 1	L-SIL	Pap 3A1
Displasia moderada	CIN 2	H-SIL	Pap 3A2
Displasia grave	CIN 3	H-SIL	Pap 3B
Carcinoma in situ	CIN 3	H-SIL	Pap 4

El riesgo de desarrollar un cáncer de cérvix invasor se eleva conforme aumenta la severidad de la CIN. A través de múltiples revisiones de la literatura se ha

establecido que el riesgo de desarrollar un cáncer invasor es del 1% en pacientes con CIN 1, del 5% en pacientes con CIN 2 y del 15% en pacientes con CIN 3^{30,31,32}.

En realidad, la mayoría de las neoplasias cervicales intraepiteliales regresan de forma espontánea y no necesitan tratamiento, especialmente en adolescentes y mujeres jóvenes. Hasta el 62% de las lesiones de bajo grado regresarán de forma espontánea, mientras que lo harán entre el 17 y el 54% de los CIN 2 y hasta el 30% de los CIN 3.

Los análisis virológicos parecen evidenciar que el aclaramiento de la infección por el VPH precede a la remisión de los cambios citológicos. La tasa de aclaramiento disminuye con la mayor gravedad de la lesión intraepitelial³³.

Utilizando datos transversales, se ha calculado el tiempo modal entre la infección por VPH y el desarrollo de CIN 3 en 7-15 años, produciéndose la infección en los últimos años de la adolescencia o primeros años de los 20 y los diagnósticos de CIN 3 alrededor de los 25-30 años de edad. Sin embargo, en cohortes prospectivas con seguimiento minucioso, se están documentando rápidos desarrollos a CIN 2 y 3, a veces transcurridos pocos meses de la infección incidente. Se desconoce el significado biológico de estos diagnósticos de CIN 3 tan tempranos y aunque es posible que muchas de estas lesiones remitiesen con una actitud expectante, sería poco ético someterlas a estudios observacionales²⁵.

El carcinoma invasivo de cuello uterino aparece cuando una lesión intraepitelial o un adenocarcinoma in situ invade la membrana basal del epitelio y las células tumorales colonizan el estroma subyacente. En la clasificación por estadios de la FIGO se incluye el concepto de carcinoma microinvasor (estadio Ia-1, Ia-2) basándose en el hecho de que sería posible un tratamiento individualizado y más conservador del

mismo. Se define como microinvasión la existencia de una infiltración del estroma igual o menor de 5 mm en profundidad e igual o menor de 7 mm en superficie. La infiltración de los espacios vasculares y/o linfáticos no modifica la estadificación, aunque se ha referido que puede empeorar el pronóstico de la enfermedad¹⁰.

3 PAPEL DE LOS COFACTORES EN LA CARCINOGENÉISIS

Distintas evidencias experimentales sugieren que una célula infectada por VPH tiene menos capacidad que una célula normal (no infectada), de controlar el ciclo celular, reparar mutaciones y alteraciones cromosómicas, responder a estímulos de diferenciación celular y a factores reguladores y controladores del crecimiento tisular y vigilancia inmunológica, además de ser más susceptible a la acción de agentes tóxicos. Esto último nos lleva a estudiar el papel de los cofactores¹⁸.

Si contrastamos la alta tasa de exposición a los VPH con la incidencia relativamente baja del cáncer invasor del cuello uterino (<1%), está claro que aunque el VPH sea una causa sin la cual no aparece el cáncer cérvicouterino, no basta por si solo para producirlo³⁴.

Los tres grupos de cofactores potenciales son:

3.1 Cofactores medioambientales

- Anticonceptivos hormonales: el consumo de anticonceptivos hormonales durante cinco o más años actúa como cofactor para padecer cáncer cervical aunque el riesgo tiende a desaparecer en los años subsiguientes a la interrupción del consumo, pero aún así, sigue existiendo una elevación

significativa del riesgo incluso después de 8 años³⁵. En un metaanálisis sobre 10 estudios de casos y controles, en pacientes con cáncer de cérvix, se puso de manifiesto que el riesgo de padecer dicha neoplasia podría aumentar hasta 2 veces en mujeres con infección por VPH y usuarias de anticonceptivos hormonales^{36,37}. La región regulatoria del genoma (LCR) tiene secuencias similares a los que responden a los glucocorticoides, que son de hecho inducidos por hormonas esteroides. Estos mecanismos hormonales influyen en la progresión de las lesiones premalignas favoreciendo la integración del ADN del VPH en el genoma de la célula huésped. En estudios in vitro se ha observado que en las células tratadas con dexametasona aumenta la transcripción de VPH 16 en aquellas líneas celulares que tienen el genoma del virus integrado. Este mismo efecto se pudo reproducir utilizando progesterona y progestinas, componentes activos de los contraceptivos orales³⁸.

- Hábito tabáquico: la dinámica de la interacción entre el consumo de tabaco con el ciclo vital del VPH es poco conocida aunque se han podido detectar nitrosaminas y alquitrán, carcinógenos del tabaco, en la secreción del moco cervical de las mujeres fumadoras. El tabaco tiene efecto carcinogénico directo y además produce alteración de la inmunidad local en el cuello uterino, contribuyendo a cronificar la infección por el VPH^{10,37,39,40,41}. En mujeres infectadas por el VPH, el tabaco es el cofactor más importante de progresión, con un aumento del riesgo de 2 a 4 veces frente a las no fumadoras. Este aumento del riesgo se ha identificado también en las fumadoras pasivas y hay que especificar que influye sobre el riesgo de carcinoma epidermoide pero no de adenocarcinoma de cérvix³⁹.

- Paridad: el número de embarazos a término se asocia con un riesgo aumentado de carcinoma cervical invasivo después de ajustar por el número de parejas sexuales y la edad en el primer coito⁴². Se ha postulado que el mecanismo a través del cual una alta paridad aumenta el riesgo de carcinoma es mediante el mantenimiento durante muchos años de la zona de transformación en el exocérnix, lo cual puede facilitar la exposición al VPH, aunque podrían estar implicados factores hormonales del embarazo que modularían localmente la respuesta inmune⁴³. Además se ha sugerido que los traumas que soporta el cérvix durante el parto podría favorecer la progresión de las lesiones⁴⁴. El riesgo relativo (RR) de cáncer de cuello de útero invasivo aumenta con el mayor número de embarazos a término (RR=1,10) y con la menor edad del primer embarazo a término (RR=1,07).
- Coinfección con otros agentes de transmisión sexual: aunque hemos de considerar que la infección por agentes de transmisión sexual son indicativos de conductas de alto riesgo para la adquisición de VPH, las mujeres con infecciones por el virus del herpes simple tipo 2 y con *Chlamydia trachomatis* parecen estar más predispuestas a desarrollar cáncer cervical⁴⁵. Se desconoce el mecanismo por el cual favorece las lesiones producidas por VPH aunque probablemente tenga un papel importante la inflamación crónica secundaria. Respecto al virus del herpes un metaanálisis encuentra un riesgo 3 veces superior de padecer cáncer en mujeres coinfectadas por dicho agente y VPH^{37,46}. La infección por este virus podría favorecer la entrada de VPH a través de los epitelios previamente lesionados y actuar en forma sinérgica como mutágeno celular, alterando el control intracelular de la transcripción del VPH⁴⁷. Especial mención se merece el VIH, ya que al ser un agente que

ocasiona inmunodepresión favorece la infección latente y la aparición de neoplasias en pacientes portadoras de VPH. El VIH altera la evolución natural de la infección por el VPH, dando lugar a un comportamiento más agresivo y con más recidivas que en las mujeres negativas para VIH. Esta asociación parece ser más fuertes en las mujeres con un recuento bajo de linfocitos T CD4.

- Inmunodepresión: las mujeres inmunodeprimidas secundarias a patología o tratamiento inmunosupresor, como en pacientes transplantadas, tienen un riesgo relativo 17 veces mayor de infección por VPH y 9 veces superior para la aparición de cáncer. En ellas se ha comprobado a nivel cervical la disminución de linfocitos CD4 e inversión del cociente CD4/CD8 y también disminución de la actividad de los linfocitos Natural Killer (NK)¹⁰.
- Nutrición y dieta: la evidencia disponible hasta la fecha a favor de una asociación entre dieta, estado nutricional y carcinogénesis cervical por el VPH todavía no es convincente, aunque parece ser que los nutrientes antioxidantes, carotenoides, tocoferoles y ácido ascórbico, podrían desempeñar una función protectora, debido a su papel protector frente a los daños del ADN^{39,48}.

TABLA 4: Cofactores establecidos y probables en la carcinogénesis cervical

Cofactores establecidos	Cofactores probables
Tabaquismo	Co-infección por VHS-2
Uso a largo plazo de ACH	Co-infección Chlamydia. trachomatis
Co-infección por VIH	Inmunosupresión
Alta paridad	Dieta y alimentación

3.2 Cofactores virales

- **Persistencia viral:** la persistencia es más frecuente en VPH de alto riesgo, lo que sugiere que las infecciones persistentes contribuyen a la transformación maligna de las lesiones. Estudios epidemiológicos indican que mujeres persistentemente infectadas con VPH de alto riesgo tienen mayor probabilidad de desarrollar cáncer que las que tienen infecciones transitorias^{49,50}.
- **Tipo de virus:** los responsables de los cambios neoplásicos son los tipos de alto riesgo oncogénico, siendo el 16 y 18 los más prevalentes tanto en carcinomas epidermoides como en adenocarcinomas. El ADN genómico de estos virus se encuentra en los cánceres invasivos, siendo estos capaces de inmortalizar los queratinocitos humanos en cultivos celulares, mientras que los de bajo riesgo no. Este material genético se encuentra tanto en tumores primarios como en metástasis.

- **Carga viral:** se cuestiona la utilidad de la determinación de la carga viral como un factor etiológico de riesgo así como su papel diagnóstico. Algunos estudios epidemiológicos transversales han demostrado una asociación entre un aumento de la carga viral y el riesgo de cáncer cervical, pero los estudios verticales son aún insuficientes. Además aunque se ha asociado una carga viral baja con normalidad microscópica y un riesgo bajo de cáncer posterior, en la práctica clínica la importancia pronóstica de cargas virales crecientes no está establecida en absoluto²⁵. Habrá que diferenciar también si el valor de la carga viral en un determinado momento representa una reactivación de una infección antigua o la adquisición reciente de la misma.
- **Integración:** aunque típicamente el ADN del VPH se ha encontrado en forma de episoma en el citoplasma de las células, la integración del virus se relaciona con la capacidad oncogénica. Aunque este fenómeno de integración del VPH en el genoma celular es raro en las células infectadas, parece representar un evento irreversible que inicia una cadena de hechos que condiciona el daño en los genes supresores tumorales (p53 y RB) con la consiguiente inestabilidad del genoma y la inmortalidad celular.

3.3 Cofactores del huésped

- **Hormonas endógenas:** los glucocorticoides y la progesterona disminuyen la expresión de los HLA de clase I en la superficie celular de los tumores cervicales VPH positivos y contribuyen a que los linfocitos T citotóxicos no reconozcan la célula infectada.

- Factores genéticos: se postula que determinados patrones genéticos entre los que se incluyen, polimorfismos, mutaciones, mecanismos de inactivación por metilación, etc, jueguen un papel importante en la susceptibilidad y evolución diferente de la infección por VPH¹⁰.
- Respuesta inmunitaria: la persistencia de la infección viral requiere la evasión de la detección y eliminación de las células virales por parte del sistema inmune. Estos procesos de evasión pueden ocurrir por diferentes vías; en ciertos casos, los virus presentan antígenos de superficie muy variables que conducen a la síntesis de un exceso de anticuerpos, no neutralizantes, que pueden llegar a interferir con los que sí tienen esa capacidad de neutralización. Otro mecanismo de evasión se ha observado en ciertos tumores en los que la respuesta inmunitaria se evita mediante la depleción de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Muchas infecciones víricas toman como diana a células de Langerhans, comprometiendo así la eliminación de la infección por alteración de los mediadores en el montaje de la respuesta inmune. En verrugas genitales se ha observado una disminución notable del número de células de Langerhans, con la consiguiente disminución de la capacidad de presentación antigénica. También se han constatado importantes disminuciones de la actividad de las células Natural Killer (NK), con funciones de inmunidad inespecífica, en lesiones premalignas y malignas²⁴.

4 DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE LAS LESIONES PRECURSORAS DEL CÁNCER DE CÉRVIX

4.1 *Cribado del cáncer de cuello uterino*

Se define cribado como la identificación de individuos sospechosos entre una población o subgrupo, susceptibles de sufrir una enfermedad aún no manifiesta, mediante una investigación no requerida por el paciente⁵¹.

Existen tres tipos de cribado:

- Cribado poblacional: tiene estructura propia, utiliza una base censal para la captación de las personas del grupo de edad seleccionado como diana, con sistemas de rellamada a las no asistentes, sólo ofrece la técnica de cribado validada y cuenta con circuitos propios de derivación, tratamiento y seguimiento de los casos detectados.
- Cribado oportunista: no tiene estructura propia ya que aprovecha para su captación la consulta realizada por la persona al Sistema Sanitario, con lo que penaliza la equidad (el que no consulta “no es cribado”) crea confusión metodológica cribado / asistencia y es difícilmente eficiente y eficaz: tiende a reiterar innecesariamente la práctica del test de cribado y le resulta muy problemático alcanzar niveles suficientes de cobertura.
- Cribado mixto: Es especialmente necesario cuando la enfermedad presenta una incidencia baja. Consiste en establecer un cribado oportunista pero que

prevea mecanismos de captación para las mujeres que no consulten al Sistema Sanitario.

En España, la estructura del cribado es oportunista. Los resultados del estudio AFRODITA indican que la cobertura del cribado oportunista del cáncer de cérvix en España, practicando una citología cada 3 años, es del 75,6% en mujeres de 18 a 65 años sexualmente activas. Sin embargo, este estudio ha evidenciado que la cobertura es insuficiente en mujeres mayores de 55 años (66%), en las que habitan en áreas rurales (66%) y en las mujeres con un nivel socio-económico bajo (65%) y en ciertas Comunidades Autónomas entre las que se encuentra Andalucía (66%)⁵².

La práctica oportunista ha penalizado los resultados: la tendencia al incremento de la tasa de incidencia del cáncer de cérvix es constante, del orden del 1% anual en su variedad escamosa. La falta de cobertura suficiente, déficit característico de los programas oportunistas, es el principal problema: la inmensa mayoría (80%) de las mujeres que desarrollan cáncer de cérvix no han sido atendidas adecuadamente por los programas preventivos, con una proporción que permanece estable en los últimos diez años¹⁰.

Probablemente este aumento de la incidencia del cáncer de cérvix pueda ser más acusado en los próximos años, como consecuencia de los cambios en la conducta sexual de las generaciones más jóvenes y probablemente por el gran número de población inmigrante en España. En este grupo hay poblaciones procedentes de países con una elevada incidencia de cáncer de cérvix, como Europa del Este, Latinoamérica, el sureste de Asia y África, no cribadas previamente⁵².

La prevención secundaria del cáncer de cérvix mediante detección precoz de lesiones cervicales preinvasoras se considera fundamental para el control de la

enfermedad. La prueba de elección es la citología de Papanicolau, que se basa en el estudio morfológico de las células obtenidas por exfoliación espontánea o inducida del epitelio cervical. Pese a que no hay ningún ensayo clínico aleatorio que demuestre la eficacia de la citología, la evidencia a partir de los estudios observacionales muestra una disminución de la incidencia y mortalidad por cáncer de cuello de útero y hace que este test sea recomendado en el cribado de esta patología⁵³. La citología cervical está considerada como uno de los procedimientos más eficaces en medicina preventiva, y probablemente como el más eficaz en prevención de cáncer, a pesar de que, como ya se ha mencionado, no existen estudios controlados que lo demuestren. Aun así, la citología es un test calificado como de rentabilidad subóptima, puesto que la frecuencia de falsos negativos puede ascender hasta el 50% para las lesiones de bajo grado y entre el 6 y el 45% para las lesiones de alto grado. Esta técnica, por tanto, presenta una relativa baja sensibilidad (75-80% para lesiones de alto grado), pero con una elevada especificidad (95%)^{51,54}.

La Sociedades Españolas de Ginecología y Obstetricia y de Patología Cervical y Colposcopia establecen una serie de recomendaciones para el cribado de cáncer de cérvix:

- Primera citología a los tres años de inicio de las relaciones sexuales.
- Citología anual durante los dos primeros años, si valorables y negativas realizar citología cada tres años.
- Sin existe disponibilidad de test de VPH, a los 35 años realizarlo junto con la citología.

- ✓ Ambos negativos: repetir ambas pruebas cada 5 años.
 - ✓ Citología negativa y test de VPH positivo: repetir ambas al año.
 - ✓ Citología positiva: protocolo de citología anormal
- Si se cumple adecuadamente el cribado finalizarlo a los 65 años.

En los últimos años la citología en medio líquido se ha convertido en una alternativa importante a la citología convencional en portaobjetos. Aunque en la actualidad no se dispone de evidencias suficientes para afirmar una mayor precisión de la citología en medio líquido para predecir lesiones histológicas de CIN 2 o superior, se reconoce que proporciona una mejora en la calidad y velocidad de interpretación, además de ofrecer la posibilidad de determinación de ADN viral en la muestra^{55,56}.

Los resultados de la citología se clasifican según el sistema Bethesda (tabla 3).

La conducta diagnóstica ante una citología anormal sería:

- Atipia de células escamosas, de significado indeterminado (ASC-US). En las mujeres con ASC-US, si no se dispone de colposcopia con facilidad, existen dos opciones para seleccionar las que precisan de todos modos ser enviadas a colposcopia:
 - ✓ Control con 3 citologías repetidas, cada 4-6 meses, hasta obtener dos citologías negativas en cuyo caso se devuelve a la mujer al programa de cribado. En presencia de una nueva citología de ASC-US o SIL se remitirá a colposcopia.

- ✓ Selección mediante determinación de VPH-AR, remitiendo a colposcopia los casos positivos.
- Lesión escamosa de bajo grado (LSIL). En las mujeres con citología de LSIL se prefiere realizar siempre una colposcopia, no sólo para descartar una posible lesión más avanzada, lo que ocurre en un 20-25% de los casos, sino también para orientar acerca de la patología asociada al VPH y eventualmente tratarla.
- Lesión escamosa de alto grado (HSIL) y ASC sin poder descartar HSIL (ASC-H). Las mujeres con citología de HSIL o carcinoma deben ser remitidas sin demora para estudio con colposcopia/biopsia. Se enviarán también a colposcopia las mujeres incluidas dentro de la nueva categoría Bethesda de atipia de células escamosas sin poder excluir una lesión de alto grado (ASC-H).
- Atipia de células glandulares (AGC). Adenocarcinoma in situ (AIS). En las mujeres con atipia de células glandulares (AGC) el riesgo de una lesión escamosa o glandular de alto grado es superior al 30%. Todas ellas, así como las mujeres con citología de adenocarcinoma in situ endocervical (AIS) se deben estudiar.

4.2 Colposcopia

La colposcopia es una técnica complementaria para la exploración del tracto genital inferior. Su objetivo es la localización y descripción topográfica de las lesiones del tracto genital inferior. Mitchell y colaboradores en un meta-análisis establecen una sensibilidad del 95% cuando se diferencia entre colposcopia normal y anormal, con

una especificidad del 45%⁵⁷. La citología y la colposcopia utilizadas conjuntamente ofrecen un valor predictivo negativo para CIN 3 o superior del 100%.

Cuando se indica el estudio colposcópico como consecuencia de alteraciones en la citología cervical, se persiguen una serie de objetivos que serían:

- Confirmar la existencia de lesiones, localizarlas y determinar sus características, permitiendo así la realización de biopsias dirigidas.
- Descartar la presencia de un cáncer invasor.
- Establecer el grado lesional.
- Seleccionar la conducta terapéutica y el tipo de tratamiento, de ser éste necesario.

Técnica de realización de la colposcopia: consta de varios tiempos:

- Ajuste personal del colposcopio.
- Examen directo sin preparación: Se efectuará una primera observación directa con el colposcopio a bajo aumento.
- Examen colposcópico tras preparación: En primer lugar se procede a la aplicación de ácido acético al 3%, lo que producirá la desaparición del moco cervical en 15-20 segundos y revelará las diferentes lesiones acetoblancas. Una vez localizada la imagen colposcópica, ésta se observará con los diferentes aumentos. Posteriormente se procede a la aplicación de lugol, lo que se conoce con el nombre de Test de Schiller.

- Toma de biopsias: Después de la anterior delimitación y localización de las lesiones se procederá a realizar la biopsia dirigida de las mismas.

La terminología colposcópica vigente ratificada por el Comité de Nomenclatura de la Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia en el congreso de Barcelona 2002, se indica en la tabla 5.

TABLA 5: Terminología colposcópica Barcelona 2002

<p>I. Hallazgos colposcópicos normales</p>	<p>A. Epitelio escamoso original B. Epitelio columnar o cilíndrico C. Zona de transformación</p> <p>a. En ectocérvix b. Componente endocervical visible c. Componente endocervical no visible</p>
<p>II. Hallazgos colposcópicos anormales</p> <p>*Cambios mayores</p>	<p>A. Epitelio acetoblanco denso* B. Mosaico fino C. Mosaico irregular* D. Punteado fino E. Punteado grosero* F. Yodo negatividad parcial G. Yodo negatividad*</p>
<p>III. Características colposcópicas sugerentes de cáncer invasor.</p>	<p>A. Superficie irregular, erosiva o ulcerada B. Cambio acetoblanco denso C. Punteado y mosaico extenso e irregular D. Vasos atípicos</p>
<p>IV. Colposcopia insatisfactoria</p>	<p>A. Unión escamocolumnar no visible B. Inflamación o atrofia graves, traumatismo C. Cuello uterino no visible</p>
<p>V. Hallazgos misceláneos</p>	<p>A. Condiloma B. Queratosis C. Erosión D. Inflamación E. Atrofia F. Deciduosis G. Pólipos</p>

4.3 Determinación del virus del papiloma humano

Actualmente se reconoce que prácticamente todos los cánceres cervicales, tanto de tipo escamoso como glandular, están causados por infecciones cervicales persistentes por alguno de los tipos de VPH oncogénicos. Además, el desarrollo de sistemas moleculares de detección del VPH de forma fiable, exacta y reproducible, ha planteado su posible beneficio en la detección de lesiones precursoras de cáncer de cérvix.

Las pruebas para la detección del VPH analizan la presencia de secuencias de ADN viral y se basa en la especificidad complementaria entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. El modo de detección de los híbridos, la composición de las sondas de ADN y la existencia o no de amplificación marcan las diferencias entre las técnicas existentes⁵⁸. Así pues, los dos métodos más utilizados en la práctica clínica son la captura híbrida y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- Captura de híbridos: Es una técnica de amplificación de la señal. La actual captura de híbridos de segunda generación (HC2), es la única técnica molecular aceptada actualmente por la FDA para uso clínico, y tiene una adecuada relación entre sensibilidad y especificidad. Utiliza dos sondas una para VPH de alto riesgo y otra para el grupo de VPH de bajo riesgo. El umbral de corte con significación clínica, se ha establecido en 1 pg/ml de ADN equivalente a unas 100000 copias de virus.
- PCR: Es un método de amplificación molecular que permite identificar muy pequeñas cantidades de ADN, pudiendo detectar hasta 10 copias de ADN del virus entre 1 millón de células. Para realizar este método se deben conocer las

secuencias de los nucleótidos buscados con el fin de producir los 20-35 nucleótidos necesarios para formar los cebadores de consenso o primers. Estos cebadores se emplean para dirigir la síntesis de ADN en direcciones opuestas y superpuestas. El resultado de la PCR es el aumento exponencial del ADN buscado. Los cebadores más utilizados son PGMY09/11, GP5+/GP6+ y SPF10. Su principal ventaja es que permite identificar el tipo específico de VPH.

La exactitud de las técnicas PCR y HC2 para detectar CIN 3 o cáncer es semejante. En el estudio ALTS, la PCR obtuvo una sensibilidad y una especificidad clínica del 87,4 y el 55,6%, mientras que con el HC2 éstas fueron del 92,5 y el 51,1% respectivamente⁵⁹.

La sensibilidad de la prueba de detección de ADN de VPH en relación con la citología es sistemáticamente superior para la detección de lesiones subyacentes de alto grado en todos los estudios (91,1% frente a 61,3% respectivamente). Por otra parte, la especificidad es mayor (93,5% frente al 89,3%) para la citología, aunque tiene una homogeneidad menor ya que sus resultados varían más en función de las condiciones en que se realice⁶⁰.

La prevalencia de la infección por VPH es del 10% en mujeres con citología normal, siendo la infección por múltiples genotipos inferior al 5%. En pacientes con neoplasia cervical intraepitelial la prevalencia de la infección por VPH es superior al 90%. La coinfección por varios genotipos de VPH es más frecuente en lesiones de alto grado y en pacientes jóvenes^{61,62,63}.

En cuanto a la aplicabilidad clínica de la detección de VPH, actualmente se indica en los siguientes casos:

- Selección de mujeres con citología ASC-US para identificar las que precisan estudio colposcópico.
- Seguimiento de pacientes con diagnóstico de CIN 1 confirmado con biopsia, tras realización de colposcopia.
- Control después de tratamiento de neoplasias intraepiteliales, para predecir curación o posible recidiva.
- En el cribado de mujeres de más de 35 años junto con la citología.

4.4 Tratamiento de la neoplasia cervical intraepitelial

Modalidades de tratamiento:

- Tratamientos destructivos locales: no tenemos material para estudio histológico. Los tratamientos destructivos sólo tienen indicación en el condiloma cervical o en la CIN 1-2, siempre que se cumplan las siguientes condiciones: lesión pequeña totalmente visible, confirmada mediante colposcopia satisfactoria, y con ausencia de lesión endocervical verificada mediante legrado o citología con cepillado, y asegurando su seguimiento²⁸. Entre los tratamientos destructivos utilizados en la actualidad encontramos:
 - ✓ Criocoagulación: congelación con nitrógeno líquido en dos fases de tres minutos con 5 minutos entre ambas. Es un procedimiento ambulatorio de fácil aplicación, con una morbilidad baja e indoloro.
 - ✓ Vaporización láser: Es un método útil en lesiones extensas que afectan a vagina y de difícil acceso. El principal inconveniente es su elevado coste.

- Tratamientos escisionales: existen diferentes métodos:
 - ✓ Conización con bisturí frío: cada vez menos usada ya que requiere anestesia y hospitalización. Además tiene una mayor morbilidad, aunque la pieza no tendrá artefacto térmico.
 - ✓ Escisión con asa de diatermia: LEEP o LLETZ (del inglés, loop electrosurgical excision procedure y large loop excision of the transformation zone, respectivamente). La técnica consiste en la exéresis de toda la zona de transformación, incluyendo la totalidad de la lesión, mediante un asa de alambre conectada a un generador de corriente de alta frecuencia. Se trata de un método ambulatorio, rápido, de fácil aprendizaje y económico, con adecuada recuperación anatómica del cuello y alta tasa de curación.
 - ✓ Conización con láser: se realiza de forma ambulatoria con anestesia local. Permite el diseño del tamaño del cono individualizado para cada caso, en función de la morfología del cuello y de la topografía de la lesión, con mínimas complicaciones intraoperatorias y postoperatorias. Como desventaja encontramos su elevado coste y una mayor dificultad de aprendizaje.
 - ✓ Histerectomía: es un procedimiento radical poco usado hoy en día para el tratamiento de lesiones intraepiteliales. Conlleva un mayor riesgo de complicaciones, e incluso mortalidad asociada cuando se compara con los demás métodos.

El tratamiento escisional es de elección en las mujeres con CIN 2-3. Actualmente se realiza con preferencia mediante asa diatérmica con anestesia local y de forma ambulatoria. Las indicaciones para cualquier tipo de conización son las siguientes: CIN 2 y 3, zona de transformación tipo 3, discrepancia entre técnicas diagnósticas, sospecha de microinvasión, adenocarcinoma in situ de endocérnix y recurrencia post-tratamiento destructivo¹⁰.

Según el último consenso de la ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology) de 2006, no se recomienda un proceso escisional o ablativo en ausencia de un diagnóstico histológico de CIN en las pacientes con citología de LSIL, ya que el manejo terapéutico de la patología premaligna cervical se apoya en el diagnóstico histológico. En general, las lesiones intraepiteliales de bajo grado muestran una elevada tasa de regresión espontánea en ausencia de tratamiento.

El manejo de CIN 1 difiere según la citología previa⁶⁴:

- CIN 1 precedida de citología ASC-US, ASC-H o LSIL. Se recomienda seguimiento mediante test VPH-AR cada 12 meses o citología cada 6 meses con colposcopia si cualquier prueba resulta alterada. En el caso de que el test viral sea negativo y se obtengan dos citologías consecutivas negativas la paciente puede volver al cribado poblacional. Si la CIN 1 persiste más de dos años se acepta continuar el seguimiento o tratar a la paciente. Si se opta por tratar la lesión y la colposcopia es satisfactoria, los tratamientos escisionales y los ablativos son igualmente eficaces. Si la colposcopia es insatisfactoria, el estudio endocervical es positivo o la paciente había sido tratada previamente, es recomendable un procedimiento escisional.

- CIN 1 precedida de citología HSIL o AGC-NOS. En este caso es aceptable la práctica de un procedimiento escisional o la observación con citología y colposcopia a los 6 meses, practicando un procedimiento escisional ante un nuevo resultado citológico de HSIL/ACG.

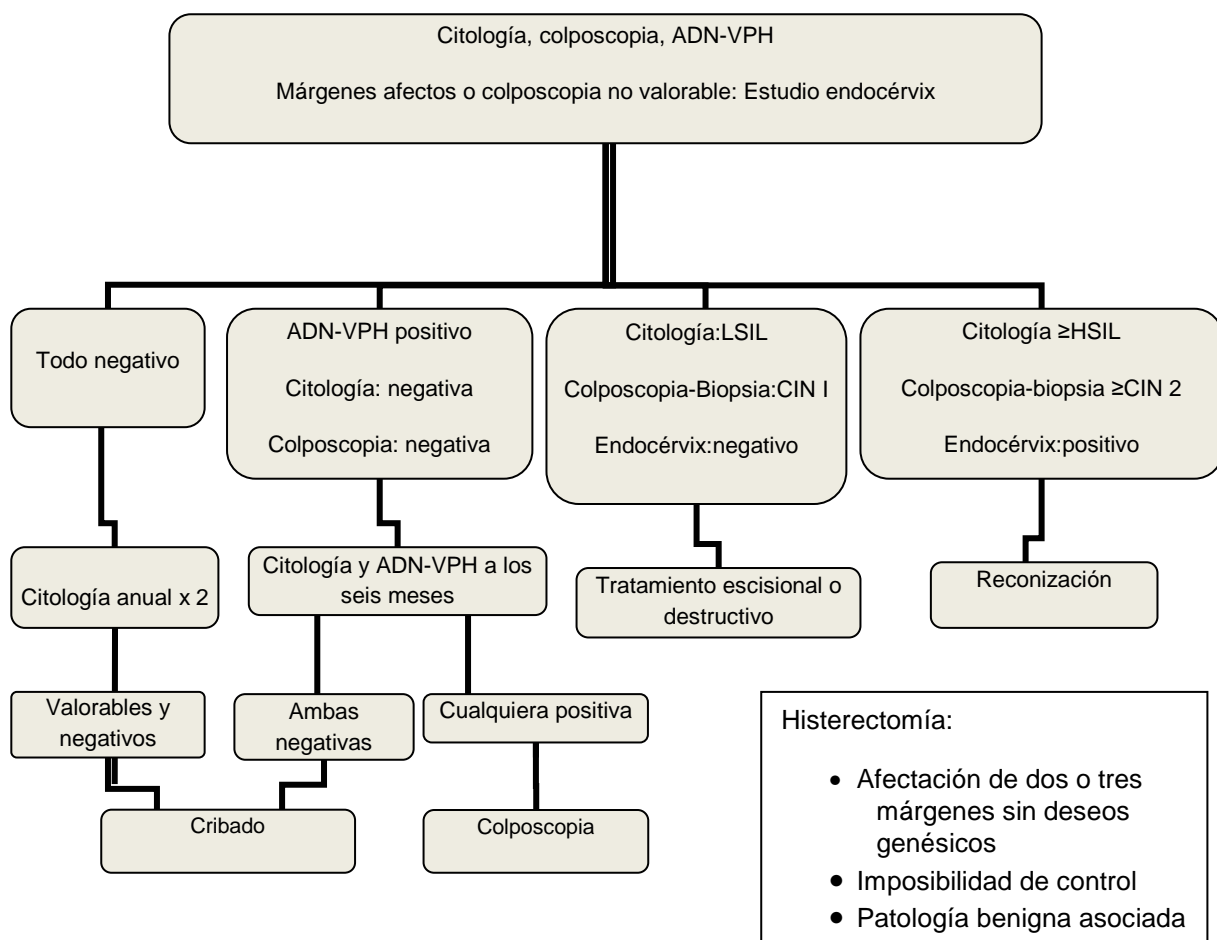
Existe consenso en que el tratamiento de CIN 2-3 reduce la incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix. Los métodos escisionales son los de elección porque permiten obtener tejido para el estudio anatomopatológico y reducir así el riesgo de un cáncer microinvasor o invasor oculto. Esto es especialmente importante en pacientes con lesiones de alto grado extensas o lesiones que se introducen en el canal endocervical y en mujeres tratadas previamente por una CIN.

4.5 Protocolo de seguimiento de lesiones neoplásicas cervicales intraepiteliales

El protocolo de seguimiento que se recomienda en la actualidad se resume en la figura 4.

FIGURA 4: Control post tratamiento de la CIN

Primer control, en la unidad especializada que realizó el tratamiento (a los tres meses con márgenes afectados y a los seis meses con márgenes libres)



A pesar de que los tratamientos anteriormente expuestos presentan una tasa de éxito superior al 95%, es fundamental, y así debe transmitirse a las pacientes

realizar un seguimiento posterior, ya que ninguna terapia puede asegurar la curación definitiva.

Los objetivos del seguimiento son la detección de persistencia (enfermedad residual) y la detección de recurrencias (enfermedad “de novo”). Entenderemos por enfermedad de “novo” cuando habiendo transcurrido un año tras el tratamiento, durante el cual se ha seguido un estricto control sin detectarse enfermedad residual, aparece ésta¹⁰. Sin embargo, esta distinción teórica es poco aceptada en la mayoría de los estudios como factor discriminante de fracaso terapéutico.

El examen colposcópico post tratamiento puede ser difícil debido a que a menudo pueden aparecer imágenes colposcópicas sospechosas y que lo único que traducen es una reparación tisular.

Recientemente, se ha incorporado la detección del ADN-VPH de alto riesgo a los seis meses del tratamiento, ya que se ha demostrado que en pacientes tratadas por HSIL si el ADN del VPH era positivo a los seis meses, la cifra de recurrencia era del 52%. La sensibilidad del test viral para detectar lesión persistente o residual alcanza el 90% a los seis meses de tratamiento y se mantienen así hasta los 24 meses^{65,66,67}.

El mayor número de fallos de tratamiento se observa en lesiones extensas y cuando los márgenes de resección se encuentran afectados, aunque esto último no siempre implica la presencia de enfermedad residual ya que la destrucción térmica del tejido circundante hace que en general, no se detecten en el seguimiento lesiones persistentes. El riesgo de persistencia o recurrencia tras la conización si los márgenes están afectados es del 10-33% según estudios recientes^{68,69}.

En cualquier caso y cualesquiera que sean los factores pronósticos de la paciente, es fundamental realizar un seguimiento a las pacientes tratadas por CIN puesto que tendrán mayor riesgo de padecer un cáncer cervical invasor.

5 RESPUESTA INMUNITARIA NORMAL EN EL TRACTO GENITAL INFERIOR

5.1 *Conceptos básicos de inmunología*

El sistema inmunitario se encarga de detectar la presencia de agentes extraños, los destruye con el menor daño posible para el huésped, generando una memoria inmune con el fin de defenderse de futuras reinfecciones. De hecho, el sistema inmune ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo.

Para eliminar un patógeno que haya establecido una infección, lo primero que debe hacer el sistema inmune es reconocerlo como tal y a continuación desarrollar una respuesta adecuada para destruirlo. Existen dos tipos de respuesta: la innata y la adquirida.

La inmunidad innata o natural: Está prácticamente desarrollada desde el nacimiento y carece de especificidad; es constante en el tiempo porque no tiene memoria y es la primera línea de defensa. En ella se incluyen todo tipo de barreras frente a la infección: físicas (epitelios, cilios, arrastre de fluidos, flora bacteriana,...), químicas (secreciones mucosas, variaciones de pH, lactoferrina, lisozima...),

celulares (macrófagos, neutrófilos, células NK) y mediadores (sistema del complemento, citoquinas, reactantes de fase aguda). Así pues, se basa en la activación tanto de una serie de moléculas preformadas (proteínas del complemento), como de células (monocitos/macrófagos, neutrofilos y mastocitos), que tienen receptores innatos para múltiples patógenos. Algunos mecanismos innatos no actúan inmediatamente, sino que se inducen en respuesta a la infección, como son las células citolíticas naturales (linfocitos NK), o ciertas moléculas como los interferones (especialistas en defendernos de los virus), las citoquinas y otros mediadores que producen inflamación.

La inmunidad adaptativa o adquirida: Se suma a la innata perfeccionándola, ya que permite reconocer patógenos con los que nunca se ha entrado en contacto. Los responsables principales de la inmunidad adquirida son los linfocitos T y B. Los linfocitos son capaces de reconocer a los patógenos tanto fuera (linfocitos B) como dentro de las células del organismo (linfocitos T). La base del reconocimiento de los diferentes patógenos es la gran variabilidad de linfocitos T y B diferentes, presentes en nuestro organismo, lo cual les permite reconocer prácticamente cualquier estructura molecular de una forma específica. De esta manera por mucho que mute o cambie un microorganismo siempre existirán algunos linfocitos capaces de reconocerlo. Esta respuesta se caracteriza porque se aprende y en caso necesario se reproduce (memoria).

Dentro de la inmunidad adquirida hay dos clases de respuesta según el proceso que la origine:

- La respuesta celular: desencadenada por infección intracelular (ya sean virus, bacterias, hongos y protozoos), células tumorales (productoras de proteínas anómalas), y macrófagos cargados de productos de difícil digestión.
- La respuesta humoral: que se especializa en la eliminación de antígenos presentes en el suero o en los tejidos y fluidos de nuestro organismo, como las bacterias extracelulares clásicas, las toxinas y los helmintos.

Cada respuesta tiene como protagonista a un tipo de células y/o sustancias que analizaremos a continuación:

En la respuesta innata toman parte macrófagos, neutrófilos y células NK.

- Los macrófagos reciben también el nombre de histiocitos (en tejidos) o monocitos (en sangre). Se activan por lipopolisacáridos (LPS), el interferón gamma ($IFN\gamma$) y el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$). Secretan interleucinas (IL) 1 y 6, $TNF\alpha$ y beta ($TNF\beta$). Se encargan de la presentación de antígenos tras procesarlos y de fagocitar y eliminar los residuos tanto celulares como tisulares.
- Los neutrófilos se encargan de fagocitar. A diferencia de los macrófagos, los neutrófilos permanecen en el torrente circulatorio hasta que se produce una respuesta inflamatoria. Sólo en el curso de una inflamación se extravasan al lugar de la infección donde colaboran con los macrófagos en la fagocitosis de los microorganismos.
- Las células NK son linfocitos granulares grandes, no B no T, con receptores para lo propio, para la IL2, IL12 y el $IFN\alpha$ y $TNF\alpha$. Entre sus funciones se encuentra la inmunidad celular en el compartimento vascular, la producción de

TNF α , la citotoxicidad inespecífica mediada por IL12, atacan a células indiferenciadas que no expresan HLA-I (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I), como ocurre con las células tumorales y la citotoxicidad específica mediada por IL2 y por anticuerpos Ig G. Se han realizado estudios que demuestran la asociación entre una mayor susceptibilidad a infecciones virales y deficiencias en la función de las células NK. Además, un descenso en la actividad NK se asocia con la reactivación de infecciones latentes por VPH.

En la respuesta adquirida, el papel de los linfocitos es fundamental.

Los linfocitos B se producen en la médula ósea. Se transforman en células plasmáticas al ser activados por un antígeno (HLA independientes), y producen anticuerpos específicos contra ese antígeno. Los linfocitos B activados que no se transforman en células plasmáticas quedan como linfocitos B de memoria, para que en un segundo contacto con ese mismo antígeno la respuesta sea más rápida y más intensa.

- Los linfocitos T se producen en la médula ósea y maduran en el timo. Responden fundamentalmente a la presentación (HLA dependiente) de antígenos tisulares y de la membrana de las células. Al activarse, el linfocito T presenta otras moléculas en su superficie que actúan como coestimuladoras, cuyos ligandos en las células presentadoras de antígeno son las moléculas B7. Si el reconocimiento del antígeno se produce en ausencia de señales coestimuladoras se desencadena un fenómeno de tolerancia inmunológica. Hay dos subtipos de linfocitos, los CD4 hellper-cooperadores y los CD8 o citotóxicos-supresores.

- ✓ CD4: Ayudan a los linfocitos B y T CD8, por lo que su acción es indirecta. Los antígenos deben serle presentados unidos a moléculas HLA II. Dentro de los CD4 hay dos subclases:
 - Th1: La IL12 secretada por los macrófagos favorece la respuesta de estas células que sintetizan IFN γ e inhiben la producción de IL4 por las Th2, favoreciendo la respuesta celular y participando en la hipersensibilidad retardada y en la defensa frente a los patógenos intracelulares.
 - Th2: Producen IL4, IL5, IL6 e IL10, inhibiendo la producción de IFN γ , sobre todo, la IL4. Favorecen la respuesta humoral y participan en reacciones de hipersensibilidad inmediata y en la defensa frente a parásitos.
- ✓ CD8: Destruyen células que expresan antígenos no propios asociados a HLA I producidos dentro de la propia célula (LT CD8 citotóxicos). En la citotoxicidad participa el FAS-L que ellos expresan y la liberación de sustancias lesivas acumuladas en gránulos: perforinas, fragmentinas, nucleosina. Impiden la acción de los linfocitos T y B, interviniendo en mecanismos de supresión de la respuesta inmune (LT CD8 supresores). También quedan clones de CD8 de memoria, pero para ser activados necesitan la cooperación de los CD4.

Se ha puesto de manifiesto que la expresión anormal de CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico), molécula inhibidora expresada tanto por células B como T produce alteraciones en la respuesta inmune y se asocia con una mayor predisposición a determinados cánceres⁷⁰. Además los niveles circulantes de la

isoforma soluble de CTLA-4, que parecen ser menores en aquellos con el genotipo GG^{71,72}, se han relacionado con diferentes patologías autoinmunes^{73,74}. Por otra parte, el genotipo AA se ha relacionado con incremento en el riesgo de cáncer de cérvix⁷⁵.

La expresión de receptores de quimiocinas controla la migración de las células T y permite la identificación de estas células T y su clasificación en diferentes subgrupos con diferentes funciones, por lo que dentro de los linfocitos CD4 y CD8 existen diferentes subpoblaciones en función de los receptores de citoquinas expresados en superficie.

Así pues, los linfocitos T CD4 que expresan CCR4 y CCR6 pertenecen a la familia Th17, que secreta fundamentalmente citoquina IL17, que está envuelta no sólo en la respuesta inflamatoria aguda, sino también en determinadas enfermedades autoinmunes. La respuesta Th17, además, se ha asociado con determinados aspectos del desarrollo tumoral⁷⁶.

CCR5 es un receptor expresado por parte de linfocitos T, macrófagos y células dendríticas y al que se unen fundamentalmente quimiocinas como RANTES y MCP1⁷⁷. CXCR3 se expresa principalmente en linfocitos T activados, células NK y algunas células epiteliales y endoteliales⁷⁸. CXCR3 y CCR5 se expresa preferentemente en células Th1, mientras que las células Th2 favorecen la expresión de CCR3 y CCR4.

CD25 es una proteína transmembrana que constituye una parte del receptor para IL2, que se expresa en linfocitos T y B activados, dentro de éstas destacan CD4CD25⁺⁺, que son células T reguladoras que expresan niveles elevados de la cadena α del receptor de IL2 y que se han relacionado con la tolerancia frente a

antígenos propios. Por otra parte, se ha observado incremento de su frecuencia en sangre periférica en determinados cánceres^{79,80}. Otro antígeno expresado en los linfocitos sería CD45, que puede presentar diferentes isoformas, como CD45RO expresado por células T memoria. CD27 es el receptor de TNF y resulta fundamental en el origen y mantenimiento de la respuesta inmune mediada por células T, emitiendo señales que activan a NF κ B (Nuclear Factor κ B). CD28 es otra de las moléculas expresadas por parte de las células T y que proporciona señales para la producción por parte de estas células de determinadas interleucinas como IL2 e IL6. CD62L es una molécula de adhesión celular que juega un papel fundamental en las interacciones linfocitos-células endoteliales. CD95 es un receptor de muerte celular, también conocido como receptor Fas que cuando se une a su ligando FasL, desencadena la vía extrínseca de la apoptosis. Existe una relación estrecha entre la participación del ligando Fas y la citotoxicidad mediada por los linfocitos T CD8, mecanismo efector de gran importancia en la respuesta inmune antitumoral. Por ejemplo, la inactivación de las señales vía Fas debida a la baja expresión de este antígeno en la membrana puede llevar a la célula a una supervivencia anormal y contribuir al desarrollo y progresión de células transformadas.

Por otra parte, el receptor CD19 es específico de los linfocitos B.

Moléculas de histocompatibilidad: Son proteínas de membrana cuya función biológica es la presentación de péptidos derivados de proteínas intracelulares a los linfocitos T. Son necesarias ya que ciertos patógenos acostumbran a ocultarse de los anticuerpos, fagocitos y el complemento en el interior de nuestras células. Existen dos tipos de moléculas de histocompatibilidad diferentes denominadas de clase I (HLA I) y de clase II (HLA II). Las moléculas de clase I presentan péptidos a

los linfocitos T CD8, y las de clase II a los CD4. Todas las células del organismo, excepto los hematíes y el trofoblasto fetal, expresan moléculas de clase I. Sin embargo, solamente unas pocas células con funciones inmunológicas expresan además, moléculas de clase II: son las células presentadoras de antígeno profesionales. Las moléculas de histocompatibilidad son poligénicas, es decir, existen diferentes versiones o genes tanto de clase I como de clase II. Las moléculas de clase I se denominan HLA-A, HLA-B, HLA-C. Las de clase II se denominan HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Sus genes se encuentran ligados en una pequeña región del brazo corto del cromosoma 6 denominada complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)⁸¹.

El gen MICA es miembro de la familia MIC, que codifican proteínas relacionadas con HLA I, que pertenecen a una nueva familia, recientemente identificada de moléculas no clásicas del CMH. Las moléculas MIC son reconocidas por células T citotóxicas y células NK.

Múltiples estudios han demostrado repeticiones polimórficas del triplete (GCT)_n en el gen MICA. Estos polimorfismos han sido designados como A4, A5, A6, A9 y A5.1, representando 4,5,6 y 9 copias de (GCT) y (GCT)₄ (GGCT), respectivamente.

Las moléculas MICA se expresan frecuentemente en monocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos, especialmente bajo condiciones de estrés. Además son frecuentemente expresadas por tumores epiteliales. Pero no todas las variantes genéticas codifican para MICA. Específicamente el polimorfismo MICA 5.1 sólo codifica una molécula MICA soluble secretada y que no reside en la membrana celular, lo cual en el caso de los homocigotos para MICA 5.1, da lugar a células desnudas para la molécula MICA⁸².

El grupo de genes y sus diferentes polimorfismos, que codifican las moléculas MICA podrían tener relación con diferentes cánceres epiteliales, ya que estas moléculas presentan niveles séricos mayores en pacientes con cánceres epiteliales⁸³.

Las diferentes células involucradas en la respuesta inmune van a producir una serie de sustancias:

- Citoquinas: son proteínas de bajo peso molecular con acción autocrina y paracrina que sintetizan las células del sistema inmune en respuesta a los patógenos y a sus productos, o a otras señales relacionadas. Dentro de este nombre se agrupan las proteínas llamadas linfocinas, monocinas, quimiocinas, interleucinas, interferones y factores estimuladores de colonias. Los productores mayoritarios de estas proteínas son los macrófagos y los linfocitos T. Su acción se efectúa a través de la estimulación de los receptores específicos para cada tipo de interleucina. Se caracterizan por cuatro propiedades; pleiotrofismo (diferentes efectos biológicos en diferentes tipos de células), redundancia (diferentes citoquinas tienen el mismo efecto), sinergismo (la combinación del efecto de dos citoquinas es mayor que la suma de los efectos individuales) y antagonismo (una citoquina inhibe o contrarresta a otra). Hay interleucinas proinflamatorias como son la IL1, IL6, TNF α , IL2, IL12, IFN γ , TNF β , IL16; antiinflamatorias como la IL10, TGF β , INF α y IFN β .

IL1 Alpha (IL1A) e IL1 Beta (IL1B) son producidas por monocitos, macrófagos y células epiteliales y exhiben unas características biológicas similares a TNF α , incluyendo la respuesta del huésped a la invasión por diferentes microorganismos, inflamación y lesión tisular⁸⁴. Por otra parte, los diferentes polimorfismos de IL1 se han asociado con cánceres gástricos, hepáticos,

pulmonares, colorrectales, vulvares, ováricos y cervicales^{85,86,87,88,89,90,91}. El alelo T del gen que codifica para IL1 en la posición 889 se ha asociado con elevada producción de dicha citoquina⁹².

TABLA 6: Citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata

Citoquina	Célula origen	Célula diana	Función
IL1 α IL1 β	Macrófagos Epiteliocitos	Linfocitos T Macrófagos Hipotálamo	Inducción de fiebre Activación de linfocitos T Activación macrófagos
IL6	Linfocitos Th2 Macrófagos	Linfocitos T Linfocitos B Hepatocitos	Activación células T Activación células B Activación fase aguda
IL12	Macrófagos Neutrófilos Células dendríticas	Linfocitos T NK	Diferenciación de linfocitos Th1 Activación linfocitos NK y Tc
IL16	Linfocitos Tc Leucocitos Epiteliocitos	Linfocitos Th Monocitos CD4 Eosinófilos CD4	Quimioatrayente Inducción del receptor IL2 Inducción del HLA-DR
TNF α	Macrófagos Linfocito Th1 NK Mastocitos Hepatocitos	Fagocitos Endotelocitos Linfocitos T, B y NK	Inflamación local Activación del endotelio/linfocitos Inducción de fiebre Activación fase aguda
IFN α	Leucocitos	Múltiples	Inducción de CMH I
IFN β	Fibroblastos	Múltiples	Activación presentación antígenos Activación células NK Inhibición replicación viral
IFN γ	Linfocitos, Th 1, NK, linfocitos Tc	Macrófagos Linfocitos Tc	Formación granuloma Eliminación micobacterias por los macrófagos Inducción CMH I

TABLA 7: Citoquinas involucradas en la respuesta inmune específica

Citoquina	Célula origen	Célula diana	Función
IL2	Linfocitos Th 1	Linfocito T, B, NK Monocito	Activación y crecimiento de linfocitos T, B, NK y macrófagos
IL4	Linfocitos Th 2 Mastocito	Linfocito T Linfocito B Macrófago	Activación y diferenciación de células B Actividad antitumoral
IL5	Linfocito Th 2	Eosinófilo Linfocito B	Activación, crecimiento y/o diferenciación de linfocitos B, eosinófilos y precursores hematopoyéticos
IL9	Linfocitos T	Linfocito T Precursor hematopoyético	Activación de subtipos de linfocitos T Crecimiento de precursores Activación de mastocitos
IL10	Linfocito Th 2 Macrófagos	Linfocito B Linfocito NK Macrófago	Inhibición de macrófagos y de la producción de citoquinas de células T Activación y diferenciación de linfocitos B
IL13	Linfocito Th 2	Linfocito B Monocito-macrófago	Proliferación y diferenciación de células B Inhibición de macrófagos
IL14	Linfocito T	Linfocitos B	Inducción proliferación de linfocitos B Inhibición secreción Ig
IL15	Monocitos Fibroblastos Otras	Linfocito T, B, NK Monocitos	Activación y crecimiento de T, B, NK y macrófagos. Proliferación mastocitos
IL17	Linfocitos T	Linfocitos T Fibroblastos Macrófagos	Inducción de IL 6, IL 8 y adhesión (ICAM-1) Proliferación de linfocitos T
TGF β	Linfocitos Th 2 Macrófagos	Linfocito Th 1 Macrófago	Inhibición activación de linfocito T y macrófago Inducción de síntesis de moléculas de adhesión
TNF β	Macrófago Endotelio	Macrófago Endotelio	Inflamación Activación Citólisis

El TNF α es el principal iniciador de la respuesta inflamatoria (una respuesta innata inducida), ya que actúa sobre los vasos sanguíneos de la zona infectada, provocando un incremento del diámetro y la permeabilidad vascular, permitiendo con ello la acumulación de inmunoglobulinas, complemento y otras proteínas sanguíneas. Por otro lado, el TNF α también induce la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, facilitando la unión de los leucocitos circulantes y la migración de éstos al interior del tejido linfático.

El papel crítico de TNF α en la enfermedad inflamatoria crónica está bien establecido y sus efectos promotores tumorales han sido demostrados, siendo un factor importante relacionado con la iniciación, proliferación, angiogénesis y metástasis de varios tipos de cáncer⁹³.

Su gen correspondiente está localizado dentro del CMH en el cromosoma 6, posición 6p21.3, adyacente a los genes de las linfotoxinas alfa y beta (LT α y LT β). Ambos genes están incluidos en el locus denominado TNF. Se han descrito varios polimorfismos dentro del gen del TNF. Hasta el momento se han descrito cinco microsatélites con múltiples alelos y, a partir de ellos, se han conformado diferentes haplotipos. Hay también datos de los siguientes polimorfismos de nucleótido único (SNP, single nucleotide polymorphisms) en la región promotora del gen del TNF α : -1031 T/C, -863 C/A, -857 C/A, -851 C/T, -419 G/C, -376 G/A, -308 G/A, -238 G/A, y -49 G/A. El alelo en la posición -308 (denotado como TNF2) ha sido el más estudiado y está asociado a una alta transcripción del gen de TNF α ^{94,95}.

El IFN γ es la principal citoquina de las sintetizadas por las células Th1 y NK, encargada de activar a los macrófagos, de la formación de granulomas y de la

activación de CMH I. Es particularmente eficaz en el control de infecciones producidas por virus.

Existen 8 tipos diferentes de alelos para el gen que codifica el IFN γ , variando su frecuencia en función de las razas. Así, en la población caucásica son poco frecuentes los alelos 15 y 18, mientras que son más frecuentes en la población asiática. El número que recibe cada alelo depende de las veces que se repite la unidad CA, dentro del primer intrón del gen del interferón. Así en el alelo 12 encontramos 12 repeticiones y así sucesivamente. Por otra parte, el polimorfismo (CA) $_n$ dentro del primer intrón del gen del IFN γ informa de que alelos lo componen, y por tanto, de si es homocigoto o heterocigoto y está relacionado con la secreción de dicho interferón. El alelo 12 se ha relacionado con elevada producción de IFN γ . Por el contrario, el alelo 13 se ha asociado con niveles disminuidos de IFN γ . El significado funcional de otros alelos no se conoce claramente, aunque parece ser que el alelo 14 se asocia con elevada expresión y el 18 con baja expresión de IFN γ ⁹⁶.

Los diferentes polimorfismos del IFN γ se han relacionado con una mayor predisposición a patologías autoinmunes y cierta susceptibilidad a neoplasias^{97,98}.

Así pues, niveles elevados de esta citoquina se asociarían con un aclaramiento más rápido de la infección por VPH, mientras que una expresión intratumoral disminuida de IFN γ se asocian con la aparición de neoplasias cervicales intraepiteliales y un peor pronóstico en el cáncer de cérvix^{99,100,101,102}. Por otra parte, en los tumores secundarios a inflamación crónica, una elevada producción de IFN γ , puede contribuir al crecimiento tumoral y a la progresión del mismo.

Otras citoquinas, las quimiocinas, atraen selectivamente a los leucocitos. Las quimiocinas son un conjunto de citoquinas quimiotácticas producidas por varios tipos celulares (monocitos, macrófagos, linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales). Son potentes quimioatrayentes de los leucocitos y sus funciones proinflamatorias son independientes de la respuesta inmune adaptativa. Dentro de esta superfamilia se encuentran más de 50 proteínas que se engloban en familias de acuerdo con la configuración de dos residuos de cisterna situados cerca del extremo aminoterminal de la proteína⁸¹ (tabla 8).

TABLA 8: Quimiocinas

Quimiocinas	Estructura	Célula origen	Célula diana	Función
Familia CXC IL8, PF4, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA 78, GCP- 2, IP10, Mig, SDF-1	Monómeros o dímeros de 7-15 kD, solubles o unidos a proteoglicanos de los endotelios	Leucocitos Endotelios	Neutrófilos linfocitos	<ul style="list-style-type: none"> • Quimiotaxis • Inducción de moléculas de adhesión • Activación
Familia CC RANTES, MIP- 1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP- 4, MCP-5, Eotaxina,DC-CK1			Monolitos	
Familia C Linfotactina SCM-1 β			Linfocitos Eosinófilos Basófilos	
Familia CX3C Fractalcina Neurotactina				

La quimiocina RANTES se cree que puede tener un papel antitumoral a través de la inmunidad celular. Diferentes polimorfismos de RANTES se han asociado con riesgo elevado de cáncer de páncreas y de próstata, apoyando la hipótesis

de que diferentes polimorfismos de genes proinflamatorios en combinación con otras condiciones pueden influir en el desarrollo de tumores^{103,104,105}.

Dentro de la familia de quimiocinas CC se encuentra MCP-1, que posee actividad quimiotáctica para monocitos y linfocitos T^{106,107} y ha sido propuesta para jugar un papel clave en el reclutamiento de macrófagos, en la expresión de factores angiogénicos y activación de la matriz de metaloproteínas en pacientes con cáncer de mama y cáncer gástrico¹⁰⁸. Variantes genéticas dentro de las regiones reguladoras de MCP-1 que afectan a la transcripción y a la producción de proteínas se han relacionado con el riesgo de metástasis de cáncer de mama. Estos hallazgos concuerdan con los referidos previamente de sobreexpresión de MCP-1 en cáncer de mama^{109,110}. Por el contrario, se ha visto una asociación negativa entre la expresión de MCP-1 y la frecuencia de metástasis de melanoma y su agresividad¹¹¹.

NFκβ son factores de transcripción que juegan un papel importante en la respuesta inmune e inflamatoria. En la infección los microorganismos patógenos activan NFκβ a través de los receptores Toll-like, que son expresados en células del sistema inmune, incluyendo macrófagos, células dendríticas y células de la mucosa epitelial. Se han descrito 10 receptores Toll-like y forman parte de un sistema de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son productos microbianos que activan la inmunidad innata^{112,113}.

La inducción de NFκβ es esencial para la expresión de una amplia variedad de genes de la respuesta inmune. Éstos, incluyen citoquinas proinflamatorias

(TNF, IL1 e IL6), quimiocinas (MIP-1 α y RANTES) y moléculas de adhesión (E-selectin y VCAM-1).

Por otra parte, NF κ B facilita la activación de células T a través de la regulación de proteínas del CMH.

La familia NF κ B incluye NF κ B1 (p50/p105), NF κ B2 (p52/p100), p65 (Rel A), Rel B y Rel C. El gen NF κ B1 está localizado en el cromosoma 4q24-q24, tiene 24 exones y codifica las isoformas de NF κ B p50/p105. Recientemente se ha identificado un nuevo polimorfismo de NF κ B1, consistente en una inserción/delección (94 ins/del ATTG) que muestra efectos funcionales en la transcripción del gen NF κ B1. La presencia de una delección 4bp resulta en la pérdida de unión a proteínas nucleares y reducción de la actividad promotora de NF κ B1¹¹⁴.

La disregulación de NF κ B puede ocasionar una superproducción constitucional de citoquinas proinflamatorias, lo cual está relacionado con desórdenes inflamatorios crónicos, como artritis reumatoide y enfermedad de Crohn. NF κ B también juega un importante papel en la regulación de la expresión de proteínas antiapoptóticas y del regulador de la progresión del ciclo celular ciclina D1, el cual incrementa la supervivencia celular y la proliferación respectivamente. Consecuentemente NF κ B ha sido implicado en la transformación celular, y la activación persistente del mismo puede explicar la conocida relación entre inflamación crónica y varios tipos de cáncer¹¹⁵.

- Proteínas del complemento: son sintetizadas por macrófagos y hepatocitos. Actúan como una cascada de 20 proteínas plasmáticas que acaban formando complejos de ataque a la membrana de células extrañas. Hay dos vías por las

que puede activarse esta cascada, la vía clásica (inmunocomplejos, lipopolisacáridos bacterianos) y la vía alternativa (microorganismos de forma innata, inmunoglobulinas). El sistema del complemento tiene capacidad de auto amplificación, por lo que existen mecanismos que la regulan, como son el factor acelerador de la degradación (DAF), el CR1, CR2, CR3, factor I, la properdina, etc.

- Anticuerpos: Tiene tres funciones principales. La primera, la neutralización de su antígeno para que deje de ser patógeno, la segunda, la opsonización, que consiste en aumentar la afinidad de los antígenos para que otros mecanismos sean los que acaben con ellos, y por último, la activación indirecta del complemento. Son proteínas sintetizadas por las células plasmáticas, constituyendo el 20% de las proteínas totales del organismo. Constan de cuatro cadenas, dos ligeras y dos pesadas, idénticas entre sí dos a dos, y unidas por la zona bisagra. Por un extremo se unen al antígeno (cada Ig tiene dos fragmentos Fab idénticos) y por el otro a células fagocíticas, mastocitos y basófilos (región Fc). Este extremo también tiene la propiedad de activar el complemento.

5.2. Papel del sistema inmune en la Infección por VPH y en el desarrollo del cáncer de cérvix

El VPH, comparado con otros patógenos, es muy poco inmunógeno debido a varias características estructurales y fisiológicas:

- Virus ADN sin ARN intermedio que evoque respuesta innata

- En la primera fase de la infección el VPH no produce nucleoproteínas que sean presentadas por las células infectadas
- La mayoría de proteínas VPH son expresadas a muy bajo nivel en el epitelio basal (el más accesible al sistema inmune del huésped)
- El VPH sólo infecta células epiteliales sin inducir muerte celular (el mayor activador de la inmunidad innata o adaptativa).
- Presentación antigénica sistémica limitada.

El sistema inmune innato, estudiado extensamente en el contexto de las enfermedades autoinmunes o tras la infección de agentes patógenos, se ha revelado recientemente como un regulador importante del desarrollo del cáncer.

Las lesiones premalignas y malignas se asocian con alteraciones en la función de las células inmunes. Dichas alteraciones incluyen la supresión de la inmunidad celular, asociada con el fallo en el rechazo tumoral, en combinación con el incremento de la inmunidad humoral, lo que puede potenciar la promoción y progresión del tumor¹¹⁶.

Una de las principales deficiencias de la inmunidad innata frente a la infección VPH estriba en la ineficacia de las células presentadoras de antígeno como centinelas para el inicio de la respuesta inmune adaptativa (células dendríticas localizadas en la dermis y células de Langerhans en la epidermis y capas superficiales). Dicha tolerancia inmunológica radica en:

- La ausencia de expresión de proteínas virales en las capas basales y suprabasales del epitelio (áreas de vigilancia de las células de Langerhans) ya

que la producción de viriones (altamente inmunógenos) se produce en las capas superficiales del epitelio desprovistas de tales células presentadoras de antígenos. La falta de lisis celular durante el ciclo viral que impide la activación de las células dendríticas dérmicas y secundariamente la falta de respuesta linfocítica.

- Por otro lado en el reconocimiento antigénico juegan un papel clave los receptores Toll-like (TLR), grupo de receptores expresados primariamente sobre células del sistema inmune innato con capacidad de reconocer patrones moleculares específicos asociados a agentes infecciosos y que se traduce en la expresión de múltiples productos proinflamatorios. Se ha demostrado que los oncogenes E6 y E7 del VPH-16 producen una baja expresión de TLR9 contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune¹¹⁷.

La inmunidad celular se asocia con el aclaramiento de la infección por VPH y la regresión de las neoplasias cervicales favorecida, como ya hemos visto, por los CD4 Th1, por lo que varios trabajos han sugerido la asociación entre las citoquinas producidas por Th1 y el aclaramiento de VPH, mientras que las citoquinas dependientes de Th 2 pueden favorecer la persistencia de la infección viral. Como ejemplo IL10 ha sido considerada clásicamente como una citoquina inmunosupresora que inhibe la actividad de linfocitos y monocitos y bloquea la síntesis de citoquinas dependientes de Th1, pudiendo actuar como un promotor tumoral. La expresión del gen que codifica para IL10 está fuertemente influenciada por factores genéticos. Algunos de los polimorfismos identificados en los genes de citoquinas y quimiocinas afectan a la tasa de transcripción o a la actividad biológica y pueden por lo tanto jugar un papel importante en la carcinogénesis. Así el genotipo

GG en la posición 1082 se asocia con una elevada producción de IL10, el genotipo AG con producción intermedia y el genotipo AA con baja producción^{118,119}. En relación con esto un estudio en pacientes con cáncer de cérvix encuentra niveles elevados de IL 10 en biopsias, lo que sugiere un papel favorecedor de la persistencia viral y de la progresión de lesiones cervicales asociadas por parte de esta citoquina¹²⁰. Sin embargo el papel de IL10 en el microambiente tumoral sigue siendo controvertido y así en otro trabajo se relacionaron los genotipos GG y AG (mayor producción de IL10) con un aclaramiento más rápido de la infección por VPH¹²¹.

Los mecanismos moleculares por los que la inmunidad humoral ejerce su impacto sobre el inicio, promoción y progresión del cáncer están siendo objeto de múltiples estudios, constatando que las citoquinas localizadas en el estroma celular pueden regular el crecimiento tumoral afectando la angiogénesis, la supervivencia o muerte celular y su diferenciación.

En el microambiente tumoral, hay un delicado equilibrio entre inmunidad antitumoral y actividad proinflamatoria originada por el tumor. Cuando la actividad antitumoral inmune es más débil que la actividad inmunosupresora mediada por el tumor, las células tumorales escapan al sistema inmune y crecen rápidamente⁹³. La inflamación crónica causada por la infección persistente es la principal fuerza motriz en el desarrollo de un tumor, ya que la inadecuada erradicación de patógenos prolonga las señales inflamatorias y produce defectos en los mecanismos antiinflamatorios lo que puede conllevar a una inflamación crónica y beneficiar el desarrollo tumoral.

Se ha observado que en mujeres inmunodeprimidas las lesiones producidas por el VPH son más agresivas y se producen en un tiempo más corto, por tanto, uno de los

factores que determinará la respuesta de un epitelio frente a una infección por un virus con capacidad oncogénica como es el caso del VPH es la capacidad de dar una adecuada respuesta inmune por parte del huésped.

Los virus son parásitos intracelulares obligados y eso condicionará la respuesta inmune frente a ellos. Sin embargo manifiestan una fase extracelular en la que también son susceptibles de ser neutralizados por el sistema inmunitario humoral. En la fase extracelular, los virus sin cubierta, como el VPH, pueden ser bloqueados por anticuerpos específicos frente a los antígenos de la cápside. En la fase intracelular, las células infectadas por virus presentan antígenos del virus asociados a su CMH-I lo que permite que sean detectadas y eliminadas por lisis o apoptosis mediante la acción de los linfocitos T citolíticos y las células NK.

Sin embargo, los virus han desarrollado sofisticados mecanismos de evasión del sistema inmune. En la limitación de la respuesta inmune adaptativa frente a la infección VPH se ha constatado mediante:

- una reducción o ausencia de respuesta por linfocitos T CD4 en sangre periférica o en moco cervical, así como disminución de IFN γ (citoquina Th1) y de IL5 (citoquina Th2).
- falta de efecto citolítico de los linfocitos T citotóxicos (LTC) dirigidos a las proteínas L1 y L2 ya que dichas proteínas se expresan muy tardíamente.
- regulación negativa de la proteína 1 transportadora asociada con antígeno (TAP1), necesaria para cargar el CMH clase I con las proteínas virales antes de que el complejo se adapte a la membrana, promovida por el oncogén E7.

- baja respuesta en título de anticuerpos frente a L1 (40-60% responden tardíamente) y mínima o ausente producción de anticuerpos para otros antígenos del VPH como E1, E2, E6 y L2 en pacientes con infección aguda o persistente.
- aunque se especula que la inmunidad celular es fundamental para evitar la infección persistente, dicha respuesta frente al VPH no es bien comprendida.

Son múltiples los caminos de la respuesta inmune que pueden verse afectados y la suma de los mismos contribuirá a la aparición de una neoplasia asociada a VPH y a su resistencia al control inmunológico.

Por otra parte, el queratinocito modificado por la infección viral, no produce niveles adecuados de citoquinas. Además, la producción de citoquinas inmunosupresoras por células infectadas por VPH puede inhibir la producción de citoquinas que estimulen la actividad antitumoral de NK, LTC y macrófagos^{122,123}.

Además el VPH no infecta ni se replica en células presentadoras de antígeno que están localizadas en el epitelio, ni tampoco en queratinocitos, por lo que no hay oportunidad para las células presentadoras de antígeno de fagocitar los viriones y presentar los antígenos derivados al sistema inmune. Por otra parte, no hay fase de viremia de la infección, por lo que el sistema inmune fuera del epitelio tiene muy pocas oportunidades de detectar el virus.

Aunque se puede esperar que la cápside viral sea altamente inmunógena, el VPH ha sido evolutivamente seleccionado por minimizar los niveles de expresión de las proteínas de la cápside y/o aplazar la expresión de estas proteínas al epitelio

diferenciado. De esta forma, evitan a las células de Langerhans, comúnmente localizadas en las capas proximales del epitelio.

De todas las proteínas del VPH, la L1 es la mejor caracterizada en cuanto a la generación de respuesta inmunitaria. Anticuerpos específicos contra la L1, la proteína más abundante en la cápside viral del VPH, son la mejor prueba de generación de respuesta inmunitaria frente al virus en los seres humanos. Lamentablemente la detección de estos anticuerpos a veces no se observa hasta 5 años después de la infección natural por VPH y sólo parte de los sujetos expuestos generan esta respuesta. Un estudio llevado a cabo por Luxton analizó la detección de anticuerpos contra L1 en pacientes con displasia o cáncer cervical en comparación con mujeres adultas sanas que funcionaron como controles. La detección en sujetos control fue del 36%, en pacientes con displasia cervical del 45% y en pacientes con cáncer cervical del 40%¹²⁴. En cualquier caso, parece ser que sólo un 50-60% de mujeres desarrollan anticuerpos séricos tras infección natural por VPH¹²⁵. En la actualidad, aún se desconoce la duración de la inmunidad adquirida de forma natural tras infección por VPH, aunque probablemente será de años al igual que en la conferida por la vacunación¹²⁶.

Hasta la fecha, se han desarrollado dos vacunas de VPLs (partículas similares al virus) de L1 de VPH. Éstas inducen niveles elevados de IgG neutralizante sérica, muy superiores a los que induce la inmunidad natural tras la infección. La IgG es la principal inmunoglobulina en las secreciones cervicales y actualmente se asume que la protección es mediada por la IgG sérica, que puede trasudar a través del epitelio cervical, sobre todo a nivel de la unión escamo-columnar, en concentraciones suficientes para unirse a las partículas virales y prevenir la infección. Los niveles

sistémicos de IgG son sustancialmente mayores que los niveles en las secreciones cervicales, y es posible que los lugares de infección potenciales en la superficie del epitelio cutáneo y de las mucosas puedan tener acceso a anticuerpos sistémicos. Esta situación puede producirse por el hecho de que, para que pueda establecerse la infección, debe haber un contacto directo del virus con los queratinocitos en la capa basal del epitelio. Los microtraumatismos del epitelio, como los que pueden producirse durante el coito, aumentarían las probabilidades de una exposición de este tipo y, en esta situación, la zona susceptible de infección tendría un acceso más directo a la IgG sistémica¹²⁷.

La expresión de los genes E6 y E7 del VPH en los queratinocitos altera directamente la expresión de genes que influyen en las resistencias a la infección y en la función inmune. E6 y E7 impiden el efecto antiviral, antitumoral e inmunorregulador de la respuesta innata mediada por interferón. E7 es además un creador de tolerancia, ya que durante el recambio normal de las células epiteliales cervicales, las células moribundas son recogidas por células de Langerhans; en el trayecto de las células dendríticas y de Langerhans desde el epitelio o desde tumores epiteliales a los ganglios linfáticos deben madurar para repartir su carga de antígenos a las células T y así desencadenar la respuesta inmune. Pero las células dendríticas portadoras de E7 no logran madurar y transmiten una tolerancia frente a ésta cuando llegan a los ganglios linfáticos.

Otros trabajos indican que hay más mecanismos de huida del VPH a la inmunidad como las similitudes existentes entre E7 y otras proteínas humanas, la inhibición por E6 y E7 del IFN α , disminución de la producción de IL 8 o mediante acidificación de

endosomas interfiriendo en la presentación del antígeno a las células T, entre otros¹²⁸.

En resumen, la respuesta inmune frente al VPH se caracteriza por:

- Inducción de bajo títulos de anticuerpos
- Baja activación de las células presentadoras de antígeno en el epitelio cervical por la cápside viral
- Escasa inducción de inflamación
- Débil estimulación del sistema inmune adaptativo
- Inducción de escasa memoria inmunológica.

En definitiva, el VPH es capaz de evadir la respuesta inmune innata, lo que retrasa la activación de la respuesta inmune adaptativa, y explica que la respuesta inmune natural frente al VPH sea más lenta y débil que la inducida por la mayoría de otros virus.

6 ESTADO ACTUAL DEL TEMA

En conjunto, los datos clínicos indican un papel del incremento de la inmunidad humoral e inflamación en combinación con una supresión de la inmunidad celular, en la patogénesis de varios tipos de cáncer, por lo que las investigaciones relacionadas con los mecanismos humorales y celulares con el aumento del riesgo de cáncer

pueden proporcionar nuevos objetivos terapéuticos con los que combatir la enfermedad neoplásica.

El estudio del papel de la inmunidad y de la genética sigue siendo fundamental, puesto que no se verá el efecto de las vacunas sobre las CIN 3 y el cáncer cervical invasor hasta transcurridas dos o tres décadas desde su implantación.

La respuesta inmunitaria frente a distintos antígenos del VPH estudiados supone un arma que ofrece muchas posibilidades, por ejemplo, en investigación epidemiológica y en la formulación de vacunas preventivas e incluso terapéuticas. Por lo tanto, resulta de sumo interés comprender los elementos de la respuesta inmunológica que la infección causada por el VPH despierta en el huésped, tanto humoral como celular.

El papel de las células inmunorreguladoras en el mantenimiento de la anergia de los linfocitos T citotóxicos en las pacientes con cáncer de cérvix necesita ser aclarado, y la posibilidad de la depleción de estas células para la terapia necesita ser explorada. Por otra parte resulta fundamental el diseño de nuevos estudios dirigidos a revelar los mecanismos moleculares y celulares que encadenan la inmunidad humoral, inflamación y el desarrollo del cáncer, con el fin de suministrar elementos para elaborar nuevos objetivos en la terapia anti tumoral.

Como ha sido descrito, muchas citoquinas proinflamatorias producidas por células inmunes del huésped y por células tumorales promueven el desarrollo tumoral. Por el contrario citoquinas proapoptóticas y antiinflamatorias usualmente interfieren en el desarrollo tumoral. Estos hallazgos proporcionan una oportunidad terapéutica única basada en la interferencia selectiva con la acción proinflamatoria y promotora

tumoral de algunas citoquinas, mientras que se aumenta la actividad proapoptótica y antiinflamatoria de otras.

Finalmente, cabe destacar que las implicaciones clínicas de los nuevos conocimientos de biología molecular son potencialmente enormes, por lo que resulta fundamental incidir en su estudio.

HIPÓTESIS

Múltiples evidencias sostienen que el sistema inmunológico juega un papel fundamental en el control y progresión de las lesiones inducidas por el papilomavirus. De hecho, se observa una alta incidencia de infecciones persistentes de VPH y de lesiones displásicas en pacientes inmunosuprimidos (post-trasplantados y enfermas de SIDA). Por otra parte, en pacientes inmunocompetentes que desarrollan lesiones intraepiteliales cervicales, se han descrito una serie de anomalías que ocasionan una disfunción de los mecanismos efectores de la respuesta inmunológica adaptativa. El tipo y concentración de citoquinas en el microambiente local condiciona la polarización T (Th1/Th2), la intensidad, duración y maduración funcional de las respuestas celulares, por tanto la resolución o no (persistencia) de la infección.

La síntesis de citoquinas está regulada a nivel transcripcional y se han identificado polimorfismos genéticos, normalmente en el promotor de estos genes, que determinan la intensidad de expresión.

Nuestra HIPOTESIS establece que deben de existir diferencias en polimorfismos genéticos de citoquinas y quimiocinas en pacientes que desarrollan lesiones cervicales asociadas a VPH. Estas diferencias podrían condicionar la evolución (regresión o persistencia/recidiva) de la neoplasia cervical intraepitelial tras tratamiento escisional. Finalmente, una respuesta satisfactoria frente a la infección del VPH se asocia frecuentemente con la inducción de una respuesta efectora sistémica T frente a antígenos virales. Por el contrario, una infección crónica persistente y, por tanto, una exposición continua a los antígenos virales, debe de producir cambios en determinados marcadores en los linfocitos T CD4 y CD8

relacionados con la disfunción (“exhaustion”, agotamiento) de los mecanismos efectores de la inmunidad

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los objetivos planteados al inicio del presente estudio fueron los siguientes:

1. Demostrar si existen diferencias en polimorfismos genéticos que regulan procesos clave de la respuesta inmune y del desarrollo de procesos inflamatorios crónicos entre mujeres sanas y aquellas que presentan lesiones cervicales (CIN). Los genes seleccionados controlan los procesos de quimiotaxis (RANTES y MCP-1), las respuesta inmune innatas (TNF α , IL1A, NF κ β y MICA) y las respuestas inmunes adaptativas (IFN γ , IL10, CTLA-4).
2. Estudiar marcadores linfocitarios relacionados con la maduración y la diferenciación funcional de los linfocitos, con el objeto de investigar si existen diferencias entre pacientes y controles y también alteraciones asociadas a la evolución de la neoplasia cervical.
3. Comprobar si existen cambios en las subpoblaciones linfocitarias en pacientes con lesiones producidas por VPH en el momento del tratamiento escisional de la lesión y seis meses después del mismo en relación a la aparición o no de recidivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de estudio:

Para la consecución de dichos objetivos se plantearon diferentes tipos de estudios.

En primer lugar se planteó un estudio transversal para ver la frecuencia de las variantes alélicas de cada polimorfismo genético en los dos grupos de estudio (pacientes con CIN frente a controles sanos) y la proporción de las subpoblaciones linfocitarias junto con el grado de lesión cervical y la tasa de recidiva/ persistencia de lesiones en el grupo de pacientes.

A continuación, se realizó un estudio observacional de casos y controles retrospectivo, con el fin de establecer el riesgo para CIN de cada polimorfismo del gen de RANTES, MCP-1, TNF α , IL1A, NF κ β , MICA, IFN γ , IL10-1082, IL10-819, y CTLA-4, junto con la frecuencia de las diferentes poblaciones linfocitarias.

Por otra parte, se clasificó a las pacientes en función del grado de lesión cervical y se estudió su relación con los polimorfismos genéticos y la proporción de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica en el momento del LEEP. Finalmente, se agrupó a las pacientes en función la aparición o no de recidiva/persistencia de lesiones con el objetivo de conocer si existía asociación con los diferentes polimorfismos genéticos, la proporción de subpoblaciones linfocitarias y su incremento o disminución tras el tratamiento.

2 SELECCIÓN DE PACIENTES

2.1 *Criterios de inclusión*

- Grupo de casos
 - ✓ Pacientes atendidas en la consulta de patología del tracto genital inferior a las que se practicó conización con asa de diatermia.
 - ✓ Pacientes que aceptaron participar en el estudio mediante firma de consentimiento informado y que preveían realizar el seguimiento posterior en nuestro hospital.
- Grupo control
 - ✓ Mujeres sin antecedentes de patología del tracto genital inferior.
 - ✓ Mujeres con al menos una citología cervical normal en los últimos tres años.

2.2 *Criterios de exclusión*

- Grupo de casos
 - ✓ Pacientes con enfermedades infecciosas susceptibles de transmisión por vía hematológica (VIH, hepatitis B o C)
 - ✓ Pacientes con enfermedades que causaran inmunosupresión
 - ✓ Pacientes con enfermedades de origen autoinmune

- Grupo control:
 - ✓ Pacientes con enfermedades infecciosas susceptibles de transmisión por vía hematológica (VIH, hepatitis B o C)
 - ✓ Pacientes con enfermedades que causaran inmunosupresión
 - ✓ Pacientes con enfermedades de origen autoinmune

La población objeto de estudio se obtuvo de las pacientes sometidas a conización con asa de diatermia en la consulta de Patología del Tracto Genital Inferior del Hospital Universitario Virgen de las Nieves en el intervalo de tiempo transcurrido entre Mayo de 2002 y Julio de 2007 y que aceptaron participar en el estudio mediante firma de consentimiento informado (documento adjunto en el apartado “anexos”), teniendo previsto realizar el seguimiento posterior en dicho centro.

El seguimiento de estas pacientes se realizó hasta Noviembre de 2008 según el protocolo de actuación del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y siguiendo las recomendaciones establecidas tanto por la Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO) como por la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC). Este protocolo sufrió cambios durante la realización del estudio que se detallan a continuación:

- En primer lugar y hasta 2007, se realizó seguimiento trimestral el primer año y semestral el segundo, mediante citología y colposcopia, practicándose legrado endocervical de control en cada visita anual tras la conización. Tras dos años de seguimiento se procedía al alta de la paciente, siempre y cuando el último control fuese normal. En caso contrario, se continuó el seguimiento semestral hasta la normalización de las diferentes pruebas.

- En segundo lugar, y tras añadir al protocolo de seguimiento el genotipado del VPH mediante técnica de PCR, se procedió a su determinación semestral, y con el mismo intervalo en las revisiones antes detallado, éstas concluyeron cuando la determinación del virus fue negativa para genotipos de alto riesgo.

Se consideró como persistencia/recidiva de lesiones cuando se detectó un resultado histológico positivo tras toma de biopsia o legrado endocervical en cualquier momento del seguimiento, independientemente del grado de lesión.

El grupo control se obtuvo de dos fuentes. En primer lugar, para el estudio de las poblaciones de linfocitos en sangre se extrajo una muestra en tubo de hemograma a trabajadoras del centro que acudieron a la consulta de Medicina Preventiva como parte de una revisión rutinaria. Previamente se obtuvo consentimiento informado para la participación en el estudio (documento adjunto en el apartado “anexos”).

En segundo lugar, se usó como grupo control para el estudio de los diferentes polimorfismos a pacientes que acudieron al servicio de Urgencias de Obstetricia y Ginecología y a las que se les practicó como parte del estudio inicial un análisis de sangre, solicitando la extracción de una muestra adicional para participar en el estudio (documento adjunto en el apartado “anexos”).

Todas las participantes en el grupo control negaron antecedentes de patología cervical y además tenían al menos un control citológico normal en los tres años precedentes a la toma de la muestra para estudio hematológico.

Se excluyeron, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, aquellas participantes con enfermedades infecciosas susceptibles de transmisión por vía

hematógena (VIH, hepatitis B o C), con enfermedades que ocasionaran inmunosupresión o con enfermedades de origen autoinmune.

El número de pacientes a las que se realizó conización con asa de diatermia fue un total de 89. De dichas pacientes, en 43 casos se estudiaron todas las variables, es decir, se analizaron tanto los valores de subpoblaciones linfocitarias, como los diferentes polimorfismos genéticos, en 10 casos se hizo únicamente estudio de poblaciones linfocitarias y en 36 casos solamente se estudiaron los diferentes polimorfismos genéticos. Esto se debió a las posibilidades del laboratorio, de realización de cada técnica, en el momento del reclutamiento de la paciente.

Así pues, para el estudio de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica contamos con los datos recogidos en un total de 53 pacientes, frente a los 33 controles reclutados. Para el estudio de los polimorfismos genéticos que codifican para las diferentes citoquinas y quimiocinas, previamente descritas contamos con los datos recogidos en 78 pacientes y 98 controles sanos.

El presente trabajo fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (documento adjunto en el apartado “anexos”).

3 PROCEDIMIENTO CLÍNICO

3.1 Descripción del equipo

Para el procedimiento de diagnóstico y tratamiento de la neoplasia cervical intraepitelial en la Unidad de Tracto Genital Inferior utilizamos:

- Colposcopio estereoscópico de luz fría Optomic Mod. OP-C5 con sistema de videocolposcopia integrado.
- Electrobisturí con generador de alta frecuencia monopolar/bipolar modelo Next 150.

Para los diferentes estudios en el laboratorio se utilizó:

- Citómetro de flujo FACSort (BD Biosciences Immunocytometry Systems).
- 500-PCR REAL TIME Sequence Detection System (Applied Bio-systems, Foster city, CA,USA)

3.2 Descripción del procedimiento

La conización con asa de diatermia se realizó en la Unidad de Patología del Tracto Genital Inferior de forma ambulatoria, tras infiltración cervical con Mepivacaína al 2%. Para ello, en una visita previa se informó a la paciente de la técnica quirúrgica, obteniendo consentimiento para la misma (documento adjunto en el apartado “anexos”).

La pieza de conización se envió en formol marcando previamente los bordes con tinta china para su estudio al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

Las muestras de polimorfismos de único nucleótido (SNPs) fueron genotipadas mediante el ensayo de discriminación alélica Taqman 5. La PCR y genotipo de cada muestra se atribuyó automáticamente mediante la medición de la fluorescencia alélica específica en el 500-PCR REAL TIME Sequence Detection System usando el software para discriminación alélica SDS 2.2.1 (Applied Bio-Systems, Foster City, CA, USA). Los ensayos de amplificación de SNPs se usaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, 10 ng de la muestra de ADN (1 µl) se colocaron en 4 µl de reactivo que contenía 2,5 µl de Taqman Universal PCR Mix (Applied Bio-Systems) y 1,25 µl de agua destilada.

Las condiciones de la reacción de la PCR fueron: preincubación a 50°C durante dos minutos y a 95°C durante diez minutos, seguido de cuarenta ciclos a 95°C, 15 segundos; 60°C, 1 minuto.

Los polimorfismos estudiados fueron:

- RANTES-403 G/A (rs 2107538) SNP
- MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) SNP
- TNF α -308 A/G (rs 1800629) SNP
- IL1A-889 C/T (rs 1800587) SNP
- NF κ β - 94 ins/del ATTG (rs 28362491) SNP

- MICA
- IFN γ
- IL10 -1082 A/G (rs 1800896) SNP
- IL10- 819 C/T (rs 1800871) SNP
- CTLA-4 CT60G/A (rs 3087243) SNP

En el gen del IFN γ se estudiaron los diferentes polimorfismos determinados por el número de repeticiones de (CA) $_n$ dentro del primer intrón, asociándose el alelo 12 con elevada producción de IFN γ .

En el gen MICA se estudiaron las diferentes repeticiones del triplete (CGT) $_n$ que dan lugar a los polimorfismos A5, A6, A9 y A5.1. El polimorfismo 5.1 sólo codifica una molécula MICA soluble secretada, dando lugar en homocigosis a células desnudas para MICA.

En el resto se estudiaron los polimorfismos en la región promotora que afecta su transcripción. De este modo, en RANTES se estudió el polimorfismo A/G en la región -403 del promotor, el alelo A se asocia a una mayor transcripción.

En TNF α se estudió el polimorfismo G/A de la región -308 del promotor. El alelo A produce una mayor expresión de TNF α .

En NF κ β se estudió el polimorfismo ins/del en la región -94 del promotor. La delección de 4 pares de bases en el promotor del gen da lugar al alelo -94delATTG, que se relaciona con una disminución en la transcripción de NF κ β .

En CTLA-4 se estudió el polimorfismo G/A de la región -CT60, asociándose el alelo A con una disminución de la isoforma soluble de esta molécula.

En MCP-1 se estudió el polimorfismo A/G en la región -2518 del promotor., asociándose el alelo G con una mayor producción.

En IL1A se estudió el polimorfismo C/T en la región -889 del promotor. El alelo T es causante de una mayor expresión de IL1A.

En IL10 se estudiaron los alelos A/G y C/T en las regiones -1082 y -819 respectivamente. El alelo G en la posición 1082 se asocia in vitro con mayor producción de IL10, mientras que el alelo T en la posición 819 se asocia con una menor producción de IL10.

El estudio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias se realizó mediante citometría de flujo, que consiste en el análisis rápido de células en suspensión dentro de un sistema de flujo laminar, sobre el que incide un haz de luz que proporciona información acerca de sus características físico-químicas. Para ello las muestras fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti CD8, anti CD4, anti CD19, anti CD3, anti CD16, anti CXCR3, anti CCR5, anti CCR4, anti CD45RO, anti CD95, anti CD25⁺⁺, anti CD62L, anti CD27, anti CD28, que reconocen moléculas en la superficie de células mediante una técnica de inmunofluorescencia directa.

La fluorescencia fue analizada por un citómetro de flujo FACSort (BD Biosciences Immunocytometry Systems) junto con el software CellQuest.

El anticuerpo anti-CD3 reconoce una molécula de la superficie celular que forma parte del complejo del receptor de células T. Los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 reconocen moléculas de la superficie de una subpoblación de células T que modulan

la respuesta inmune: linfocitos T helper y citotóxicos respectivamente. El anticuerpo anti-CD19 reconoce una molécula de la superficie de las células B y el anti-CD16 una molécula presente en las células NK y neutrófilos.

4 RECOGIDA E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Los datos necesarios para el estudio se extrajeron de las historias clínicas de las pacientes, así como de la base de datos informatizada de la consulta de Patología del Tracto Genital Inferior que emplea el programa FileMaker Pro 5.0 para Windows.

El almacenamiento de los datos y su análisis estadístico se realizó empleando el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows (versión 15.0)

El análisis de datos se ha llevado a cabo en la Unidad de Investigación del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

5 MÉTODO ESTADÍSTICO

Estudio descriptivo de las pacientes: Se han calculado medias y desviaciones típicas, así como medianas, máximo y mínimo para las variables numéricas. Para las variables cualitativas se calcularon frecuencias absolutas y relativas.

La comparación entre variables cualitativas se llevó a cabo mediante el test de Chi cuadrado de Pearson.

La normalidad de los datos cuantitativos se determinó empleando el test de Kolmogorov-Smirnov. La homocedasticidad de los datos fue comprobada mediante el test de Levene.

La comparación de los valores medios de linfocitos en el grupo de pacientes antes y después del tratamiento se llevó a cabo mediante el test t de Student para muestras apareadas. Para la comparación de los valores de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en el momento del tratamiento y a los seis meses con los valores de referencia de los controles se hará con una t de Student para muestras independientes. Igualmente para establecer la relación entre los valores medios de las poblaciones linfocitarias y el grado de lesión cervical y persistencia/recidiva de la lesión tras el tratamiento se utilizó una t de student para muestras independientes.

Para todos los test se asumen diferencias estadísticamente significativas cuando los valores de $p < 0,05$.

6 MÉTODO BIBLIOGRÁFICO

La bibliografía de este trabajo ha sido expuesta por orden de aparición en el texto y expresada en base a los requisitos de uniformidad para manuscritos enviados a revistas biomédicas publicados en 2003.

La documentación bibliográfica se ha obtenido consultado el sistema computerizado Medline con el que se han desarrollado las siguientes búsquedas: cervical cáncer, HPV, regulatory T cells, T lymphocyte subsets, B lymphocyte subsets, CXCR3, CCR5, CCR4, CD45RO, CD95, CD25⁺⁺, CD62L, CD27, CD28, RANTES, IL10-1082, IL10-819, IL1A, TNF, MICA, NF κ β, MCP-1, CTLA-4, IFN polymorphism. También se

han consultado libros específicos sobre los temas tratados. Además se ha consultado la Biblioteca Virtual del Servicio Andaluz del Sistema Sanitario Público de Andalucía (www.sas.junta-andalucia.es/library/).

7 DOCUMENTOS

En anexos se encuentran recogidos los siguientes documentos:

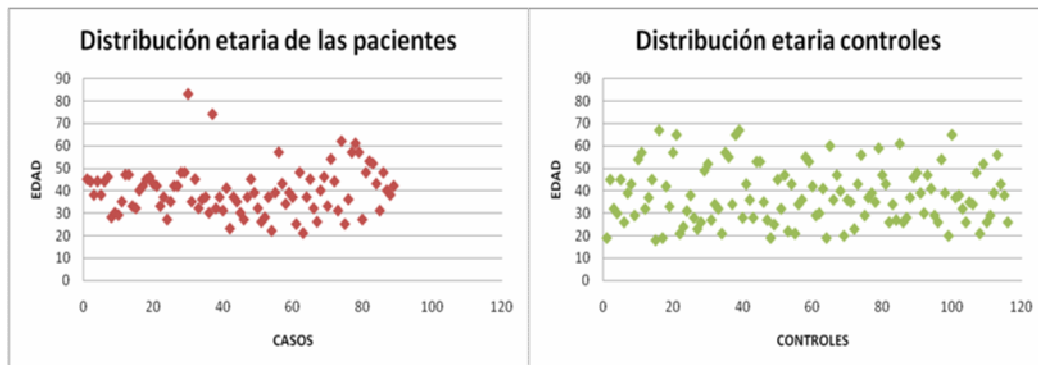
1. Hoja de consentimiento informado para participación en estudio de polimorfismos genéticos.
2. Hoja de consentimiento informado para participación en estudio de poblaciones linfocitarias para pacientes.
3. Hoja de consentimiento informado para participación en estudio de poblaciones linfocitarias para controles sanos.
4. Hoja de consentimiento informado para conización con asa de diatermia.
5. Hoja de la comisión de Investigación del Hospital Universitario “Virgen de las Nieves”.

RESULTADOS

1 CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

1.1 Edad:

FIGURA 5: Distribución por edad del grupo de pacientes y del grupo control



La edad media de las pacientes fue de $39,69 \pm 10,69$ años, con una edad máxima de 83 años y una edad mínima de 21 años. En el grupo control la edad media fue de $37,73 \pm 12,44$ con un rango entre 18 y 67 años ($p=0,23$).

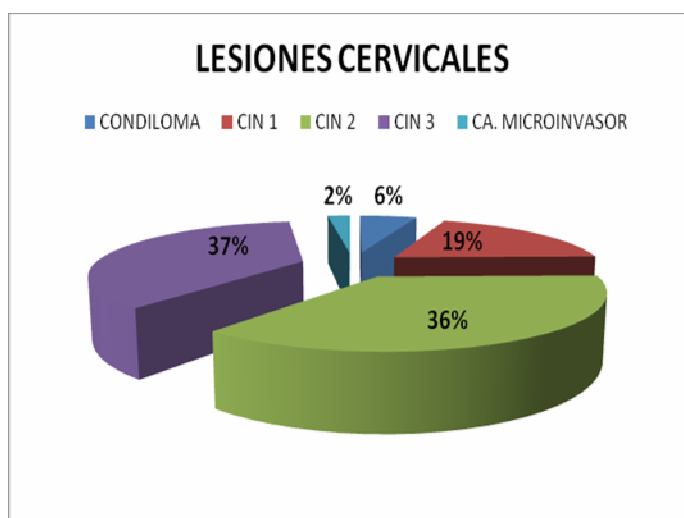
1.2 Grado de lesión cervical:

Las lesiones cervicales tanto de las biopsias como de la pieza de conización fueron clasificadas en función de la gravedad. En aquellas pacientes en las que se asociaron diferentes tipos de lesión, se tuvo en cuenta siempre la de mayor gravedad.

TABLA 9: Grado de lesión cervical en el momento del tratamiento

Lesión cervical	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Condiloma	5	5,6%	5,6%
CIN 1	17	19,1%	24,7%
CIN 2	32	36,0%	60,7%
CIN 3	33	37,1%	97,8%
Ca. Microinvasor	2	2,2%	100,0%
Total	89	100,0%	

FIGURA 6: Grado de lesión cervical en el momento del tratamiento



1.3 Seguimiento:

El tiempo medio de seguimiento de las pacientes fue de 23,21 meses. Con un máximo de 72 meses. Seis de las pacientes no completaron el seguimiento tras el tratamiento. De ellas, cinco no acudieron a revisión tras la escisión con asa de diatermia, de las cuales, en dos casos fue por cambio de domicilio y traslado a otros centros y tres interrumpieron sus revisiones sin previo aviso. La sexta paciente abandonó el seguimiento tras la segunda revisión a los seis meses, sin que hasta ese momento se detectara recidiva ni persistencia de la lesión.

TABLA 10: Tiempo de seguimiento

N	Válidos	89
	Perdidos	0
Media		23,21
Mediana		24,00
Desv. Típica		14,485
Mínimo		0
Máximo		72

1.4 Tasa de recidiva/persistencia de lesiones

La tasa de recidiva se muestra en la tabla 11. Además en las tablas 12, 13 y 14 se relacionó la tasa de recidiva/persistencia de lesiones con la presencia de bordes quirúrgicos afectos en la pieza de conización, el hábito tabáquico y el uso de anticoncepción hormonal. De los 31 casos en los que se detectaron lesiones tras la

conización, en 19 casos éstas aparecieron a lo largo del primer año, no detectándose en ningún caso antes de los tres meses. En el 64,5% de los casos se trató de lesiones de bajo grado; de ellas el 35,5% correspondieron a condilomas en el estudio histológico. Fue necesario un nuevo tratamiento escisional en 9 pacientes, en 4 de las cuales, posteriormente no se hallaron lesiones en la pieza de conización.

TABLA 11: Tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

Recidiva/Persistencia	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos*			
no	52	58,4%	62,7%
si	31	34,8%	37,3%
Total	83	93,3%	100,0%
Perdidos	6	6,7%	
Total	89	100,0%	

*Pacientes que completaron el seguimiento en la Unidad del Tracto Genital Inferior del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

TABLA 12: Tasa de recidiva en función de la afectación de los bordes quirúrgicos de la pieza de conización.

		RECIDIVA		
		si	no	Total
BORDES LIBRES	si	24 (80%)	42 (80,8%)	66 (80,5%)
	no	6 (20%)	10 (19,2%)	16 (19,5%)
Total		30 (100%)	52 (100%)	82 (100%)

$p=0,933$

La prueba de Chi-cuadrado demostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de recidiva entre las pacientes con bordes quirúrgicos afectados en la pieza de conización y aquellas con bordes quirúrgicos libres.

Una paciente fue excluida ya que el informe anatomo-patológico no informó de los bordes por encontrarse muy artefactados.

TABLA 13: Tasa de recidiva en función del hábito tabáquico

		RECIDIVA		
		si	no	Total
TABACO	si	11 (35,5%)	23 (44,2%)	34 (40,9%)
	no	20 (64,5%)	29 (55,8%)	49 (59,1%)
Total		31 (100%)	52 (100%)	83 (100%)

$p= 0,433$

Tampoco se hallaron diferencias significativas en la recidiva de la lesión en función del hábito tabáquico de las pacientes.

TABLA 14: Tasa de recidiva en función la paridad

		RECIDIVA		
		si	No	Total
PARIDAD	si	26 (83,9%)	38 (73,1%)	64 (77,1%)
	no	5 (16,1%)	14 (26,9%)	19 (22,9%)
Total		31 (100%)	52 (100%)	83 (100%)

$p= 0,258$

Tampoco se encontraron diferencias en la frecuencia de recidiva en función de si las pacientes habían tenido algún embarazo a término (77,1%) o eran nulíparas (22,9%).

TABLA 15: Tasa de recidiva en función del uso de anticoncepción hormonal

		RECIDIVA		
		si	no	Total
ACH	si	9 (29,1%)	8 (15,4%)	17 (20,5%)
	no	22 (70,9%)	44 (84,6%)	66 (79,5%)
Total		31 (100%)	52 (100%)	83 (100%)

$p= 0,136$

Por último, tampoco el uso de anticonceptivos hormonales se asoció con diferencias estadísticamente significativas en la tasa de persistencia/recidiva de las lesiones neoplásicas cervicales.

2 DIFERENCIA DE FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN FUNCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO

2.1 Polimorfismos de RANTES-403 G/A (rs 2107538) SNP

TABLA 16: Diferencias en la frecuencia de polimorfismos de RANTES

POLIMORFISMOS	RANTES		
	Casos	Controles	Total
AA	0 (0%)	3 (3,1%)	3 (1,9%)
AG	21 (32,8%)	30 (31,3%)	51(31,9%)
GG	43 (67,2%)	63 (65,6%)	106 (66,3%)
Total	64 (100%)	96(100%)	160 (100%)

p= 0,360

La prueba de Chi-cuadrado demostró que no existían diferencias significativas en la frecuencia de los diferentes polimorfismos genéticos de RANTES entre el grupo de pacientes y el grupo control.

2.2 Polimorfismos de MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) SNP

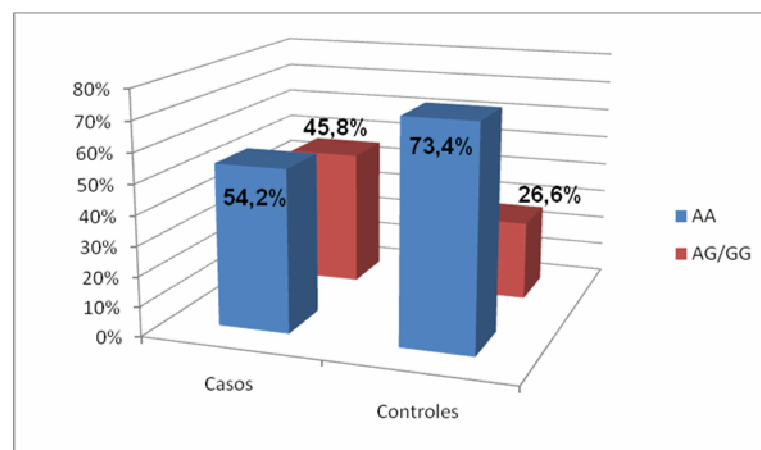
TABLA 17: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de MCP-1

POLIMORFISMOS	MCP-1		
	Casos	Controles	Total
AA	39 (54,2%)	69 (73,4%)	108 (65,1%)
AG	28 (38,9%)	19 (20,2%)	47 (28,3%)
GG	5 (6,9%)	6 (6,4%)	11 (6,6%)
Total	72 (100%)	94 (100%)	166 (100%)

$p=0,025$

El genotipo AG/GG fue más frecuente en las pacientes (45,8% frente a 26,6%). En el grupo control el genotipo mayoritario fue AA siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

FIGURA 7: Polimorfismos MCP-1



$p=0,01$ OR=0,43 (IC 95%:0,22-0,82)

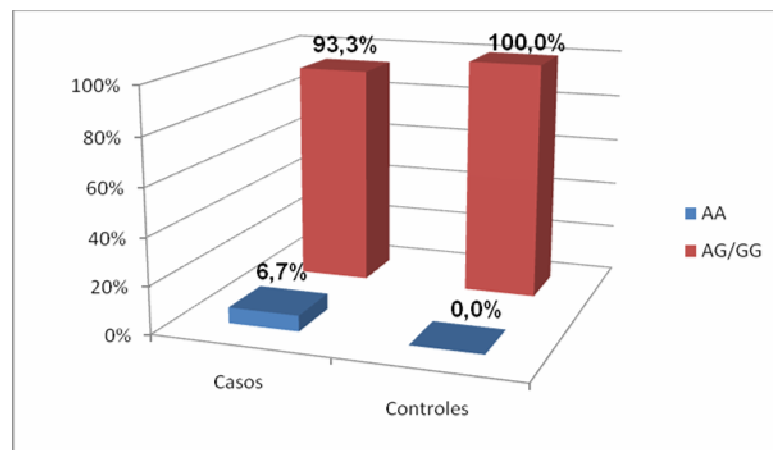
2.3 Polimorfismos de TNF α -308 A/G (rs 1800629) SNP

TABLA 18: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de TNF α

POLIMORFISMOS	TNF α		
	Casos	Controles	Total
AA	5 (6,7%)	0 (0%)	5 (3,1%)
AG	11(14,7%)	21 (23,6%)	32 (19,5%)
GG	59(78,6%)	68 (76,4%)	127 (77,4%)
Total	75(100%)	89 (100%)	164 (100%)

p=0,022

FIGURA 8: Polimorfismos TNF α



p=0,013 OR=2,27 (IC 95%:1,91-2,71)

En virtud de la prueba de Chi-cuadrado se encontró una mayor frecuencia del polimorfismo genético AA en el grupo de pacientes, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p=0,013 OR=2,27 IC 95%:1,91-2,71).

2.4 Polimorfismos de IL1A-889 C/T (rs 1800587) SNP

TABLA 19: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de IL1A

POLIMORFISMOS	IL1A		
	Casos	Controles	Total
CC	35 (49,3%)	53 (55,2%)	88 (52,7%)
CT	30 (42,3%)	38 (39,6%)	68 (40,7%)
TT	6 (8,5%)	5 (8,5%)	11 (6,6%)
Total	71 (100%)	96 (100%)	167 (100%)

$p=0,608$

No se encontraron diferencias en la frecuencia de los diferentes polimorfismos de IL1A, entre casos y controles.

2.5 Polimorfismos de NF κ β - 94 ins/del ATTG (rs 28362491) SNP

TABLA 20: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de NF κ β

POLIMORFISMOS	NF κ β		
	Casos	Controles	Total
del/del	4(5,2%)	8 (10,4%)	12 (7,8%)
del/ins	39(50,6%)	40 (51,9%)	79(51,3%)
ins/ins	34(44,2%)	29(37,7%)	63(40,9%)
Total	77(100%)	77(100%)	154(100%)

$p= 0,418$

Aunque la frecuencia del polimorfismo del/del fue el doble en el grupo control, estas diferencias no fueron significativas.

2.6 Polimorfismos de MICA

No se obtuvieron diferencias significativas para los diferentes polimorfismos de MICA entre las pacientes y los controles, ni siquiera cuando se agruparon éstas en función de si eran portadoras o no del alelo alelo 5.1.

TABLA 21: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de MICA

POLIMORFISMOS	MICA		
	Casos	Controles	Total
Ausencia 5.1	41 (52,6%)	58 (60,4%)	99 (56,9%)
Heterocigoto 5.1	29 (37,2%)	28 (29,2%)	57 (32,8%)
Homocigoto 5.1	8 (10,3%)	10 (10,4%)	18 (10,3%)
Total	78 (100%)	96 (100%)	174 (100%)

p=0,519

2.7 Polimorfismos de IFN γ

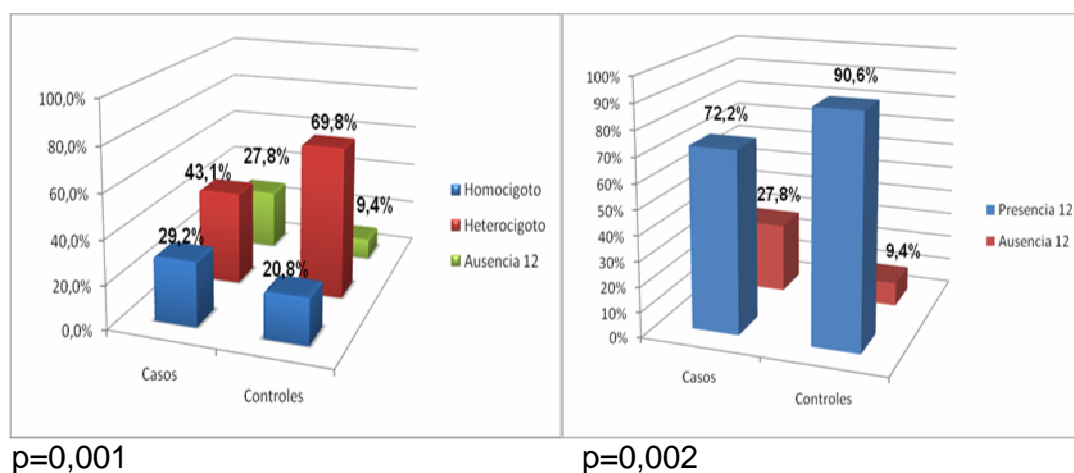
Se encontraron diferencias significativas, cuando se agruparon en función del alelo 12 del IFN γ (alto productor): homocigotos para el alelo 12, heterocigotos para alelo 12 y aquellos que no portan el alelo 12. La ausencia de este alelo, fue superior en el grupo de pacientes, siendo la proporción de heterocigotos inferior a la del grupo control. Estas diferencias fueron más evidentes si se agrupan en una tabla 2x2 en función de la presencia o ausencia de un alelo alto productor (alelo12).

TABLA 22: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de IFN γ

POLIMORFISMOS	IFN γ		
	Caso	Control	Total
Homocigoto	21 (29,2%)	20(20,8%)	41 (24,4%)
Heterocigoto	31(43,1%)	67(69,8%)	98 (58,3%)
Ausencia 12	20(27,8%)	9(9,4%)	29 (17,3%)
Total	72(100%)	96(100%)	168 (100%)

$p=0,001$

FIGURA 9: Polimorfismos IFN γ



Al comparar en ambos grupos los diferentes polimorfismos se observó como la proporción de heterocigotos es claramente superior en el grupo de controles sanos ($p=0,001$), mientras que en las pacientes destaca una mayor frecuencia en la ausencia de alelo 12 ($p=0,002$).

2.8 Polimorfismos de IL10 -1082 A/G (rs 1800896) SNP

Los polimorfismos de IL10-1082 se distribuyeron de forma similar tanto en las pacientes como en el grupo control

TABLA 23: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de IL10-1082

IL10.1082	POLIMORFISMOS		
	Casos	Controles	Total
AA	35 (46,7%)	41 (43,2%)	76 (44,7%)
AG	34 (45,3%)	40 (42,1%)	74 (43,5%)
GG	6 (8%)	14 (14,7%)	20 (11,8%)
Total	75 (100%)	95 (95%)	170 (100%)

$p=0,4$

2.9 Polimorfismos de IL10- 819 C/T (rs 1800871) SNP

TABLA 24: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de IL10-819

IL10.819	POLIMORFISMOS		
	Casos	Controles	Total
CC	37 (49,3%)	48 (50,5%)	85 (50%)
CT	32 (42,7%)	39 (41,1%)	71 (41,8%)
TT	6 (8%)	8 (8,4%)	14 (8,2%)
Total	75 (100%)	95 (100%)	170 (100%)

$p=0,977$

Por último, tampoco obtuvimos diferencias en la frecuencia de los diferentes polimorfismos del gen que codifica para IL10-819.

2.10 Polimorfismos de CTLA-4 A/G (rs 3087243) SNP

TABLA 25: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de CTLA-4

POLIMORFISMOS	CTLA-4		
	Casos	Controles	Total
AA	9 (17%)	29 (30,5%)	38 (25,7%)
AG	32 (60,4%)	44 (46,3%)	76 (51,4%)
GG	12 (22,6%)	22 (23,2%)	34 (23%)
Total	53 (100%)	95 (100%)	148 (100%)

p=0,154

El polimorfismo AA del gen que codifica CTLA-4 fue más frecuente en el grupo control, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas cuando se agruparon a las pacientes y a las componentes del grupo control en función de si eran portadoras del alelo G o no, aunque hubo tendencia a la significación (tabla 26).

TABLA 26: Diferencia de frecuencias de alelo G de CTLA-4

POLIMORFISMOS	CTLA-4		
	Casos	Controles	Total
AA	9 (17%)	29 (30,5%)	38 (25,7%)
AG/GG	44 (83%)	66 (69,5%)	110 (74,3%)
Total	53 (100%)	95 (100%)	148 (100%)

p=0,071

3 RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y GRADO DE LESIÓN CERVICAL

El test de Chi-cuadrado únicamente mostró asociación entre el grado de lesión cervical y los diferentes polimorfismos del gen de MCP-1, al agrupar a las pacientes en homocigotas para el alelo A y en portadoras del alelo G.

3.1 Polimorfismos de RANTES-403 G/A (rs 2107538) SNP y lesión cervical

TABLA 27: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de RANTES-403

RANTES	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo Grado	Alto Grado	Total
AG	5(29,4%)	16(34%)	21 (32,8%)
GG	12(70,6%)	31(66%)	43 (67,2%)
Total	17 (100%)	47 (100%)	64 (100%)

p=0,727

No encontramos relación entre el grado de lesión cervical y la frecuencia de polimorfismos genéticos de RANTES.

3.2 Polimorfismos de MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) SNP y lesión cervical

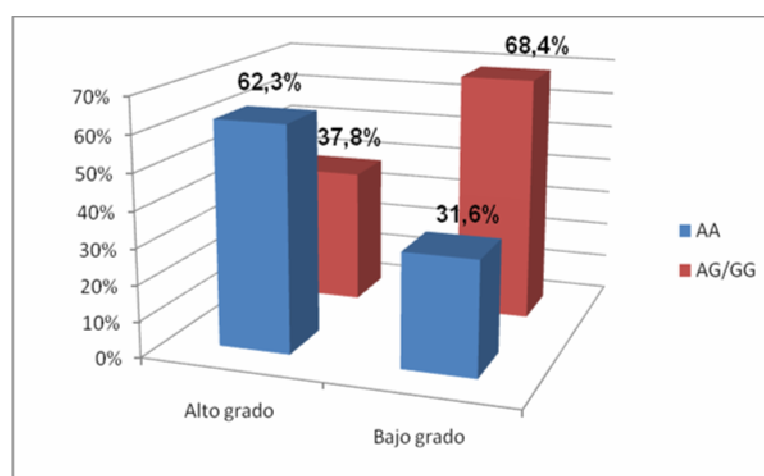
El genotipo AA se encontró con mayor frecuencia (62,3%) en pacientes con lesiones de alto grado, frente a aquellas que presentaron lesiones cervicales de bajo grado, que presentaron una frecuencia del 31,6% [$p=0,021$ OR: :3,58 (IC 95% 1,17-10,91)].

TABLA 28:Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de MCP-1

MCP-1	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
AA	6 (31,6%)	33 (62,3%)	39 (54,2%)
AG	11 (57,9%)	17 (32,1%)	28 (38,9%)
GG	2(10,5%)	3 (5,7%)	5 (6,9%)
Total	19 (100%)	53 (100%)	72 (100%)

$p= 0,070$

FIGURA 10: Polimorfismos MCP-1 y grado lesión cervical



$p=0,021$ OR:3,58 (IC 95% 1,17-10,91)

3.3 Polimorfismos de TNF α -308 A/G (rs 1800629) SNP y lesión cervical

TABLA 29: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de TNF α

TNF α	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo Grado	Alto Grado	Total
AA	1 (5,3%)	4 (7,1%)	5 (6,7%)
AG	2 (10,5%)	9 (16,1%)	11 (14,7%)
GG	16 (84,2%)	43 (76,8%)	59 (78,7%)
Total	19 (100%)	56 (100%)	75 (100%)

$p= 0,790$

TABLA 30: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos agrupados de TNF α

TNF α	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
AA/AG	3 (15,8%)	13 (23,2%)	16 (21,4%)
GG	16 (84,2%)	43 (76,8%)	59 (78,7%)
Total	19 (100%)	56 (100%)	75 (100%)

$p=0,495$

3.4 Polimorfismos de IL1A-889 C/T (rs 1800587) SNP y lesión cervical

TABLA 31: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de IL1A-889

IL1A	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
CC	9 (50%)	26 (49,1%)	35 (49,3%)
CT	7 (38,9%)	23 (43,4%)	30 (42,3%)
TT	2 (11,1%)	4 (7,5%)	6 (8,5%)
Total	18 (100%)	53 (100%)	71 (100%)

p= 0,874

3.5 Polimorfismos de NFκβ-94 ins/del ATTG (rs 28362491) SNP y lesión cervical

TABLA 32: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de NFκβ

NFκβ	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
del/del	0 (0%)	4 (6,8%)	4 (5,2%)
del/ins	8 (44,4%)	31 (52,5%)	39 (50,6%)
ins/ins	10 (55,6%)	24 (40,7%)	34 (44,2%)
Total	18 (100%)	59 (100%)	77 (100%)

p= 0,352

3.6 Polimorfismos de MICA y lesión cervical

TABLA 33: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de MICA

MICA	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
Ausencia 5.1	9 (47,4%)	32 (54,2%)	41 (52,6%)
Heterocigoto	8 (42,1%)	21 (35,6%)	29 (37,2%)
Homocigoto	2 (10,5%)	6 (10,2%)	8 (10,3%)
Total	19 (100%)	59 (100%)	78 (100%)

$p= 0,863$

3.7 Polimorfismos de IFN γ y lesión cervical

TABLA 34: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de IFN γ

IFN γ	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
Homocigoto	6(37,5%)	15 (26,8%)	21 (29,2%)
Heterocigoto	8(50%)	23(41,1%)	31 (43,1%)
Ausencia 12	2(12,5%)	18(32,1%)	20 (27,7%)
Total	16 (100%)	56 (100%)	72 (100%)

$p=0,294$

Aunque se observa una mayor proporción de ausencia de alelo 12 en lesiones de alto grado, no se observaron diferencias significativas en el grado de lesión cervical en función de los alelos del IFN γ , ni siquiera cuando se agruparon en función de la presencia o no de alelo 12.

3.8 Polimorfismos de IL10-1082 A/G (rs 1800896) SNP y lesión cervical

TABLA 35: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de IL10-1082

IL10.1082	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
AA	11 (57,9%)	24 (42,9%)	35 (46,7%)
AG	7(36,8%)	27 (48,2%)	34 (45,3%)
GG	1 (5,3%)	5 (8,9%)	6 (8%)
Total	19 (100%)	56 (100%)	75 (100%)

$p=0,514$

3.9 Polimorfismos de de IL10-819 C/T (rs 1800871) SNP y lesión cervical

TABLA 36: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de IL10-819

IL10.819	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
CC	8 (42,1%)	29 (51,8%)	37 (49,3%)
CT	10 (52,6%)	22 (39,3%)	32 (42,7%)
TT	1 (5,3%)	5 (8,9%)	6 (8%)
Total	19 (100%)	56 (100%)	75 (100%)

$p=0,577$

3.10 Polimorfismos de CTLA-4 A/G (rs 3087243) SNP y lesión cervical

TABLA 37: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de CTLA-4

CTLA-4	GRADO LESIÓN CERVICAL		
	Bajo grado	Alto grado	Total
AA	2 (14,3%)	7 (17,9%)	9 (17%)
AG	10 (71,4%)	22 (56,4%)	32 (60,4%)
GG	2 (14,3%)	10 (25,6%)	12 (22,6%)
Total	14 (100%)	39 (100%)	53 (100%)

$p = 0,591$

4 RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y RECIDIVA/PERSISTENCIA DE LESIONES

No se observaron diferencias entre la tasa de recidiva/persistencia de lesiones tras el tratamiento con asa de diatermia y la frecuencia de cada polimorfismo genético.

4.1 Polimorfismos de RANTES-403 G/A (rs 2107538) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 38: Correlación entre polimorfismos de RANTES-403 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

RANTES	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
AG	4 (20%)	15 (38,5%)	19 (32,2%)
GG	16 (80%)	24 (61,5%)	40 (67,8%)
Total	20 (100%)	39 (100%)	59 (100%)

$p= 0,151$

4.2 Polimorfismos de MCP-1 2518 G/A (rs 1024611) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 39: Correlación entre polimorfismos de MCP-1 2518 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

MCP-1	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
AA	13 (56,5%)	25 (56,8%)	38 (56,7%)
AG	10 (43,5%)	15 (34,1%)	25 (37,3%)
GG	0 (0%)	4 (9,1%)	4 (6%)
Total	23 (100%)	44 (100%)	67 (100%)

$p= 0,294$

4.3 Polimorfismos de TNF-308 A/G (rs 1800629) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 40: Correlación entre polimorfismos de TNF α -308 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

TNF α	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
AA	1 (4,5%)	4 (8,5%)	5 (7,2%)
AG	2 (9,1%)	8 (17%)	10 (14,5%)
GG	19 (86,4%)	35	54 (78,3%)
Total	22 (100%)	47	69 (100%)

$p= 0,536$

4.4 Polimorfismos de IL1A-889 C/T (rs 1800587) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 41: Correlación entre polimorfismos de IL1A-889 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

IL1A	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
CC	11 (57,9%)	21 (45,7%)	32 (49,2%)
CT	6 (31,6%)	21 (45,7%)	27 (41,5%)
TT	2 (10,5%)	4 (8,7%)	6 (9,2%)
Total	19 (100%)	46 (100%)	65 (100%)

$p= 0,577$

4.5 Polimorfismos de NFκβ-94 ins/del ATTG (rs 28362491) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 42: Correlación entre polimorfismos de NFκβ y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

NFκβ	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
del/del	2 (8%)	2 (4,3%)	4 (5,6%)
del/ins	10 (40%)	25 (54,3%)	35 (49,3%)
ins/ins	13 (52%)	19 (41,3%)	32 (45,1%)
Total	25 (100%)	46 (100%)	71 (100%)

p=0,479

4.6 Polimorfismos de MICA y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 43: Correlación entre polimorfismos de MICA y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

MICA	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
Ausencia 5.1	17 (68%)	22 (46,8%)	39 (54,2%)
Heterocigoto	6 (24%)	19 (40,4%)	25 (34,7%)
Homocigoto	2 (8%)	6 (12,8%)	8 (11,1%)
Total	25 (100%)	47 (100%)	72 (100%)

p= 0,228

TABLA 44: Correlación entre polimorfismos agrupados de MICA y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

MICA AGRUPADO	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
Ausencia 5.1	17 (68%)	22 (46,8%)	39 (54,2%)
Portador 5.1	8 (32%)	25 (53,2%)	33 (45,8%)
Total	25 (100%)	47 (100%)	72 (100%)

$p=0,860$

4.7 Polimorfismos de IFN γ y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 45: Correlación entre polimorfismos de IFN γ y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

IFN γ	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
Homocigoto	7 (29,2%)	14 (32,6%)	21 (31,3%)
Heterocigoto	11 (45,8%)	18 (41,9%)	29 (43,3%)
Ausencia 12	6 (25%)	11 (25,6%)	17 (25,4%)
Total	24 (100%)	43 (100%)	67 (100%)

$p= 0,944$

4.8 Polimorfismos de IL10-1082 A/G (rs 1800896) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 46: Correlación entre polimorfismos de IL10-1082 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

IL10.1082	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
AA	11 (47,8%)	21 (45,7%)	32 (46,4%)
AG	9 (39,1%)	22 (47,8%)	31 (44,9%)
GG	3 (13%)	3 (6,5%)	6 (8,7%)
Total	23 (100%)	46 (100%)	69 (100%)

$p= 0,599$

4.9 Polimorfismos de de IL10-819 C/T (rs 1800871) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 47: Correlación entre polimorfismos de IL10-819 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

IL10.819	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
CC	11 (50%)	24 (51,1%)	35 (50,7%)
CT	10 (45,5%)	18 (38,3%)	28 (40,6%)
TT	1 (4,5%)	5 (10,6%)	6 (8,7%)
Total	22 (100%)	47 (100%)	69 (100%)

$p= 0,660$

4.10 Polimorfismos de CTLA 4 A/G (rs 3087243) SNP y recidiva/persistencia de lesión cervical

TABLA 48: Correlación entre polimorfismos de CTLA 4 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical

CTLA4	RECIDIVA/PERSISTENCIA		
	si	no	Total
AA	4 (23,5%)	4 (11,8%)	8 (15,7%)
AG	10 (58,8%)	21 (61,8%)	31 (60,8%)
GG	3 (17,6%)	9 (26,5%)	12 (23,5%)
Total	17 (100%)	34 (100%)	51 (100%)

p= 0,499

5 DIFERENCIAS EN SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN FUNCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO

TABLA 49: Diferencias en subpoblaciones linfocitarias entre pacientes en el momento del LEEP y controles

Poblaciones linfocitarias		Media	Desv. típica	p
CD4	caso	46,03	11,84	0,88
	control	45,66	8,53	
CD8	caso	23,88	12,47	0,78
	control	23,23	6,15	
CD3	caso	74,82	9,03	0,15
	control	72,05	7,26	
CD19	caso	12,03	6,01	0,86
	control	12,25	4,91	
NK	caso	12,29	6,58	0,15
	control	14,27	7,15	
CD4 ⁺ /CXCR3 ⁺	caso	40,07	15,37	0,04
	control	34,67	8,34	
CD4 ⁺ /CCR5 ⁺	caso	19,45	12,87	0,47
	control	17,63	6,44	
CD4 ⁺ /CCR4 ⁺	caso	25,58	12,22	0,46
	control	23,83	6,83	
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺	caso	67,04	13,77	0,86
	control	66,53	11,41	
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	caso	59,19	17,13	0,25
	control	55,22	11,83	
CD4 ⁺ /CD25 ⁺⁺	caso	5,57	2,45	0,47
	control	6,02	2,41	
CD4 ⁺ /CD62L ⁺	caso	36,58	19,97	<0,01
	control	74,15	8,41	
CD4 ⁺ /CD27 ⁺	caso	14,70	16,70	0,10
	control	9,17	7,11	
CD4 ⁺ /CD28 ⁺	caso	8,25	12,94	0,20
	control	4,24	7,22	
CD8 ⁺ /CD45RO ⁺	caso	48,11	16,25	0,54
	control	45,97	13,95	
CD8 ⁺ /CD95 ⁺	caso	56,51	20,67	0,65
	control	54,56	14,80	
CD8 ⁺ /CD27 ⁺	caso	26,88	14,71	0,57
	control	24,62	12,95	
CD8 ⁺ /CD28 ⁺	caso	33,97	19,39	0,17
	control	26,96	13,39	

La t de Student para muestras independientes mostró diferencias significativas en el subgrupo de linfocitos $CD4^+/CXCR3^+$, cuyos niveles medios fueron más elevados en el grupo de pacientes (40,07 frente a 34,67), y en $CD4^+/CD62L^+$ donde la media de los valores fue más del doble en el grupo control con respecto a los casos (74,15 frente a 36,58).

FIGURA 11: Expresión de $CD4^+/CD62L^{+++}/CCR7^+$ en grupo control. La mayoría de las células en sangre periférica del grupo control presentan el fenotipo virgen, $CD4^+/CD62L^{+++}/CCR7^+$

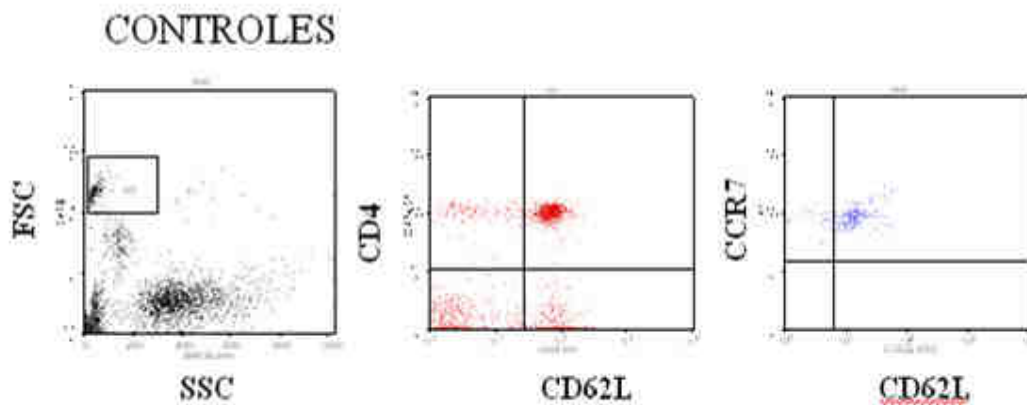


FIGURA 12: Expresión de CD4⁺/CD62L^{+/-} en pacientes. La mayoría de las células en sangre periférica del grupo de pacientes presentan el fenotipo CD4⁺/CD62L^{+/-}.

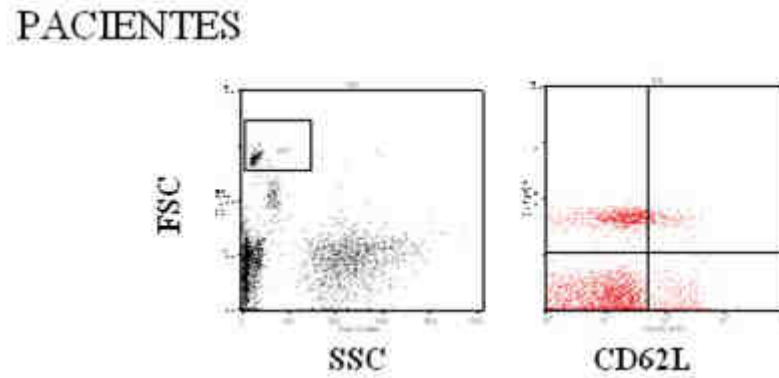


FIGURA 13: Presencia de células con fenotipo Th1 en pacientes y controles. La proporción de células CD4⁺/CXCR3⁺/CCR5⁺ fue superior en el grupo de pacientes.

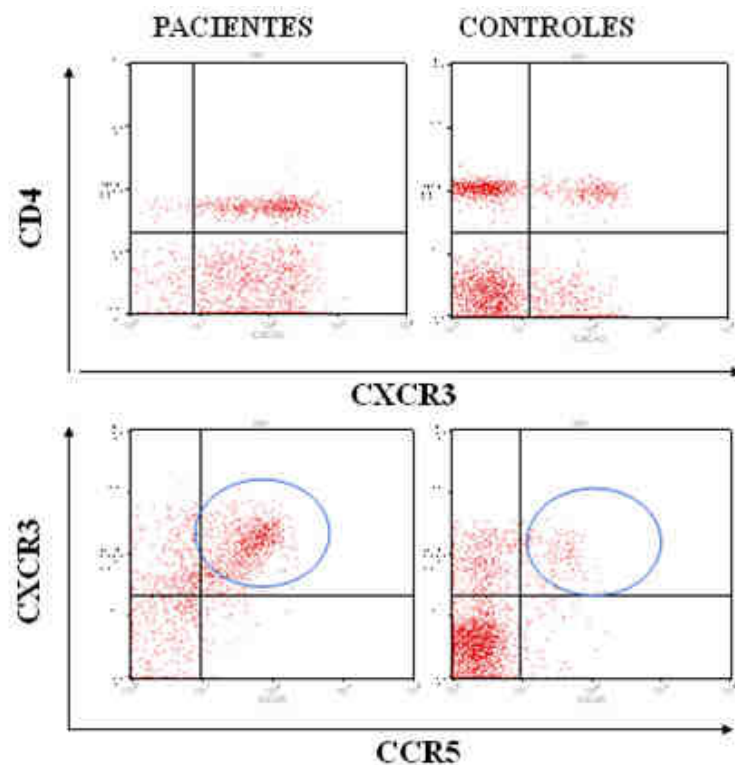


TABLA 50: Diferencias en subpoblaciones linfocitarias entre pacientes a los seis meses del LEEP y controles

Poblaciones linfocitarias		Media	Desviación típ.	p
CD4	caso	46,30	11,04	0,78
	control	45,66	8,53	
CD8	caso	24,35	10,32	0,58
	control	23,23	6,15	
CD3	caso	74,72	7,82	0,13
	control	72,05	7,26	
CD19	caso	13,99	6,37	0,21
	control	12,25	4,91	
NK	caso	11,08	5,28	0,03
	control	14,27	7,15	
CD4 ⁺ /CXCR3 ⁺	caso	39,51	11,94	0,05
	control	34,67	8,34	
CD4 ⁺ /CCR5 ⁺	caso	19,06	11,49	0,54
	control	17,63	6,44	
CD4 ⁺ /CCR4 ⁺	caso	26,73	7,39	0,08
	control	23,83	6,83	
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺	caso	67,03	14,45	0,87
	control	66,53	11,42	
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	caso	57,96	14,97	0,41
	control	55,22	11,83	
CD4 ⁺ /CD25 ⁺⁺	caso	7,38	3,39	0,04
	control	6,02	2,41	
CD4 ⁺ /CD62L ⁺	caso	53,20	24,70	<0,01
	control	74,15	8,41	
CD4 ⁺ /CD27 ⁺	caso	12,13	10,83	0,19
	control	9,17	7,11	
CD4 ⁺ /CD28 ⁺	caso	7,49	12,02	0,24
	control	4,24	7,22	
CD8 ⁺ /CD45RO ⁺	caso	51,32	15,69	0,13
	control	45,97	13,95	
CD8 ⁺ /CD95 ⁺	caso	53,05	16,86	0,69
	control	54,56	14,80	
CD8 ⁺ /CD27 ⁺	caso	27,80	16,69	0,38
	control	24,62	12,95	
CD8 ⁺ /CD28 ⁺	caso	33,44	18,90	0,15
	control	26,96	13,39	

Se observan diferencias en las poblaciones linfocitarias CD4CD25⁺⁺, donde los valores promedio de los casos fueron mayores, en las células NK, donde el promedio en las pacientes fue menor que en controles sanos y en CD4⁺/CD62L⁺, donde al igual que en la tabla 46 se observan niveles más elevados en los controles, aunque estas diferencias disminuyeron considerablemente.

En CD4⁺/CXCR3⁺ se observó una tendencia a la significación, siendo los niveles mayores para las pacientes que en el grupo control.

6 EVOLUCIÓN DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS TRAS TRATAMIENTO DE NEOPLASIA CERVICAL INTRAEPITELIAL

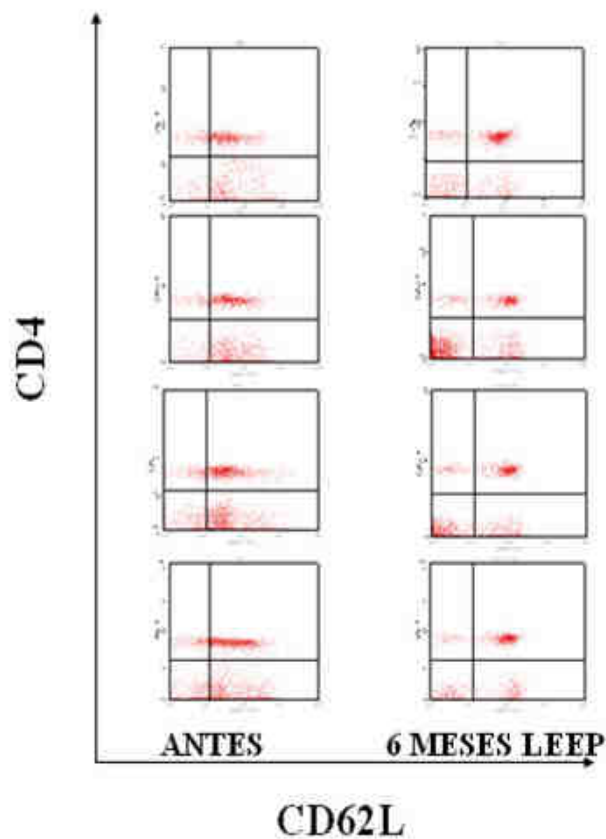
TABLA 51: Diferencia entre los valores medios de las diferentes poblaciones linfocitarias en el momento del LEEP y a los seis meses del mismo.

Poblaciones linfocitarias	Media LEEP	Media 6	Diferencia medias	Desviación típica	95% Intervalo de		p
					Inferior	Superior	
CD4	46,37	46,30	0,07	6,64	-1,86	2,00	0,94
CD8	24,06	24,35	-0,29	4,60	-1,64	1,06	0,67
CD3	75,32	74,72	0,60	6,83	-1,38	2,59	0,54
CD19	11,69	13,99	-2,30	5,35	-3,86	-0,75	<0,01
NK	11,98	11,08	0,90	4,73	-0,48	2,27	0,20
CD4 ⁺ /CXCR3 ⁺	39,00	39,47	-0,47	9,46	-3,38	2,44	0,75
CD4 ⁺ /CCR5 ⁺	18,97	18,96	0,01	5,22	-1,60	1,62	0,99
CD4 ⁺ /CCR4 ⁺	25,69	26,17	-0,48	12,98	-4,53	3,57	0,81
CD4 ⁺ /CD45RO ⁺	66,94	67,03	-0,09	12,39	-3,85	3,68	0,96
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	58,02	57,34	0,68	10,81	-3,09	4,45	0,72
CD4 ⁺ /CD25 ⁺⁺	5,74	7,78	-2,04	3,30	-3,43	-0,64	<0,01
CD4 ⁺ /CD62L ⁺	35,59	65,99	-30,40	32,85	-44,27	-16,53	<0,01
CD4 ⁺ /CD27 ⁺	14,78	15,04	-0,26	13,90	-7,41	6,89	0,94
CD4 ⁺ /CD28 ⁺	8,23	11,59	-3,36	14,44	-10,79	4,06	0,35
CD8 ⁺ /CD45RO ⁺	47,22	51,05	-3,83	14,87	-8,41	0,74	0,09
CD8 ⁺ /CD95 ⁺	52,59	51,95	0,64	16,77	-5,03	6,32	0,82
CD8 ⁺ /CD27 ⁺	28,06	28,82	-0,76	7,00	-4,36	2,84	0,66
CD8 ⁺ /CD28 ⁺	37,24	38,74	-1,50	10,82	-7,26	4,26	0,59

En la tabla anterior observamos como la media de las diferentes poblaciones varía en ocasiones con respecto a las tablas 46 y 47. Esto es debido a que en el estudio de la diferencia de poblaciones linfocitarias en el momento del LEEP y a los seis meses, sólo se tuvieron en cuenta a las pacientes en las que se registraron ambos

valores para cada fenotipo, excluyéndose los casos en los que faltaba alguna de las determinaciones.

FIGURA 14: Expresión de CD62L sobre la población CD4



La mayoría de las células CD4 en la sangre periférica de mujeres sanas presentaron una expresión brillante de CD62L⁺⁺⁺, que es compatible con un fenotipo CD4 virgen. Por el contrario las pacientes expresaron en menor proporción CD62L compatible con células que han sido estimuladas y que se han diferenciado, mientras que a los seis meses de la escisión de las lesiones cervicales, la proporción de células CD4⁺/CD62L⁺, incrementa notablemente.

La t de Student para muestras apareadas, mostró diferencias significativas en los valores de linfocitos CD19⁺, CD4⁺/CD25⁺⁺, CD4⁺/CD62L⁺ y diferencias cercanas a la significación para CD8⁺/CD45RO⁺. En todos los casos, se produjo un incremento en la media de los valores a los seis meses, siendo especialmente importante para CD4⁺/CD62L⁺.

7 POBLACIONES LINFOCITARIAS, LESIÓN EN EL MOMENTO DEL LEEP Y RECIDIVA/PERSISTENCIA DE LESIÓN

7.1 Poblaciones linfocitarias y grado de lesión

La t de Student para muestras independientes mostró diferencias significativas en CD19 al comparar los valores en las pacientes con lesiones condilomatosas en el momento del LEEP y aquellas que presentaron CIN 1,2 y 3.

TABLA 52: Diferencias de CD19 en función del grado de lesión cervical

Población	Lesión	Media	Desv. típica	P*
CD19	condiloma	31,30	-	
CD19	CIN 1	10,24	5,93	<0,01
CD19	CIN 2	13,05	6,78	0,02
CD19	CIN 3	11,42	3,65	<0,01

*Comparando la frecuencia de CD19 en pacientes con condilomas

Además se encontraron diferencias significativas en CD4CD95 al comparar las pacientes con CIN 1 y CIN 3 ($p < 0,01$), existiendo una tendencia a la significación al

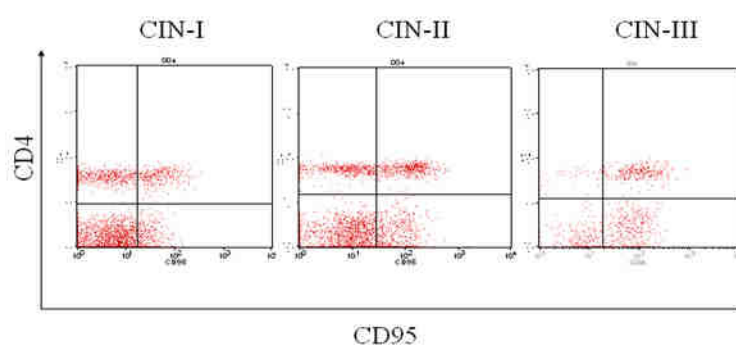
comparar los valores de esta población de linfocitos en las pacientes con CIN 1 y CIN 2 ($p=0,056$) en el momento de la conización.

TABLA 53: Diferencias de CD4⁺/CD95⁺ en función del grado de lesión cervical

Población	Lesión	Media	Desv. típica	p*
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	condiloma	55,90	-	0,633
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	CIN 1	47,50	16,42	
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	CIN 2	60,31	17,36	0,056
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	CIN 3	65,11	14,95	<0,01

*Comparando el valor de CD4⁺/CD95⁺ entre las pacientes con CIN 1 y el resto

FIGURA 15: Expresión de FAS (CD95) en pacientes con distintas lesiones.

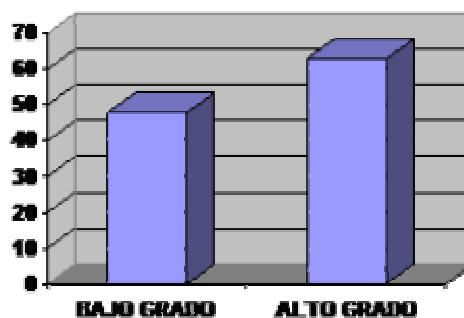


La proporción de células pre-apoptóticas aumenta en función del tipo de lesión. Esto mismo pudo observarse cuando se agruparon las lesiones en lesiones de bajo grado y alto grado, donde igualmente, se encontraron diferencias significativas en el subgrupo de linfocitos CD4⁺/CD95⁺.

TABLA 54: Diferencias de CD4⁺/CD95⁺ en función del grado de lesión cervical
(2)

Población	Lesión	Media	Desviación	p
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	Bajo grado	48,15	15,89	<0,01
CD4 ⁺ /CD95 ⁺	Alto grado	62,96	16,03	

FIGURA 16: Expresión de FAS (CD95) en pacientes con lesiones de alto y bajo grado



7.2 Poblaciones linfocitarias en el momento del LEEP y a los seis meses y recidiva/persistencia de lesiones

Se encontró relación con la recidiva y la subpoblación de linfocitos CD4⁺/CXCR3⁺, observándose unos valores medios mayores en las pacientes con persistencia o reaparición de lesiones. Además también se encontraron unos valores medios de linfocitos CD4⁺/CD62L⁺ significativamente mayores a los seis meses del tratamiento en las pacientes que no presentaron lesiones persistentes o recidiva a lo largo del tiempo de seguimiento.

TABLA 55: Poblaciones linfocitarias y persistencia y recidiva de lesiones.

Población	Recidiva	Media	Desviación	p
CD4 ⁺ /CXCR3 ⁺	no	35,80	15,82	0,03
	si	45,18	13,67	
CD4 ⁺ /CXCR3 ⁺ (6 meses)	no	35,42	11,11	0,01
	si	44,10	10,78	
CD4 ⁺ /CD62L ⁺	no	82,95	9,77	0,007
	si	48,44	26,57	

FIGURA 17: Expresión de CXCR3 sobre linfocitos T CD4. La proporción de estas células (Th1) es superior en pacientes que mantienen las lesiones o han recidivado (izquierda), P<0,01

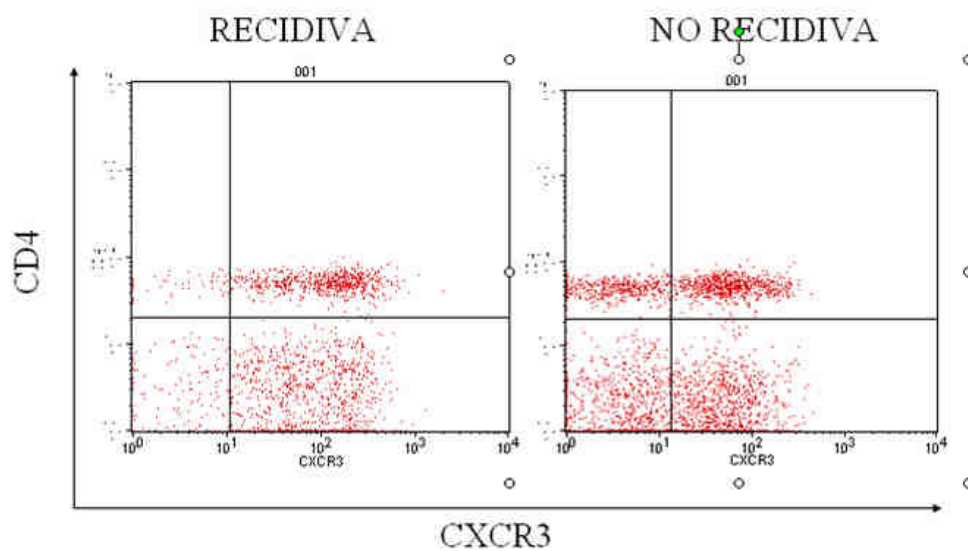


FIGURA 18: Expresión de CD62L sobre la población CD4. La expresión de CD62L, baja en condiciones basales en las pacientes, difiere de la obtenida tras la intervención en pacientes en las que no reaparecen las lesiones. Este patrón de expresión (derecha) es compatible con la falta de un estímulo antigénico en el que la mayoría de las células tienen un fenotipo virgen.

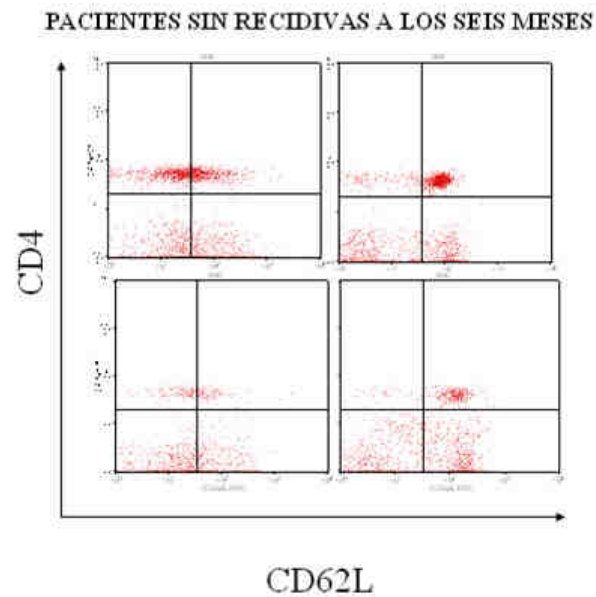
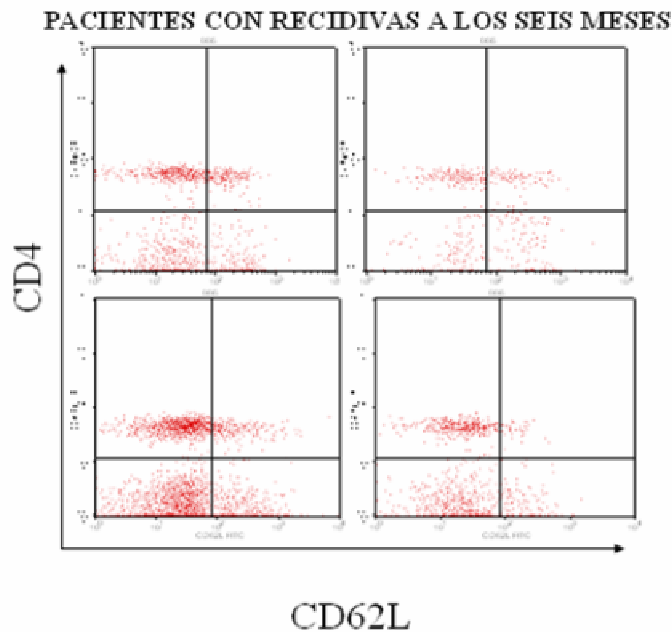


FIGURA 19: Expresión de CD62L sobre la población CD4. La expresión de CD62L, baja, se mantiene a los seis meses del LEEP en aquellas pacientes en las que se detectan nuevamente lesiones cervicales. Este patrón de expresión es compatible con la persistencia de un estímulo antigénico.



Por tanto, hemos encontrado diferencias significativas en pacientes que muestran recidiva. En términos generales, estas diferencias establecen que en las pacientes, en las que persiste un estímulo crónico por el VPH, la proporción de células con fenotipo efector/memoria se mantiene, como lo demuestra la baja expresión de CD62L y la mayor presencia de células con fenotipo Th1 (CD4+/CXCR3+). Es llamativo el cambio de expresión de CD62L que pasa de ser bajo a ser elevado en pacientes que no presentaron recidivas, siendo superponible con la expresión de este marcador en el grupo control (FIGURAS 11, 18).

Por otra parte, se quiso comprobar si la probabilidad de la recidiva de lesiones era diferente en función de si las poblaciones linfocitarias experimentaban un incremento o disminución a los seis meses del tratamiento, independientemente de los valores.

Se observaron diferencias significativas nuevamente para CD4⁺/CD62L⁺, donde observamos un riesgo de persistencia/recidiva de lesiones 4 veces superior a aquellas pacientes en las que los valores de dicha población linfocitaria incrementan a los seis meses, aproximándose al patrón descrito en la población control.

TABLA 56: Persistencia/recidiva de lesiones en función del incremento-disminución CD4⁺/CD62L⁺

CD4 ⁺ /CD62L ⁺	Recidiva		
	Si	No	Total
No incremento	5 62,5%	0 0%	5 29,4%
Incremento	3 37,5%	9 100%	12 70,6%
Total	8 100%	9 100%	36 100,0%

p=0,005 RR no incremento=4 (IC 95% 1,501-10,658)

Además se objetivan diferencias muy cercanas a la significación en CD4CCR4, donde la persistencia y recidiva de lesiones fue mayor en los casos en los que se produjo una disminución de CD4CCR4, por lo que la elevación de sus niveles resulta un factor protector frente a la enfermedad.

TABLA 57: Persistencia/recidiva de lesiones en función del incremento-disminución CD4⁺/CCR4⁺

CD4 ⁺ /CCR4 ⁺	Recidiva		Total
	Si	No	
Incremento	2 14,3%	10 45,5%	12 33,3%
No incremento	12 85,7%	12 54,5%	24 66,7%
Total	14 100%	22 100%	36 100,0%

p= 0,05 RR incremento= 0,2 (IC 95% 0,360-1,113)

DISCUSIÓN

Uno de los grandes descubrimientos en la investigación etiológica del cáncer ha sido la demostración de que el cáncer de cérvix está causado por la infección persistente de determinados genotipos del VPH. El hecho de que se trate de una enfermedad venérea muy frecuente, ya que en las edades de mayor actividad sexual su prevalencia alcanza hasta el 40% de la población femenina, y que se haya establecido que se trata de una causa necesaria para el desarrollo de cáncer de cuello uterino hacen de esta infección un importante problema de salud en la mujer.

El cáncer de cuello de útero es el segundo más frecuente entre las mujeres de todo el mundo, con una estimación de más de 490.000 nuevos casos al año y más de 270.000 muertes al año. En general, las tasas más bajas se detectan en Europa, Norteamérica y Japón, donde además encontramos unas tasas de supervivencia de entre el 63-73% a los cinco años. Dentro de Europa, las tasas estandarizadas de incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix son bastante más elevadas en los países de Europa central y del este, mientras que en el sur este tumor tiene mucha menor incidencia. Por el contrario, en los países en vías de desarrollo se dan incidencias de hasta 33,5 por 100.000 habitantes, con una disminución importante en la supervivencia. Finalmente, dado que se trata de un tumor que se presenta en mujeres relativamente jóvenes se trata de la mayor causa de años de vida perdidos por causa del cáncer en estos países.

En España se diagnostican alrededor de 2500 casos nuevos de cáncer de cérvix al año, manteniéndose la incidencia constante durante años. Sin embargo, cuando se estudia la tendencia relacionada con la edad de la paciente, se ha observado un aumento en la incidencia de cáncer de cérvix en la mujeres nacidas entre 1930 y

1940, observándose además un aumento del riesgo en las sucesivas generaciones, con una media de incremento anual del 1% aunque no significativo, durante la década de los 90. Probablemente, este incremento pueda ser más acusado en los próximos años, debido no sólo a la llegada de población inmigrante procedente de países con una mayor prevalencia de cáncer de cérvix, sino también ocasionado por la modificación en la conducta sexual de las generaciones más jóvenes, tanto en cuanto a la edad de comienzo de las relaciones, como al incremento del número de parejas.

En la población española, las estimaciones generadas a partir de muestras poblacionales de la región de Barcelona indicarían un rango en la prevalencia de ADN viral del 2-5%, lo que correspondería a unas 350.000-900.000 mujeres portadoras. Entre 175.000 y 350.000 mujeres serían portadoras de condilomas acuminados, un número equivalente serían portadoras de LSIL y existirían entre 8.500 y 9.000 casos de mujeres con HSIL.

Las lesiones preinvasoras se diagnostican generalmente en mujeres jóvenes, resultando muy difícil conocer su verdadera incidencia. La probabilidad de que ésta acabe en un cáncer de cérvix invasor dependerá entre otros factores del grado de la CIN. En casos de CIN 1 se estima que regresarán a la normalidad en un plazo de 5 años el 75%, mientras que el 6% de las mismas progresarán a lesiones de alto grado. De los CIN 2 y 3 progresarán entre el 12 y el 25%. El hecho de que estas lesiones se diagnostiquen en mujeres jóvenes, muchas de las cuales aún no han completado sus deseos genésicos condiciona, de forma importante el tratamiento de las mismas, de forma que mientras que antes se realizaban histerectomías y amputaciones cervicales, en la actualidad los tratamientos van dirigidos únicamente

a la eliminación de la lesión, preservando el resto del cuello. A ello han contribuido las mejoras técnicas incorporadas en la práctica clínica.

Aunque la eficacia de los tratamientos es elevada, no excluye la necesidad de controles posteriores, con el fin de detectar de forma precoz la enfermedad residual o recurrente, ya que estas pacientes presentan un riesgo cinco veces mayor de desarrollar un cáncer invasor, siendo la persistencia de la infección por VPH el factor más importante en la recurrencia y progresión de la enfermedad.

El hecho de que recientemente se haya introducido la vacunación frente a determinados tipos de VPH y siempre que la cobertura de vacunación sea elevada, posiblemente determine en un futuro una disminución en la tasa de citologías anormales y en las lesiones escamosas de alto grado. Pero han de pasar años hasta que esta situación hipotética se produzca y mientras tanto, la frecuencia cada vez mayor y en pacientes más jóvenes, junto con la necesidad de un seguimiento postratamiento determina una importante necesidad de recursos y un gasto sanitario nada despreciable.

El que el VPH tenga un papel tan esencial en la etiología del cáncer cervical, determina una estrecha relación de la función inmunitaria en el origen de esta patología. Parece que tanto la respuesta mediante anticuerpos como mediante células T son importantes en el control de la infección por VPH y, por tanto, del cáncer cervical.

.Parece ser, que la respuesta de tipo Th1 a la infección por VPH es importante para controlar con éxito el virus, mientras que una respuesta de tipo Th2 proporciona un control inadecuado de la infección. La respuesta de tipo Th1 aumenta la inmunidad celular mediante la producción de citoquinas como la IL2 e IFN γ . La respuesta de

tipo Th2 aumenta la inmunidad humoral mediante citoquinas como IL4 e IL10. Apoya esta teoría el hallazgo de niveles bajos de IL2 y niveles elevados de IL4 en lesiones escamosas de alto grado¹²⁹. Además Gianinni y cols. observaron un aumento de IL10 en lesiones de alto grado, en comparación con lesiones de bajo grado y el tejido cervical normal¹³⁰. Todos estos hallazgos apoyan la teoría de que la respuesta de tipo Th1 es la apropiada para las infecciones por VPH, mientras que la respuesta de tipo Th2 resulta perjudicial para el control de la infección.

Por otra parte, diversos estudios epidemiológicos han sugerido una fuerte asociación entre la infección crónica, la inflamación y el cáncer^{131,132,133,134,135,136,137,138,139}. Existen por tanto numerosas evidencias que apoyan que si bien la carcinogénesis es un proceso dependiente de la acumulación de cambios genéticos o epigenéticos (factores intrínsecos) en las células transformadas, muchas etapas necesarias para la progresión tumoral por ejemplo, proliferación, invasión y angiogénesis, son influenciadas por factores microambientales (extrínsecos) tales como factores de crecimiento, factores angiogénicos, citoquinas y enzimas proteolíticas¹⁴⁰. En este sentido, numerosas observaciones sugieren que la inflamación crónica y una respuesta inmune humoral sostenida están relacionadas también con la iniciación de tumores (proceso por el cual las células normales se alteran genéticamente para convertirse en malignas), promoción (proceso mediante el cual pequeños grupos de células neoplásicas son estimuladas para crecer) y progresión (proceso por el que el tumor en crecimiento se vuelve más agresivo). Actualmente se acepta, de forma general, que la inflamación juega un papel importante en la génesis tumoral, de modo que resulta evidente que la existencia de un microambiente proinflamatorio es un componente esencial en el

origen de todos los tumores, incluso aquellos en los que aún no se ha demostrado, una relación causal directa con dicha inflamación¹⁴¹.

Finalmente, la constatación de los datos anteriormente expuestos y de los datos epidemiológicos que sostienen que hay una estrecha relación entre inflamación crónica y cáncer, llega de que ciertos polimorfismos genéticos, situados en los promotores de citoquinas y que regulan la adecuación e intensidad de las respuestas inmunológica, se encuentran asociados a un incremento del riesgo de desarrollar cáncer^{131,132,142}.

Por tanto, los objetivos de nuestro trabajo perseguían demostrar una posible asociación de polimorfismos genéticos en citoquinas y quimiocinas y de determinados marcadores linfocitarios relacionados con la maduración y diferenciación funcional de los linfocitos con parámetros clínico-patológicos asociados a las lesiones inducidas por VPH.

1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La edad media de las pacientes del estudio fue de 39,69 años, siendo muy similar a la del grupo control (37,73 años).

Las lesiones detectadas a nivel cervical fueron fundamentalmente de alto grado (75,3%) como cabía esperar dado que la conización con asa de diatermia es el tratamiento de elección en este tipo de patología, mientras que en lesiones de bajo grado es posible establecer tanto una actitud expectante bajo determinadas condiciones, como la realización de tratamientos destructivos locales (crio-coagulación, vaporización con láser de CO₂).

El tiempo medio de seguimiento fue de 23,21 meses, con un máximo de 72 meses y se contabilizó un total de 6 pacientes que abandonaron el seguimiento antes de procederse al alta médica desde la consulta. Los datos referentes a estas pacientes no fueron tenidos en cuenta a la hora de establecer relaciones entre los diferentes parámetros estudiados como cofactores de la infección por VPH y el riesgo de recidiva posterior de lesiones.

La tasa de recidiva se sitúa en el 34,8%, siendo ésta algo superior a las descritas en la literatura, donde se sitúan entre el 5 y el 30%¹⁴³, aunque pueden superar el 50% en grupos donde existe persistencia de infección por VPH de alto riesgo oncogénico¹⁴⁴. Esto puede deberse en primer lugar, a que se decidió no realizar una diferenciación entre recidiva y persistencia por parecernos una definición más teórica que práctica y sobre la que existen ciertas controversias en la literatura y fundamentalmente, a que se incluyeron las pacientes con lesiones condilomatosas (35,5% de las recidivas).

Por otra parte, en nuestro grupo no se ha podido establecer una relación ni con la afección de los bordes quirúrgicos en la pieza de conización, ni con la paridad, ni consumo de tabaco ni anticonceptivos, en contra de lo recogido de forma general en la literatura^{145,146,147}. El hecho de que en nuestro estudio no se observe dicha asociación puede deberse en primer lugar, a que se trata de un número de pacientes insuficiente, junto con el hecho de que no se distinguió a las pacientes en función del número de cigarrillos consumidos a diario, el tiempo de uso de anticoncepción hormonal, ni el número de hijos, por no aparecer estos datos reflejados en la historia clínica, de forma general.

2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A DESARROLLO DE RESPUESTAS INFLAMATORIAS

2.1 Regulación de la migración transendotelial (quimiocinas): RANTES y MCP-1

POLIMORFISMOS DE RANTES

RANTES es una quimiocina CC que normalmente es expresada y secretada por diferentes tipos celulares entre los que se encuentran las plaquetas, células epiteliales y linfocitos T en respuesta a diferentes tipos de señales como endotoxinas, infecciones bacterianas y TNF α , destacando su capacidad de regular el tráfico y activación de una gran variedad de células inflamatorias. Además parece estar íntimamente envuelta en la fase aguda de respuesta a la infección a través del receptor CCR5 cuya expresión a nivel cerebral se encuentra incrementada en esta fase y está relacionado con el proceso de patogénesis de la fiebre¹⁴⁸. Por otra parte se cree que juega un papel importante en la inmunidad antitumoral mediante el reclutamiento de células de la inmunidad (células T y monocitos)¹⁴⁹.

Los polimorfismos incluidos en este estudio, se encuentran en la región del promotor -403. Diferentes polimorfismos de RANTES (GA/AA) se han asociado con un alto riesgo de cáncer de páncreas¹⁰⁴ (OR= 2.3; 95% CI: 1.0-5.4). En cáncer de próstata los pacientes mostraron una elevada frecuencia del alelo A¹⁰⁵, asociándose éste con una elevada transcripción del gen¹⁵⁰ (OR=1.807; 95% CI: 1.149-2.844 p =0,014), mientras que en cáncer renal y de mama no se ha encontrado asociación con parámetros clínico-patológicos¹⁰⁹. Por el contrario Liou et al encuentran un menor

riesgo de cáncer gástrico en mujeres portadoras del alelo A (OR = 0.36, 95% CI = 0.19–0.70, P = 0.003).¹⁵¹

En el estudio llevado a cabo en nuestras pacientes no se encontraron diferencias en cuanto a la frecuencia de los diferentes polimorfismos entre las pacientes con neoplasia cervical y los controles. Tampoco se observó asociación con el grado de lesión histológica ni con la frecuencia de reaparición de lesiones tras el tratamiento con conización.

POLIMORFISMOS DE MCP-1

MCP-1 es una quimiocina responsable del reclutamiento de monocitos y linfocitos T en condiciones de inflamación aguda y puede ser un importante mediador en la inflamación crónica. El alelo G del polimorfismo -2518 A/G, se relaciona con un incremento en la producción de MCP-1.

Variaciones genéticas dentro de la región reguladora que afecta a la transcripción y producción de la proteína MCP-1, se han relacionado con el riesgo de metástasis en el cáncer de mama. Estos descubrimientos se correlacionan con la sobreexpresión de MCP-1 en tejido tumoral de mama de un estudio anterior. En el estudio realizado en tejido cáncer renal y prostático no reveló resultados significativos^{109,110,201}.

En 2008 Nahon y cols. no encuentran asociación entre la supervivencia ni la aparición de carcinoma hepatocelular en pacientes con cirrosis hepática por virus C, en relación con los diferentes polimorfismos de MCP-1.

En cuanto a la asociación con la CIN, nuestro estudio pone de manifiesto que el polimorfismo AA (menor producción de MCP-1) es el de mayor frecuencia tanto en pacientes como en controles. Sin embargo, casi el doble de las pacientes

presentaron el alelo G relacionado con la mayor producción de esta quimiocina, genotipo (A/G), con respecto al grupo control. Cuando se agruparon en alto/medio productor (AG/GG) y bajo productor (AA), la frecuencia de AG/GG fue prácticamente el doble en las pacientes que en el grupo control. Esta quimiocina es fundamental para la quimiotracción de macrófagos, la célula clave en el mantenimiento del estado de inflamación crónica¹⁵².

Sin embargo, el genotipo AA (bajo productor) se encontró con mayor frecuencia en lesiones de alto grado. Esta contradicción podría explicarse si tenemos en cuenta el papel dual y complejo que desarrolla el macrófago como célula pro- y anti tumoral (macrófagos M1/M2). Es decir un genotipo AA, podría frenar el establecimiento de infecciones crónicas, pero cuando las lesiones ya se han producido, sería necesaria la migración de macrófagos para actuar como células presentadoras de antígeno y potenciar reacciones de citotoxicidad.

2.2 Polimorfismos que regulan la respuesta inmunológica innata: (TNF α , IL1A, NF κ β y MICA)

POLIMORFISMOS DE TNF α

El TNF α es una citoquina proinflamatoria multifuncional secretada predominantemente por monocitos/macrófagos y células T. El TNF α puede inducir la necrosis celular, la muerte celular programada o apoptosis, y también puede promover el cáncer.

TNF es un mediador clave de la inflamación y puede contribuir a la iniciación tumoral mediante la estimulación de la producción de moléculas genotóxicas, que puede producir alteraciones en el ADN y mutaciones^{153,154}.

Se ha analizado el papel del TNF α en pacientes con hepatitis C, intentando establecer una asociación de los diferentes polimorfismos con el aclaramiento viral, pero hasta el momento no se ha encontrado asociación clara al respecto, ya que los resultados han sido controvertidos^{155,156,157}. En cambio, el genotipo -308 GG (menor expresión) de TNF α se ha asociado con un gran riesgo de hepatitis B crónica, con lo que se concluye que este polimorfismo desempeña un importante papel como un factor genético del huésped en la progresión de la enfermedad^{158,159}.

En cuanto a la posible asociación con el desarrollo tumoral, en 2008 dos meta-análisis demostraron un riesgo incrementado de cáncer gástrico en portadores del polimorfismo AA (mayor expresión) de TNF α -308^{160,161}. Igualmente, al estudiar estos polimorfismos en relación con el cáncer de mama, aunque no se encontraron diferencias en cuanto a la frecuencia de los diferentes polimorfismos entre pacientes y controles, se halló una mayor frecuencia del alelo A en los casos en los que existía invasión vascular y por tanto parece relacionarse con una mayor agresividad de la enfermedad¹⁶².

Por otra parte, un estudio realizado por nuestro laboratorio, puso de manifiesto la relación entre el alelo A de TNF α y el cáncer de próstata¹⁰⁵. Por el contrario, los estudios realizados en pacientes con cáncer de cérvix no han encontrado asociación entre los diferentes polimorfismos y la predisposición o agresividad de dicho tumor^{163,164}. Contrariamente a estos estudios nosotros hemos encontrado una mayor frecuencia del polimorfismo AA de TNF α -308, relacionado con una mayor

expresión, en las pacientes con respecto a los controles, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,013$; $OR=2,27$ (IC 95%:1,91-2,71)). Cuando estudiamos si los diferentes polimorfismos podían influir en el grado de lesión cervical o en la evolución tras la conización, no se pudo establecer dicha asociación. Probablemente el hecho de que en nuestra población el alelo A sea poco frecuente, dificulta la posibilidad de encontrar diferencias significativas.

POLIMORFISMOS DE IL1A

IL1A es una citoquina proinflamatoria producida por monocitos, macrófagos, y células epiteliales y tiene características biológicas similares al $TNF\alpha$, incluyendo la participación en la respuesta a la invasión microbiana, inflamación y daño tisular. El gen IL1A se encuentra en el cromosoma 2q13 e incluye varios polimorfismos, siendo uno de los más estudiados el -889 C/T situado en la región reguladora 5'UTR, asociándose el alelo T con una alta expresión de la citoquina. Los polimorfismos de la IL1 se han asociado, entre otros, a cáncer gástrico, hepatocelular, pulmón, colon, vulva y ovario. En el cáncer de mama, IL1A promueve el crecimiento de células tumorales y la caquexia,¹⁶⁵ pese a lo cual ninguno de los estudios de cohortes detectó asociación del polimorfismo -889 con dicho tumor^{166,167}.

Otros estudios, ya mencionados, tampoco establecen asociación entre los diferentes polimorfismos de IL1A y cáncer renal y prostático^{105,201}.

Nuestra investigación no encuentra asociación entre los diferentes alelos de IL1A y la neoplasia cervical, ni en cuanto al grado histológico ni en la frecuencia de recidiva.

POLIMORFISMOS DE NFκβ

NFκβ forma parte de una familia de factores de transcripción que juega un papel crítico en la respuesta inflamatoria innata. La estimulación por parte de citoquinas proinflamatorias dirige la activación de NFκβ, que regula la expresión de genes clave en el control de la apoptosis, angiogénesis y proliferación celular. El funcionamiento aberrante de NFκβ puede ocasionar una inhibición de la apoptosis, replicación celular y angiogénesis incrementada, estando todos ellos presentes en la aparición y progresión del cáncer¹⁶⁸.

La activación inapropiada de NFκβ ha sido implicada en la inflamación asociada con una variedad de enfermedades y condiciones patológicas, entre ellas el asma, artritis, shock séptico, fibrosis pulmonar, diabetes, etc. Además varios fármacos antiinflamatorios y anticancerosos actúan, en parte, a través de la inhibición de NFκβ.

Además, diversos estudios establecen una asociación entre determinados genotipos del polimorfismo 94 ins/del ATTG de NFκβ1 y enfermedad inflamatoria intestinal¹⁶⁹¹⁷⁰, aunque un estudio realizado en nuestra población no corroboró la hipótesis de que existe relación entre la colitis ulcerosa y NFκβ¹¹⁴.

La vía de NFκβ tiene una acción dual en la promoción tumoral: en primer lugar, mediante la prevención de la muerte de células de potencial maligno y en segundo lugar, a través de la estimulación de la producción de citoquinas proinflamatorias en las células de infiltración mieloide y células linfoides. La actividad de NFκβ parece jugar un papel principal en algunos cánceres, entre los que se encuentran los tumores linfoides, el cáncer colorrectal y el cáncer renal, donde una actividad elevada de estos factores de transcripción se asocian con el desarrollo

tumoral^{171,172,173}. Sin embargo, en 2006, Riemann y cols. no encuentran relación entre la progresión tumoral y la supervivencia en estas enfermedades y los diferentes polimorfismos genéticos de NFκβ1¹⁷⁴.

Los mecanismos que están detrás de la relación entre NFκβ1 y determinadas enfermedades aún no están claros, sin embargo, se conoce que la delección de 4 pares de bases en el promotor del gen, da lugar al alelo -94delATTG, que se relaciona con una disminución en la transcripción de NFκβ^{175,176}.

La inflamación crónica está claramente involucrada en el origen de las neoplasias cervicales intraepiteliales y por tanto de la aparición del cáncer de cérvix. Un reciente estudio encuentra una mayor frecuencia del genotipo ins/ins y del alelo -94insATTG en pacientes con carcinoma escamoso de cérvix (p=0,001; OR=2,56 (IC 95%:1,46-4,49)). Este polimorfismo se encontró sobre todo en pacientes jóvenes (≤35 años) y con afectación de parametrios, no relacionándose ni con la diferenciación tumoral, estadio clínico ni metástasis en ganglios linfáticos¹⁷⁷.

Nuestro trabajo mostró una mayor frecuencia del genotipo del/del en los controles y del genotipo ins/ins en las pacientes afectas de neoplasia cervical intraepitelial, aunque estas diferencias no alcanzaron significación. Tampoco se pudo demostrar una asociación entre los diferentes alelos de NFκβ1 y el grado de lesión cervical, ni la frecuencia de recidiva en el seguimiento llevado a cabo posteriormente. Estudios con un mayor tamaño muestra podrían confirmar los hallazgos.

En resumen de estos estudios se puede colegir que tanto TNFα y NFκβ, que regulan el desarrollo de repuestas inflamatorias innatas, podrían asociarse a riesgo de lesiones cervicales por VPH. Ambas moléculas participan en la misma vía (TNFα activa NFκβ, y este factor transcripcional induce la expresión de TNFα). Ambos

regulan la síntesis de quimiocinas, RANTES y MCP-1 entre otras, y compuestos genotóxicos, como el óxido nítrico, asociados a daño de ADN⁹³.

POLIMORFISMOS DE MICA

La respuesta inmune innata se considera la primera línea de defensa de la superficie mucosa. Las células NK son una importante arma del sistema inmune innato especializadas en eliminar células tumorales y células infectadas por virus¹⁷⁸.

La actividad de las células NK está regulada por un complejo equilibrio de receptores inhibidores y estimuladores¹⁷⁹.

NKG2D es un receptor expresado en casi todas las células NK y células T CD8. Este receptor puede promover la lisis tumoral a través de la unión a una familia recientemente identificada de ligandos de la superficie celular codificados por los genes MIC, que incluyen los genes MICA, MICB, MICC, MICD Y MICE. De ellos, sólo MICA y MICB son genes funcionales. El gen MICA se ha identificado centromérico al gen HLA-B y telomérico al locus de HLA-DQ y de TNF en el brazo corto del cromosoma 6. Las moléculas MICA al contrario que las HLA no presentan antígenos pero actúan como ligandos para células que expresan NKG2D (linfocitos NK y algunas subpoblaciones de linfocitos T). Las moléculas MICA son expresadas frecuentemente en monocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos, especialmente en condiciones de estrés¹⁸⁰. MICA también es expresado por tumores epiteliales, no obstante, se ha demostrado que la emisión de MICA desde la superficie de células tumorales ocurre en una variedad de tumores epiteliales malignos incluyendo el carcinoma hepatocelular avanzado, colon, próstata, renal, cáncer de mama y cánceres hematopoyéticos.

La unión de NKG2D activa la respuesta citolítica de células T y NK frente a tumores epiteliales que expresan MICA, particularmente en células tumorales y células infectadas por virus que presentan ausencia total y/o parcial de moléculas HLA, pudiendo representar un nuevo mecanismo molecular de exposición de células epiteliales dañadas al sistema inmune.

No todas las variantes genéticas de MICA codifican para moléculas MICA que residen en la membrana celular¹⁸⁰. Especialmente la variante genética MICA 5.1, que presenta una inserción de un nucleótido en el gen, que da lugar a la aparición de un codon stop prematuro en el dominio transmembrana. La consecuencia funcional es que en individuos portadores del alelo 5.1 las moléculas de MICA son solubles y no de membrana.

La acumulación de MICA en el suero puede modular negativamente NKG2D a través de una facilitación de la internalización y degradación lisosomal de NKG2D. Esta estrategia se ha postulado como un mecanismo usado por las células tumorales para evadir la vigilancia inmunológica. De hecho, se ha encontrado que MICA 5.1 se asocia a carcinoma escamoso de la cavidad oral¹⁸¹ y a baja supervivencia. También y en población española se ha encontrado asociación a cáncer de mama¹⁸². Con estos antecedentes y particularmente porque el cáncer cervical, se trata de una neoplasia asociada a infección crónica persistente por el virus VPH, podría esperarse que la variante genética 5.1 pudiera tener algún impacto sobre la patogénesis de la neoplasia cervical. Un estudio reciente apunta que determinados residuos polimórficos de MICB se encuentran negativamente asociados al desarrollo de cáncer cervical probablemente por el impacto sobre la inmunoactivación de las células citotóxicas¹⁸³. En nuestro trabajo al contrario de lo

que ocurre en pacientes españolas de cáncer de mama, no hemos encontrado mayor riesgo de desarrollo de CIN en función de los diferentes polimorfismos de MICA, ni siquiera cuando se agrupó a las pacientes y los controles en función del alelo MICA 5.1. Tampoco se pudo establecer asociación entre el grado de lesión cervical y el riesgo de recidiva o persistencia de las mismas con los diferentes polimorfismos de MICA. Nuestros datos, por tanto, confirman los obtenidos en otros grupos de población, también en pacientes con neoplasia cervical intraepitelial.^{184,185}

2.3 Polimorfismos que regulan la respuesta inmunológica adaptativa: IFN γ , IL10, CTLA-4

POLIMORFISMOS DE IFN γ

El IFN γ , producido principalmente por linfocitos activados y células NK, es una de las principales citoquinas que polariza las células Th (cooperadores) hacia el fenotipo Th1 e inhibe el desarrollo de células Th2. La respuesta celular tipo 1 juega un papel decisivo en la defensa del huésped frente a las infecciones virales y el desarrollo tumoral. Así pues, niveles elevados de producción de IFN γ se asocian con una respuesta efectiva frente a virus y entre ellos, el VPH¹⁸⁶. Además, se ha observado que una baja expresión intratumoral de esta citoquina, se asocia con un peor pronóstico en el cáncer cervical^{187,188}.

Otros estudios como el de Halma en 2004, no encuentran diferencias entre pacientes con cáncer de páncreas y controles sanos, en cuanto a la frecuencia de

los diferentes polimorfismos del gen del IFN γ , pero si detectan una mayor supervivencia en portadores del alelo 12¹⁸⁹.

El papel de los polimorfismos del IFN γ en el intrón 1, en el cáncer de mama esporádico también ha sido analizado, encontrando una mayor frecuencia de alelo 12 en estas pacientes, mientras que el alelo 15 fue significativamente más frecuente en los controles¹⁹⁰.

Por otra parte, en tumores asociados a procesos inflamatorios, el incremento en la producción de IFN γ podría contribuir al crecimiento y progresión de tumor. Esto último se evidencia en procesos inflamatorios crónicos como en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal y en infecciones persistentes como las producidas por VPH, virus de hepatitis B y C (VHB, VHC). Así pues, el papel de esta citoquina en el desarrollo tumoral es complejo^{191,192}.

En el estudio realizado por Lai¹⁰² encuentran asociación entre los diferentes polimorfismos de IFN γ y una mayor o menor susceptibilidad a la carcinogénesis cervical. Así los genotipos 12 y 14, asociados con niveles elevados de transcripción, se relacionaron con un mayor riesgo de lesiones neoplásicas cervicales de alto grado, estando estos hallazgos en contra de la hipótesis que confiere a esta citoquina un factor protector.

En nuestro trabajo por el contrario, se halló una mayor frecuencia de alelo 12 en el grupo control. En el grupo de pacientes fue menor la proporción de heterocigotos (producción intermedia), siendo mayor la de aquellos que no tenían alelo 12 (bajo productor). La ausencia de este alelo casi triplicó el porcentaje con respecto al grupo control. También, aunque no resultó significativa, hubo mayor frecuencia de pacientes con lesiones de alto grado en el grupo con ausencia de alelo 12 (bajo

productor). El 32% de las pacientes con lesiones de alto grado (18 casos) tuvieron genotipo con ausencia del alelo 12, frente al 12,5% (2 casos). Nuestros datos contradicen a los del grupo de Lai y apoyan los numerosos estudios que sostienen la necesidad de esta citoquina, en relación a la inmunidad antiviral por su mediación en respuestas Th1 y en la activación de linfocitos T citotóxicos. En resumen, una producción mínima IFN γ resultaría fundamental para el control de la infección por VPH, y un genotipo bajo productor daría lugar a una respuesta insuficiente, una persistencia en la infección viral y al mantenimiento del status de inflamación crónica.

POLIMORFISMOS DE IL10

IL10 es una citoquina homodimérica que fue originalmente descrita como “factor inhibitorio de citoquina” (CSIF) por su habilidad para inhibir la secreción de citoquinas de las células Th1. Los monocitos son la mayor fuente de IL10 y otras células productoras de esta citoquina incluyen las células T (especialmente, las células T CD4+ reguladoras que expresan también CD25 y FOXP3), las células B y las células dendríticas. La IL10 regula la expresión linfocitaria de IL4, IL5 e IFN α .

Aunque la principal función de IL10 es inhibir tanto la presentación de antígenos como la producción de citoquinas proinflamatorias y mediadores de macrófagos y células dendríticas, es importante remarcar que además puede actuar como coestimulador de la activación de células B, prolongando la supervivencia de dichas células y coestimulando a las células NK para la producción de citoquinas e incluso actuando como factor de crecimiento para determinadas células T CD8. Todas estas actividades estimuladoras son dosis dependiente.¹⁹³

La expresión de esta citoquina tiene efectos inhibitorios y supresores en la función proinflamatoria de las células presentadoras de antígeno. La IL10 también inhibe la expresión de moléculas de membrana como el HLA de clase II, el CD80, el CD86 y el CD23, regulando así la respuesta inmune. En ausencia de la molécula B7 (CD80 o CD86), por ejemplo, no hay proliferación de linfocitos T y no hay producción de citoquinas en respuesta al antígeno.

El gen de la IL10 está localizado en el cromosoma 1, en la posición 1q31-1q32. Un gran número de grupos han estudiado los polimorfismos del gen IL10. Hasta el momento se han registrado en la literatura 49 polimorfismos; de éstos, 46 son polimorfismos de nucleótido único, dos son microsatélites y uno es una pequeña delección. De éstos, veintiocho son polimorfismos de la región promotora y 20 no codifican ni regulan.

Se ha detectado asociación de los haplotipos configurados por los alelos en las posiciones -1082, -819 y -592 con los niveles de expresión de IL10, en cuanto el haplotipo -1082A/-819T/-592A está asociado con producción disminuida de IL10, al compararlo con el haplotipo -1082G/-819C/-592C⁹⁵.

No se sabe muy bien el significado de la producción de la IL10 en el desarrollo tumoral y su microambiente. Se han encontrado resultados opuestos cuando se han medido los niveles de IL10 en sangre periférica (altos niveles se relacionaba con un peor pronóstico tumoral) o en las muestras tumorales (altos niveles estaba relacionado con supervivencia)¹⁹⁴.

Los trabajos realizados sobre cáncer de mama no han podido establecer la existencia de asociación entre los diferentes haplotipos y esta patología¹⁶⁷.

En cáncer renal se ha evidenciado una asociación entre la heterocigosidad (AG) y un mayor tamaño tumoral, metástasis ganglionares y un estadio tumoral más avanzado²⁰¹. En cambio, en el estudio de la patología cervical se han encontrado resultados contradictorios. Stanczuk y cols. hallaron una asociación entre el alelo G y por consiguiente, una elevada producción de IL10 y el carcinoma invasor¹⁹⁵, mientras que otro trabajo posterior no detectó diferencias en la distribución de los diferentes alelos entre pacientes afectas de cáncer de cérvix y controles sanos¹⁹⁶. Ambos, son estudios retrospectivos de casos y controles realizados en población africana, pero cabe destacar que éste último contó con un número muy superior de participantes.

Por otra parte, un estudio realizado en adolescentes inmunodeprimidas ha relacionado los diferentes polimorfismos de IL10 con la frecuencia de aclaramiento del VPH, de modo que el alelo G se ha relacionado con una reducción en el aclaramiento de VPH de alto riesgo. Puesto que la persistencia de la infección viral es el principal factor de riesgo para la aparición de lesiones neoplásicas cervicales, podría especularse con una posible asociación entre esta patología y el alelo G de IL10-1082¹⁹⁷.

En nuestro estudio no se hallaron diferencias en la frecuencia de los diferentes haplotipos en el grupo de pacientes y en los controles sanos. Por otra parte, en el grupo de pacientes no se encontró relación ni con el grado de lesión neoplásica ni con la frecuencia de recidiva de lesiones.

Como ya se comentó anteriormente, el alelo C de IL10-819 se relaciona con una menor producción de IL10, relacionándose además con una reducción en el aclaramiento de VPH de alto riesgo¹⁹⁷.

Un estudio prospectivo realizado en pacientes con cáncer de ovario relacionó el ser portadora del alelo T con un peor pronóstico de la enfermedad con respecto a las portadoras del alelo C, aunque al realizar un análisis multivariante sólo la presencia de enfermedad residual y el volumen de ascitis se comportaron como factores pronósticos independientes¹⁹⁸. El alelo T también se ha relacionado en un estudio llevado a cabo en pacientes con melanoma, con una mayor susceptibilidad frente a este tumor¹⁹⁹.

Nuestro trabajo no pudo demostrar una relación de los diferentes haplotipos con el grado de lesión cervical y la frecuencia de reaparición de las lesiones tras el tratamiento. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los diferentes alelos en los dos grupos estudiados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en pacientes con cáncer renal²⁰¹.

POLIMORFISMOS DE CTLA-4

CTLA-4 codificado por un gen del cromosoma 2q33, es un receptor expresado por linfocitos T activados. La molécula CTLA-4 interacciona con el ligando B7 en la superficie de las células presentadoras de antígenos, provocando una parada del ciclo celular del linfocito T y una inhibición de la producción de citoquinas y por consiguiente elimina la fase de proliferación de linfocitos T que es fundamental como respuesta antitumoral. El bloqueo de CTLA-4 conlleva un incremento de la respuesta inmune y del rechazo de tumores.

El gen CTLA-4 consta de 4 exones y se han identificado más de 100 polimorfismos en la región CTLA-4. El polimorfismo CTLA-4/CT60 se cree que controla el procesamiento y la producción de CTLA-4. Ueda y cols. demostraron que el alelo G en la posición CT60 se asocia con un descenso del 50% en la isoforma soluble de

CTLA-4⁷¹. Los genotipos que producen niveles elevados de CTLA-4 parecen tener un papel protector frente a enfermedades autoinmunes²⁰⁰.

En un estudio publicado en 2009 sobre cáncer renal metastásico se encontró una asociación entre los polimorfismos del gen del CTLA-4 y un incremento del riesgo de desarrollar carcinoma de células renales. Se descubrió una alta frecuencia genotípica de los polimorfismos CTLA-4/CT60-AA y CTLA4/A49G-AA en pacientes con carcinoma renal frente a los controles (CTLA-4/CT60-AA: 38,6% VS 22,9% en controles, $p=0,005$ y un $OR=2,12$ con 95% CI: 1,28-3,50; y para CLA-4/A49G-AA: 58,4% frente a 44,3% en controles, $P=0,022$ y $OR=1,76$ con 95% CI: 1,11-2,80). Estas asociaciones en el mismo estudio no se vieron en el cáncer de colon. Además se descubrió una asociación entre el polimorfismo CTLA-4/CT60 y el grado tumoral en pacientes de carcinoma renal, demostrándose una alta frecuencia del genotipo AA en pacientes con tumores de alto grado.²⁰¹

En nuestro estudio encontramos por el contrario, que el genotipo AA fue más frecuente en los controles (17% en casos frente a 30,5% en controles), aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0,071$). El alelo A, relacionado con una mayor producción de CTLA-4 soluble y una menor duración de la respuesta proliferativa T, tendría por tanto un papel protector frente a CIN. Estos datos, se podrían explicar en el contexto del mantenimiento y prolongación de la respuesta inflamatoria y su cronificación como factor favorecedor de la aparición de daño celular y transformación neoplásica. No obstante, probablemente las diferencias encontradas en este estudio lo fueron porque en el grupo control (mujeres) la frecuencia de este genotipo AA es del 30%, mientras que en el estudio de cáncer renal, también de nuestra área geográfica, el genotipo AA del grupo

control fue del 22%. No hay datos en la bibliografía que establezcan diferencias en el polimorfismo de CTLA-4 CT60 y el sexo. Cabe plantear, por tanto, la necesidad de un mayor número de pacientes y controles para confirmar si esta tendencia es real o no.

No encontramos relación entre el grado de lesión cervical y la recidiva/persistencia de lesiones en nuestras pacientes con los diferentes polimorfismos de CTLA-4. Esto concuerda con el estudio realizado en pacientes con cáncer de mama, en las que no apareció relación entre los diferentes genotipos y alelos de CT60 y el tamaño tumoral y presencia de ganglios metastásicos en el momento del diagnóstico²⁰².

3 SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS: DISTRIBUCIÓN, EVOLUCIÓN TRAS EL TRATAMIENTO Y RELACIÓN CON RECIDIVA/PERSISTENCIA DE LESIONES

El papel central de las células T en la inmunidad antitumoral está bien establecido. El infiltrado tumoral por parte de estas células se ha considerado, de forma general, como una respuesta por parte del huésped dirigida contra los antígenos tumorales. Incluso esta infiltración ha sido considerada, en determinadas neoplasias como factor de buen pronóstico. Sin embargo, el hecho de que los tumores crezcan en presencia de la infiltración linfocitaria, sugiere el que estas células no han sido capaces de mantener una respuesta inmune eficaz. Por otra parte, se conoce como las lesiones premalignas y malignas se asocian con cambios en los perfiles linfocitarios, así como en la funcionalidad de los mismos.

La inmunidad celular se asocia con el aclaramiento de la infección por VPH y la regresión de las neoplasias cervicales intraepiteliales. Esta respuesta celular es favorecida por los CD4 Th1. Por otra parte, en la inmunidad frente al VPH se ha comprobado que existe una disminución en la respuesta por parte de los linfocitos T CD4 y una falta de efecto citolítico por parte de los linfocitos T citotóxicos.

Los linfocitos Th1 expresan CXCR3 y CCR5, mientras que los linfocitos Th2 presentan en superficie entre otras moléculas CCR3, CCR4. Así, varios estudios encuentran una mayor infiltración de las muestras de tejido tumoral, por parte de linfocitos CXCR3⁺ y CCR5⁺ y menor de linfocitos CCR4⁺, asociándose esta polarización hacia Th1 con un mejor pronóstico^{203,204}. El hecho de que en cáncer renal metastásico se hayan detectado proporciones menores de linfocitos CXCR3⁺ y mayores de CCR4⁺, indica que la distribución de estos puede variar durante la evolución de la enfermedad²⁰⁵.

Cuando comparamos los diferentes fenotipos de linfocitos en sangre periférica, tanto en las pacientes a las que se realizó el tratamiento mediante LEEP, antes y después del mismo, y en voluntarias sanas, encontramos diferencias en la proporción hallada de alguna de estas subpoblaciones linfocitarias.

Observamos como los linfocitos CD4CD62L⁺ se encontraban en una proporción significativamente menor en el grupo de pacientes, con respecto a los controles. Este antígeno se asocia a diferenciación y maduración T CD4 y se deja de expresar a medida que el linfocito se diferencia hacia célula efector/memoria, lo que pone de manifiesto que la presencia de células efector/memoria predomina en el grupo de pacientes y contrasta con la presencia casi mayoritaria de células CD62L⁺/CCR7⁺ en el grupo control (células vírgenes o "naive"). Confirmando el predominio de células T

diferenciadas, también la expresión de CXCR3 en linfocitos CD4 se encontró con mayor frecuencia en el grupo de pacientes, en el momento del tratamiento. La diferenciación de las células T CD4 “naive” o indiferenciadas hacia células T efectoras Th1 o Th2 resulta crucial en la defensa del huésped frente a los diferentes microorganismos. El receptor CXCR3, que como hemos visto, es expresado por células Th1^{206,207}, implicadas en la defensa frente a virus, se encuentra en una mayor proporción en el grupo de pacientes con lesiones secundarias a la acción del VPH.

A los seis meses del LEEP, las diferencias en CD4⁺/CXCR3⁺, persistieron, aunque estas diferencias ya no fueron significativas, ya que se produjo una ligera disminución en la proporción de esta subpoblación en las pacientes (39,51). Igualmente persisten las diferencias entre pacientes y controles en el análisis de los linfocitos CD4⁺/CD62L⁺, aunque éstas se redujeron (53,20 frente a 74,15). El hecho de que tras el tratamiento los valores de estas subpoblaciones tiendan a aproximarse, en pacientes y controles sanos, parece razonable puesto que se produce una extirpación de las lesiones, aunque probablemente en muchas de las pacientes no se haya producido un aclaramiento del agente causal, como es el VPH, pudiendo esto determinar la persistencia en las diferencias.

Además, en este momento del seguimiento se hallaron diferencias significativas en CD4⁺/CD25⁺⁺ (7,38 en pacientes y 6,02 en controles).

El hecho de que se produzca este incremento de células CD4⁺/CD25⁺⁺, podría conllevar un peor pronóstico, ya que se sabe que estas células pueden suprimir la respuesta inmune frente a infecciones y tumores, de modo que promueven la persistencia microbiana y progresión tumoral²⁰⁸. Se ha demostrado, una mayor

frecuencia de estas células T reguladoras ($CD4^+/CD25^{++}$), en sangre periférica y tumores de pacientes con cáncer de ovario, colon, esófago, estómago, hepatocelular, páncreas, etc^{209,210,211,212}. Además se ha observado como la depleción in vivo de células T reguladoras usando anticuerpos neutralizantes dirigidos contra CD25 incrementa la respuesta antitumoral mediada por células T e induce la regresión de tumores experimentales como sarcomas y melanomas^{213,214}.

Un estudio llevado a cabo en pacientes con lesiones preneoplásicas y cáncer de cérvix detectó una mayor proporción en linfocitos $CD4^+/CD25^{++}$ en sangre periférica, con respecto a controles sanos, asociándose además con elevada expresión de CD45RO. Estos niveles no comenzaron a declinar hasta un año después de finalizar los tratamientos²¹⁵. Otro estudio de cohortes retrospectivo encontró una elevación significativa de $CD4^+/CD25^{++}$ en pacientes con CIN 3 e infección por VPH persistente²¹⁶.

Además, se ha demostrado como la depleción de CD25 in vitro, exagera la respuesta celular virus-específica por parte de linfocitos CD4 y CD8²¹⁷.

A pesar de todo lo expuesto, nuestros datos no encontraron mayor frecuencia de $CD4^+/CD25^{++}$ en lesiones de alto grado, ni una mayor frecuencia de recidiva debido al incremento de sus valores.

Por otra parte, cuando se evaluó la evolución que experimentaron en función a sus niveles sanguíneos, las diferentes subpoblaciones en el grupo de pacientes justo antes de que se realizara la conización y a los seis meses de dicha cirugía, encontramos cambios significativos en los linfocitos CD19, donde se observa un incremento (11,69 frente a 13,99), al igual que en $CD4^+/CD25^{++}$ (5,74 frente a 7,78) y

que en $CD4^+/CD62L^+$ fue significativamente mayor, ya que prácticamente se duplicaron los valores (35,59 frente a 65,99).

Estos datos, por tanto, ponen de manifiesto un incremento a los seis meses de células $CD4^+/CD62L^+$, en las pacientes acompañado de un discreto aumento pero significativo de células Treg $CD4^+/CD25^{++}$. La proporción de células $CD4^+/CD62L^+$, se aproxima a la normalidad encontrada, lo cual está probablemente relacionada con la ausencia de estímulo antigénico (aclaración viral y resolución) tras el tratamiento escisional.

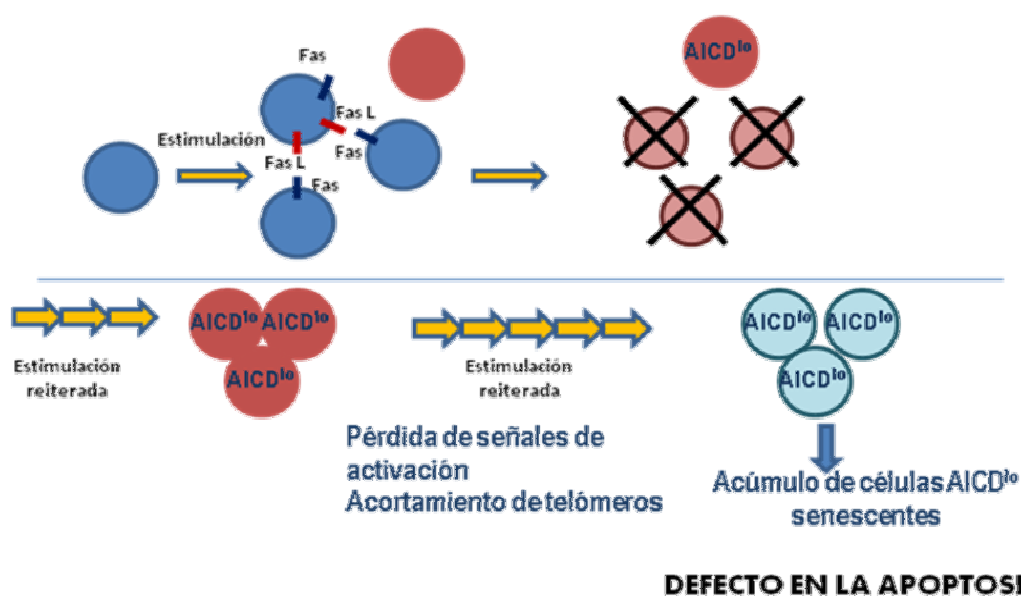
Por último, se intentaron correlacionar los niveles de las distintas subpoblaciones con la severidad de las lesiones cervicales y con la frecuencia de recidiva, para ello se estratificó el análisis a los 6 meses en función de la presencia de recidiva en las pacientes. El patrón expresión de $CD4^+/CD62L^{+/-}$ en las pacientes con recidivas fue similar a las del diagnóstico. Por el contrario el patrón $CD4^+/CD62L^+$, observado también en mujeres sanas fue el observado en pacientes que no recidivaron. De forma interesante, también, los valores medios de $CD4^+/CXCR3^+$ en sangre periférica fueron significativamente mayores, tanto en el momento del LEEP como a los seis meses, en las pacientes que sufrieron en el transcurso del seguimiento, recidiva de lesiones.

Esto probablemente, se puede explicar porque el tratamiento mediante LEEP, induce inicialmente un importante mecanismo de producción de señales de alarma, "danger signals", que potenciaría las respuestas Th1 y, por tanto, de aparición de células $CXCR3^+$. Sin embargo, en mujeres que no logran resolver la infección, se produciría un estado de recurrencia en las lesiones neoplásicas que se acompaña de un estado de marcadores linfocitarios similar al observado en el momento del

tratamiento. En consonancia, con estos resultados van Steenwijk y cols. demuestran la presencia de linfocitos T específicos de VPH 16 en pacientes con recidivas tras LEEP²¹⁸. Así, ante una persistencia de VPH, sería lógico que siga existiendo una polarización de la respuesta inmune hacia Th1. Estos datos, igualmente justificarían de forma paralela, el incremento porcentual a los seis meses de los niveles de linfocitos CD4⁺/CCR4⁺ en mujeres sin recidiva durante el seguimiento. Por tanto, un incremento en los linfocitos Th1 quedaría como un reflejo de la persistencia de las lesiones. Sin embargo en numerosos trabajos este estímulo crónico persistente se asocia a un estado de respuestas débiles o no funcionales de los linfocitos T efectores. En este sentido es interesante constatar dos aspectos, en primer lugar, la mayor presencia de linfocitos Treg (CD4⁺/CD25⁺⁺) ($p < 0.01$) a los seis meses del tratamiento, siendo la proporción de estas células mayor en las pacientes con respecto a controles sanos. Estos linfocitos pueden suprimir las respuestas funcionales de los linfocitos Th1 y favorecer el desarrollo del cáncer.^{215,219} Sin embargo, con independencia de la mayor presencia de células Treg postratamiento, en las pacientes, se observó también la presencia de marcadores asociados a la regulación apoptótica homeostática de los linfocitos T. La presencia de este marcador se asoció a parámetros clinicopatológicos en las pacientes y puede estar relacionado con el estado de supresión funcional característico de linfocitos T expuestos a infecciones crónicas persistentes. CD95 es un receptor multifactorial que induce la muerte celular o proliferación, dependiendo de la señal recibida, del tipo celular en que se exprese y del contexto en el que se encuentre²²⁰. CD95 actúa fundamentalmente como un receptor de muerte celular cuando interactúa con su ligando CD95L. El sistema CD95/CD95L contribuye a la delección de células T activadas durante la fase de finalización de la respuesta inmune, jugando un papel

clave en la apoptosis de células T. La continua exposición a un mismo antígeno conlleva la aparición de linfocitos con expresión de un fenotipo terminal en la maduración, caracterizado por la expresión de FAS (CD95) y por la pérdida de CD28, CD27 y CD62L, que se asocian a linfocitos “exhaustos” con menor capacidad de proliferación ante estímulos antigénicos. De hecho, una característica de los linfocitos T específicos durante el transcurso de infecciones virales crónicas es su baja capacidad replicativa.

FIGURA 20: Acúmulo de linfocitos T senescentes en infección viral crónica



AICD^{lo} : Activación-induced cell death/Inducción de la activación de la muerte celular

Estos linfocitos que han sido expuestos crónicamente a antígenos, aunque tengan el fenotipo efector-memoria, tienen una menor capacidad de respuesta por el acortamiento de telómeros que presentan (senescencia replicativa) y tienen por tanto menor capacidad funcional. En nuestro estudio, es compatible con el modelo propuesto de diferenciación terminal tras estímulo antigénico crónico por infecciones virales crónicas y en el cáncer.²²¹

FIGURA 21: Cambios fenotípicos y funcionales en linfocitos T CD8 y CD4 inducidos por la estimulación antigénica crónica. La estimulación antigénica crónica o repetitiva, como la inducida por infecciones virales crónicas, llevan a las células T CD4 hacia una diferenciación terminal a células efectoras y finalmente a células exhaustas..

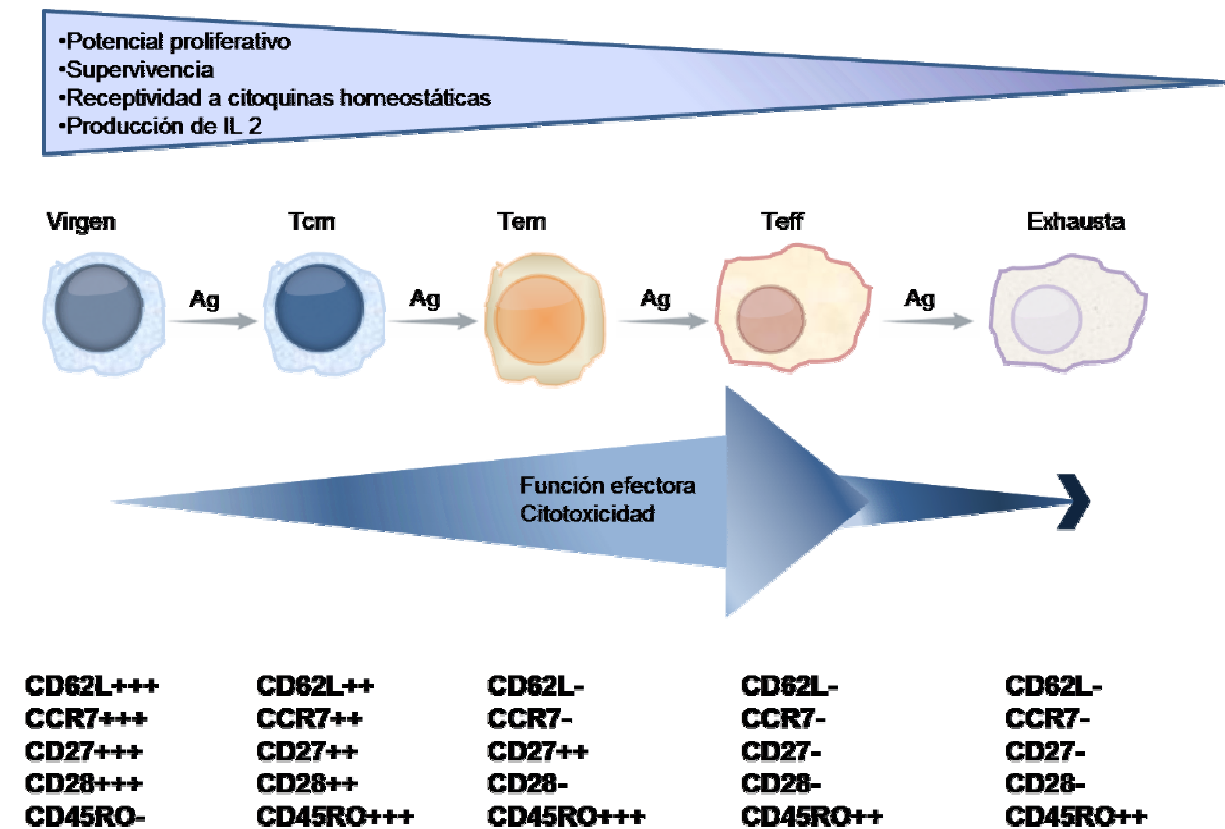
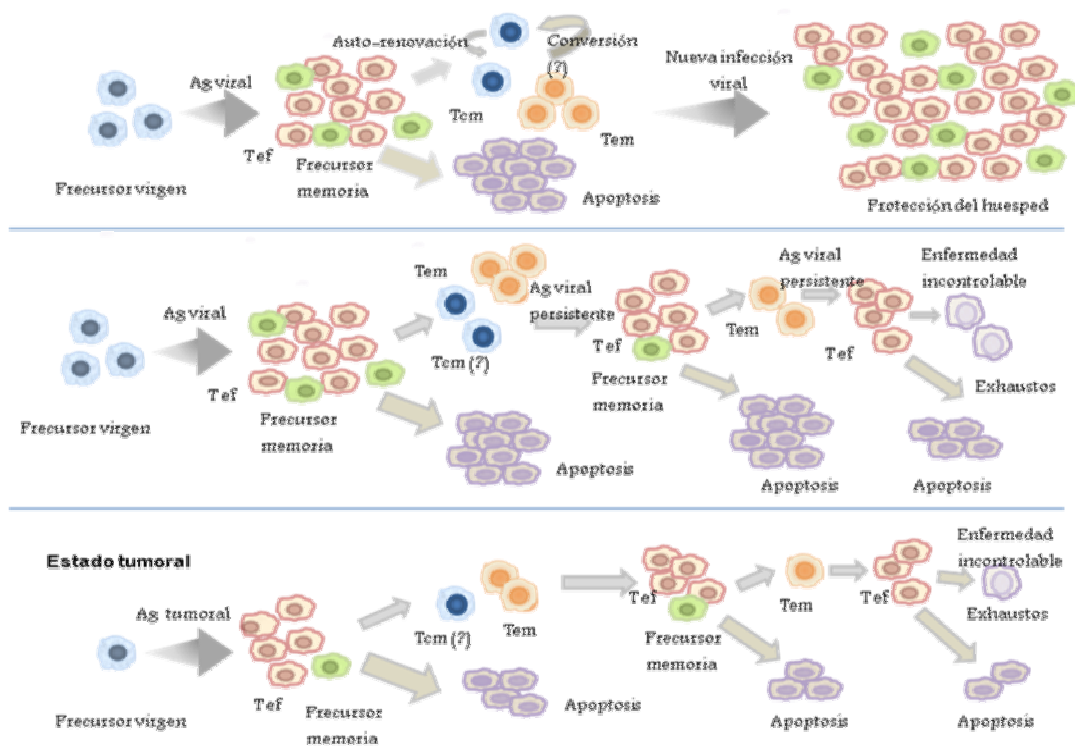


FIGURA 22: Homeostasis de la respuesta inmune tomando como ejemplo una infección viral aguda y crónica y el cáncer. Obsérvese en el primer caso cómo se logra controlar la infección, mientras que en los casos 2º y 3º, la persistencia de una infección crónica origina un fallo en los mecanismos de apoptosis o de “muerte celular programada”, y conduce a un estado de enfermedad incontrolable, similar a lo que ocurre en el cáncer.



Un trabajo realizado en nuestro centro pudo demostrar como estos linfocitos T CD4 con diferenciación terminal se encuentran en infecciones persistentes por citomegalovirus, presentando alterados los patrones de regulación homeostática inducida por FAS (AICD) y tendiendo a acumularse en la sangre de los pacientes y alterando el repertorio celular T²²². Esta situación puede asociarse a un estado de inmunosupresión por el empobrecimiento del repertorio. Estos linfocitos se han

encontrado aumentados, tanto en situaciones de infección crónica persistente²²³, como en el cáncer²²⁴. En nuestro estudio se objetivó, por una parte, como los valores de CD4⁺/CD95⁺ fueron menores en pacientes con lesiones de bajo grado, y por el contrario se encontró un progresivo incremento en lesiones más avanzadas (CIN 2-3). La expresión de linfocitos T CD4⁺/CD95⁺ en algunos pacientes con CIN 3 se detectó hasta en un 83% del total de células T CD4.

Así pues, una vez clarificadas las funciones de CD4⁺/CD95⁺, nosotros pensamos que una mayor proporción en sangre periférica, a medida que avanzan las lesiones, puede provocar una respuesta inmune deficiente frente al VPH y favorecer, por tanto, la progresión a neoplasia cervical intraepitelial de alto grado.

Finalmente, en lo que se refiere a los linfocitos B, las pacientes con lesiones condilomatosas presentaron niveles mayores de CD19, que aquellas con neoplasia cervical intraepitelial, en cualquiera de sus grados.

Existen controversias en los diferentes estudios en cuanto al papel que representan las células B en la inmunidad antitumoral. Se ha observado como pacientes con cáncer tienen niveles elevados de inmunoglobulinas séricas, algunas con actividad específica antitumoral, pero el papel de estos anticuerpos ha sido muy debatido. Inicialmente, se asumió que formaban parte de la respuesta antitumoral, sin embargo, su presencia a menudo se ha relacionado con un peor pronóstico. Esto, en combinación, con estudios experimentales, que relacionan el tratamiento con células B específicas del tumor con progresión del mismo, además de que suprimen a las células T citotóxicas ha ocasionado un cambio en lo que concierne al papel de las células B y la inmunidad humoral en el desarrollo del cáncer^{76,225,226}.

Aún así, hay que destacar que existen múltiples datos clínicos que ponen de manifiesto como individuos inmunodeprimidos por fármacos o por enfermedades que ocasionan inmunodeficiencias, muestran un riesgo incrementado para ciertos tipos de cáncer asociados a virus y carcinógenos conocidos²²⁷.

Un reciente estudio, ha puesto de manifiesto como niveles elevados de células B en ganglios linfáticos, se asocian con un mejor pronóstico en tumores epidermoides de cabeza y cuello²²⁸, estando en consonancia con nuestros datos en los que los niveles más elevados de linfocitos B se asocian con las lesiones de menor importancia a nivel cervical.

En resumen de nuestros datos se desprende que la presencia de mayor frecuencia de células con fenotipo efector-memoria Th1 en la sangre de los pacientes que presentan lesiones o recidivas posiblemente está relacionada con la persistencia de respuestas efectoras frente a VPH. Los niveles menores en la población control (que probablemente haya tenido contacto con el virus) y la disminución en mujeres que no presentan recidivas tras el tratamiento quirúrgico, seguramente obedece, a la reducción de las células efectoras tras el aclaramiento viral por la regulación homeostática. Por tanto, una mayor presencia de células T CD4⁺/CD25⁺⁺, y de linfocitos T CD4⁺/CXCR3⁺, CD95⁺CD62L^{+/-} pueden ser marcadores inmunológicos de infección crónica persistente. Es probable, que pacientes con elevados niveles de estos linfocitos presenten un deterioro funcional que les impida ser candidatos a recibir vacunas potencialmente curativas (por ejemplo vacunas frente a antígenos E6 y E7 mediadas por LTC), de manera análoga a lo que ha ocurrido en gran parte de los ensayos clínicos de vacunación del cáncer.

En resumen, de los factores inmunogenéticos (polimorfismos) que pueden influir en respuestas inmunológica deficientes frente a VPH, hemos encontrado que tanto un déficit de respuesta (ausencia de un nivel adecuado de producción de IFN γ , la presencia de células Treg), como un genotipo alto productor de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias podrían favorecer la aparición de las lesiones mediadas por VPH. En este último caso, una excesiva respuesta, conllevaría una destrucción masiva de células infectadas, liberación de señales inflamatorias (danger signal) y mantenimiento crónico de respuesta inflamatoria por la infiltración de células, fundamentalmente macrófagos (genotipo de MCP-1). El mantenimiento de la lesión inflamatoria crónica alteraría además de forma progresiva el programa funcional y madurativo de los linfocitos T y finalmente a una pérdida de respuesta protectora mediada por linfocitos T citotóxicos. No obstante la orquestación de una respuesta adecuada frente a VPH, dista mucho de estar comprendida en su totalidad. Está claro que depende de un adecuado balance de moléculas y células efectoras que pueden, dependiendo de las circunstancias, tener efectos promotores o erradicadores de la transformación neoplásica. Precisamente respecto a la infección por VPH, se ha puesto de manifiesto esta complejidad en dos modelos murinos de carcinogénesis mediada por VPH. En uno de ellos, los linfocitos CD4 son protectores para el desarrollo de cáncer cervical y en otro son células promotoras de cancer de piel^{229,230,231}.

Esta paradoja puede resolverse si se acepta que la inflamación y el escape inmunológico pueden ser separados temporalmente. Esto explicaría porqué en numerosos estudios las respuestas Th1 se han encontrado asociadas a la resolución de las lesiones SIL y nosotros hemos encontrado en las pacientes con recidivas este tipo de linfocitos Th1 (CXCR3⁺, CD62L^{+/-}), aunque probablemente no funcionantes

(inmunoescape). La mayor expresión de CD95 relacionada con la edad de los linfocitos puede ser un indicador de esta pérdida de función y capacidad replicativa (senescencia).

A medida que la relación entre la infección por VPH con determinados polimorfismos genéticos y la función inmunitaria se conozca mejor, es de esperar, que el paradigma genético del desarrollo del cáncer cervical pueda definirse de una forma más objetiva. Parece claro, no obstante, que los factores inmunogenéticos que influyen en la susceptibilidad de los pacientes para producir infección crónica persistente determinarían la activación de vías proinflamatorias reguladas por citoquinas y quimiocinas con el objetivo de mantener la angiogénesis, la inmunosupresión local (alteración funcional de los linfocitos) y el desarrollo de matriz extracelular, tres factores claves para el desarrollo de lesiones inflamatorias crónicas sobre las que se sustentan muchas veces la transformación neoplásica y la progresión tumoral. De esta manera, en un futuro se deberían de contemplar nuevos enfoques terapéuticos preventivos, de corrección y manipulación de los procesos inflamatorios crónicos en la prevención y tratamiento de las lesiones neoplásicas cervicales.

CONCLUSIONES

1. Los genotipos de alta producción de TNF- α y de MCP-1, se encuentran significativamente incrementados en las pacientes con CIN, siendo posible que ambas citoquinas se encuentren implicadas en la persistencia de la de la inflamación crónica y predispongan a la aparición de neoplasia cervical intraepitelial.
2. El genotipo asociado con baja producción de IFN γ , se asocia a la persistencia viral y desarrollo de lesiones neoplásicas cervicales probablemente porque se induzcan respuestas citotóxicas T insuficientes.
3. La presencia de linfocitos Th1 (CD4⁺/CXCR3⁺/CD62L^{-/+}), se encontró significativamente más elevada en pacientes y también en aquellas en las que persiste la lesión tras el tratamiento escisional. Por tanto la determinación del patrón de expresión del marcador CD62L y CXCR3 en los linfocitos T CD4 puede ser de utilidad para definir un estado de persistencia/recidiva de HPV. Por el contrario, el incremento de la proporción de linfocitos CD4⁺/CCR4⁺ podría ejercer un papel protector.
4. La reconstitución del repertorio celular con células de fenotipo virgen (T CD4⁺/CD62L⁺⁺) tras el tratamiento es indicativo de resolución.
5. La persistencia de la infección debe de provocar una disfuncionalidad en la población Th1. En este sentido, la expresión del marcador CD95 y la mayor presencia de células con fenotipo Treg (TCD4⁺/CD25⁺⁺), podría explicar la falta de aclaramiento viral del VPH.

6. La determinación de CD95 en la población T CD4 puede ser utilizado como un marcador de progresión en la neoplasia cervical y reflejaría el agotamiento de las respuestas celulares T.
7. Una proporción elevada se asocia con lesiones condilomatosas, mientras que disminuyen en lesiones de mayor envergadura, por lo que se deduce que la presencia de estas células conlleva un mejor pronóstico en la infección por VPH.

ACTIVIDAD CIENTÍFICA

Los resultados parciales del trabajo de investigación de la presente tesis doctoral han sido presentados en las siguientes comunicaciones científicas:

- Polimorfismos genéticos del gen del interferón gamma en relación con la aparición de lesiones cervicales por VPH. Comunicación ganadora del Premio Miguel de Arcos en el XVIII Congreso de la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia. Granada 2006.
- Relationship of INFG polymorphism in intron 1 with cervical intraepithelial neoplasia in spanish population. 2nd European Congress of Immunology. Berlin 2009.
- Diferencias en la expresión de marcadores de diferenciación Th1 en relación a la resolución o recidiva de lesiones asociadas a la infección por VPH. XXXV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. San Sebastián 2010.

ANEXOS

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE POLIMORFISMOS
GENÉTICOS EN PACIENTES TRATADAS MEDIANTE CONIZACIÓN CON ASA
DE DIATERMIA**

En la actualidad se está llevando a cabo un trabajo de investigación en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves, a través del cual se pretende alcanzar un mejor conocimiento de cuáles son los mecanismos que favorecen el desarrollo de lesiones en el cuello del útero por el Virus del Papiloma Humano.

Para llevar a cabo este trabajo, necesitamos una muestra de sangre, en cantidad similar a la necesaria para cualquier analítica de rutina, procediéndose a la recogida en el mismo momento en que usted se realice los análisis necesarios para la intervención (conización con asa de diatermia) propuesta, por lo que no supone ningún riesgo añadido para su salud.

Esta sangre será estudiada en el laboratorio de nuestro hospital, con el fin de conocer cómo son los genes que participan en la producción de proteínas (citoquinas y quimiocinas) que participan en la defensa frente a infecciones y tumores. Durante el estudio se mantendrá en todo momento la confidencialidad de sus datos.

Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica guardando estricta confidencialidad.

Por todo esto, solicitamos su participación mediante este documento informativo y agradecemos la colaboración prestada.

DOÑA _____

DNI _____ N° SS _____

He sido debidamente informada por el DR/DRA

_____ a cerca del procedimiento a realizar y de sus inconvenientes y deseo participar en el estudio anteriormente explicado.

FIRMA DE LA PACIENTE

FIRMA DEL MÉDICO

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE POLIMORFISMOS
GENÉTICOS**

Como resultado del estudio que venimos realizando en la consulta de Patología del Tracto Genital Inferior del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, nos vemos en la necesidad de comparar los resultados obtenidos en las pacientes participantes con estos mismos resultados en un grupo de mujeres sanas para ver las diferencias existentes.

Para llevar a cabo este trabajo necesitamos una muestra de sangre, en cantidad similar a la necesaria para cualquier analítica de rutina, procediéndose a la recogida en el mismo momento en que usted se realice una analítica por otro motivo en el Servicio de Urgencias de este centro, por lo que no supone ningún riesgo añadido para su salud.

Esta sangre será estudiada en el laboratorio de nuestro hospital, con el fin de conocer cómo son los genes que participan en la producción de proteínas (citoquinas y quimiocinas) que participan en la defensa frente a infecciones y tumores. Durante el estudio se mantendrá en todo momento la confidencialidad de sus datos.

Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica guardando estricta confidencialidad.

Por todo esto, solicitamos su participación mediante este documento informativo y agradecemos la colaboración prestada.

DOÑA _____

DNI _____ N° SS _____

He sido debidamente informada por el DR/DRA

_____ a cerca del procedimiento a realizar y de sus inconvenientes y deseo participar en el estudio anteriormente explicado.

FIRMA DE LA PACIENTE

FIRMA DEL MÉDICO

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES
LINFOCITARIAS EN PACIENTES TRATADAS MEDIANTE CONIZACIÓN CON
ASA DE DIATERMIA.**

En la actualidad se está llevando a cabo un trabajo de investigación en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves, a través del cual se pretende alcanzar un mejor conocimiento de cuáles son los mecanismos que favorecen el desarrollo de lesiones en el cuello del útero por el Virus del Papiloma Humano.

Para llevar a cabo este trabajo necesitamos una muestra de sangre, en cantidad similar a la necesaria para cualquier analítica de rutina, procediéndose a la recogida en el mismo momento en que usted se realice los análisis necesarios para la intervención (conización con asa de diatermia) propuesta, por lo que no supone ningún riesgo añadido para su salud.

Posteriormente, será necesaria su colaboración mediante una nueva analítica similar a la anterior, y que se realizará el día que acuda a la revisión programada seis meses tras la intervención.

Esta sangre será estudiada en el laboratorio de nuestro hospital, para obtener los valores de determinados grupos de linfocitos (células defensivas frente a infecciones), manteniéndose en todo momento la confidencialidad de sus datos.

Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica guardando estricta confidencialidad.

Por todo esto solicitamos su participación mediante este documento informativo y agradecemos la colaboración prestada.

DOÑA _____

DNI _____ Nº SS _____

He sido debidamente informada por el DR/DRA

_____ a cerca del procedimiento a realizar y de sus inconvenientes y deseo participar en el estudio anteriormente explicado.

FIRMA DE LA PACIENTE

FIRMA DEL MÉDICO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES
LINFOCITARIAS EN SANGRE PERIFÉRICA

Como resultado del estudio que venimos realizando en la consulta de Patología del Tracto Genital Inferior del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, nos vemos en la necesidad de comparar los resultados obtenidos en las pacientes participantes con estos mismos resultados en un grupo de mujeres sanas para ver las diferencias existentes.

Para llevar a cabo este trabajo necesitamos una muestra de sangre, en cantidad similar a la necesaria para cualquier analítica de rutina, procediéndose a la recogida en el mismo momento en que usted se realice las pruebas solicitadas por el servicio de medicina preventiva no comportando así, ningún riesgo añadido para su salud.

Esta sangre será estudiada en el laboratorio de nuestro hospital, para obtener los valores de determinados grupos de linfocitos (células defensivas frente a infecciones), manteniéndose en todo momento la confidencialidad de sus datos.

Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica guardando estricta confidencialidad.

Por todo esto, solicitamos su participación mediante este documento informativo y agradecemos la colaboración prestada.

DOÑA _____


DNI _____ Nº SS _____

He sido debidamente informada por el DR/DRA

_____ a cerca del procedimiento a realizar y de sus inconvenientes y deseo participar en el estudio anteriormente explicado.

FIRMA DE LA PACIENTE

FIRMA DEL MÉDICO

 <p>Servicio Andaluz de Salud CONSEJERÍA DE SALUD</p> <p>Hospital Universitario Virgen de las Nieves</p>	<div data-bbox="802 241 1297 353" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>DOCUMENTO DE INFORMACIÓN CLÍNICA ESPECÍFICA PARA OTORGAR EL CONSENTIMIENTO INFORMADO</p> </div> <div data-bbox="802 412 1297 479" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <p>SERVICIO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA</p> </div>
<p>CONIZACIÓN CERVICAL</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se trata de una intervención quirúrgica consistente en la extirpación de una parte del cuello del útero en forma de cono, y cuya finalidad puede ser diagnóstica y/o terapéutica. 2. Complicaciones y/o riesgos y fracasos: Toda intervención quirúrgica, tanto por la propia técnica quirúrgica como por la situación vital de cada paciente (diabetes, cardiopatía, hipertensión, edad avanzada, anemia, obesidad...) lleva implícita una serie de posibles complicaciones comunes y potencialmente serias que podrían requerir tratamientos complementarios tanto médicos como quirúrgicos, así como un mínimo porcentaje de mortalidad. Las complicaciones específicas potenciales de la intervención son: Hemorragia (inmediata o tardía), estenosis cervical, cuello uterino incompetente, extirpación incompleta de la lesión (márgenes positivos, lesión residual y lesión de novo), quemaduras accidentales en caso de utilizar electrocirugía, y excepcionalmente, perforación uterina. Si en el momento del acto quirúrgico surgiera algún imprevisto, el equipo médico podrá modificar la técnica quirúrgica habitual o programada. 3. Alternativas: Me ha sido explicada la existencia de otras posibles opciones terapéuticas como amputación cervical, tratamiento destructivo local e histerectomía en determinadas condiciones. La conización puede efectuarse con bisturí, con láser o con asa electroquirúrgica. 4. Anestesia: El procedimiento se puede realizar con anestesia local o general, dependiendo de los casos. Si fuera anestesia general, se valorará bajo la responsabilidad del Servicio de Anestesia. 5. Transfusiones: No se puede descartar a priori que en el transcurso de la intervención programada surja la necesidad de una transfusión sanguínea, que, en todo caso, se realizaría con las garantías debidas y por el personal facultativo cualificado para ello. 6. Anatomía Patológica: La pieza o piezas extirpadas en la intervención se someterán a estudio anatomopatológico posterior para obtener el diagnóstico definitivo, siendo la paciente y/o sus familiares o representante legal, en su caso, informados de los resultados del estudio. Asimismo he comprendido que dependiendo de los resultados anatomopatológicos y, por tanto, del diagnóstico definitivo, puede ser necesario completar esta intervención con otra más amplia, de la que se me informará en su caso.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

D ALBERTO PUERTAS PRIETO, SECRETARIO DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

INFORMA:

Que esta comisión valoró favorablemente el proyecto presentado por D^a. Aida Gonzalez Paredes titulado "Factores Inmunológicos y Genéticos de la Infección por el virus del papiloma humano en la neoplasia cervical intraepitelial: Estudio de Poblaciones Linfocitarias y Polimorfismos Genéticos asociados a inflamación".

Lo que firmo en Granada a cinco de julio de dos mil diez .

Secretario de la C. de Investigación
Fdo: Alberto Puertas Prieto



SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS EMPLEADAS

ACH: Anticoncepción hormonal.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AEPCC: Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia.

AGC: Atypical glandular cells. Atipia de células glandulares.

AGC-NOS: Atypical glandular cells not otherwise specified. Atipia de células glandulares no especificada.

AICD: Activation-induced cell death. Inducción de la activación de la muerte celular.

AIS: Adenocarcinoma in situ.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ASC-H: Atypical squamous cells cannot rule out a high grade lesion. Atipia de células escamosas sin poder descartar lesión escamosa de alto grado.

ASCCP: American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical.

ASC-US: Atypical squamous cells of undetermined significance. Atipia de células escamosas de significado indeterminado.

Ca. microinvasor: Carcinoma microinvasor.

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia. Neoplasia cervical intraepitelial.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

CSIF: Cytokine synthesis inhibitory factor. Factor inhibitorio de síntesis de citoquinas.

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4. Antígeno 4 del linfocito T citotóxico.

Desv. Típica: Desviación típica.

Del: Delección.

DAF: Decay accelerating factor. Factor acelerador de la degradación.

FDA: Food and Drug Administration.

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.

HLA: Human leukocyte antigen. Antígeno leucocitario humano. Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

HC2: Captura de híbridos de 2ª generación.

HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion. Lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

IC: Intervalo de confianza.

IFN: Interferón.

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleucina.

IL1A: Interleucina 1 alpha.

IL1B: Interleucina 1 beta.

Ins: Inserción.

ITS: Infección de transmisión sexual.

LCR: Long control region. Región larga de control.

LEEP: Loop electrosurgical escisión procedure.

LLETZ: Large loop escisión of the transformation zone.

LPS: Lipopolisacáridos.

LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesion. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.

LT: Linfocitos T.

LTC : Linfocitos T citotóxicos.

MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1

MICA: Human major histocompatibility complex class I chain-related gene A.

MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein 1 alpha. Proteína inflamatoria del macrófago 1.

ml: mililitro

mm: milímetro

NF κ β : Nuclear factor κ β .

NK: Natural Killers.

OR: Odds ratio.

ORF: Open reading frames. Secuencias de lectura abierta.

p: Nivel de significación estadística.

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns. Patrones moleculares asociados a patógenos.

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

pg: picogramo

RANTES : Regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

RR: Riesgo relativo.

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism. Polimorfismo de nucleótido único.

TAP: Transporters asociated with antigen processing. Transportadores asociados con el procesamiento del antígeno.

TGF β : Transforming Growth Factor-beta. Factor de crecimiento transformante beta.

Th: Linfocitos T helper/colaboradores.

TLR: Toll-like receptors. Receptores Toll-like.

Treg: Células T reguladoras.

VCAM-1: Vascular-cell adhesion molecule 1. Molécula de adhesión vascular 1.

VHS: Virus Herpes Simple.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

VPH: Virus del Papiloma Humano.

VPLs: Virus particles like. Partículas similares al virus.

ÍNDICE TABLAS

TABLA 1: Incidencia estandarizada por edad/100.000 habitantes referida por los registros de tumores de España.

TABLA 2: Principales VPH y riesgo oncológico.

TABLA 3: Clasificación de las alteraciones citológicas e histológicas.

TABLA 4: Cofactores establecidos y probables en la carcinogénesis cervical.

TABLA 5: Terminología colposcópica Barcelona 2002.

TABLA 6: Citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata.

TABLA 7: Citoquinas involucradas en la respuesta inmune específica.

TABLA 8: Quimiocinas.

TABLA 9: Grado de lesión cervical en el momento del tratamiento.

TABLA 10: Tiempo de seguimiento.

TABLA 11: Tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 12: Tasa de recidiva en función de la afectación de los bordes quirúrgicos de la pieza de conización.

TABLA 13: Tasa de recidiva en función del hábito tabáquico.

TABLA 14: Tasa de recidiva en función la paridad.

TABLA 15: Tasa de recidiva en función del uso de anticoncepción hormonal.

TABLA 16: Diferencias en la frecuencia de polimorfismos de RANTES.

TABLA 17: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de MCP-1.

TABLA 18: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de TNF α .

TABLA 19: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de IL1A.

TABLA 20: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de NF κ β .

TABLA 21: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de MICA.

TABLA 22: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de IFN γ .

TABLA 23: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de IL10-1082.

TABLA 24: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de IL10-819.

TABLA 25: Diferencia de frecuencias de polimorfismos de CTLA-4.

TABLA 26: Diferencia de frecuencias de alelo G de CTLA-4.

TABLA 27: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de RANTES-403.

TABLA 28: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de MCP-1.

TABLA 29: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de TNF α .

TABLA 30: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos agrupados de TNF α .

TABLA 31: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de IL1A-889.

TABLA 32: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de NF κ B.

TABLA 33: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de MICA.

TABLA 34: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de IFN γ .

TABLA 35: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de IL10-1082.

TABLA 36: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de IL10-819.

TABLA 37: Correlación entre grado de lesión cervical y polimorfismos de CTLA-4.

TABLA 38: Correlación entre polimorfismos de RANTES-403 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 39: Correlación entre polimorfismos de MCP-1 2518 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 40: Correlación entre polimorfismos de TNF α -308 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 41: Correlación entre polimorfismos de IL1A-889 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 42: Correlación entre polimorfismos de NFκβ y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 43: Correlación entre polimorfismos de MICA y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 44: Correlación entre polimorfismos agrupados de MICA y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 45: Correlación entre polimorfismos de INFγ y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 46: Correlación entre polimorfismos de IL10-1082 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 47: Correlación entre polimorfismos de IL10-819 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 48: Correlación entre polimorfismos de CTLA 4 y tasa de recidiva/persistencia de lesión cervical.

TABLA 49: Diferencias en subpoblaciones linfocitarias entre pacientes en el momento del LEEP y controles.

TABLA 50: Diferencias en subpoblaciones linfocitarias entre pacientes a los seis meses del LEEP y controles.

TABLA 51: Diferencia entre los valores medios de las diferentes poblaciones linfocitarias en el momento del LEEP y a los seis meses del mismo.

TABLA 52: Diferencias de CD19 en función del grado de lesión cervical.

TABLA 53: Diferencias de CD4⁺/CD95⁺ en función del grado de lesión cervical.

TABLA 54: Diferencias de CD4⁺/CD95⁺ en función del grado de lesión cervical (2).

TABLA 55: Poblaciones linfocitarias y persistencia y recidiva de lesiones.

TABLA 56: Persistencia/recidiva de lesiones en función del incremento-disminución CD4⁺/CD62L⁺.

TABLA 57: Persistencia/recidiva de lesiones en función del incremento-disminución CD4⁺/CCR4⁺.

ÍNDICE DE FIGURAS:

FIGURA 1: Estimación de número de casos e incidencia de cáncer de cérvix.

FIGURA 2: Mapa del genoma de VPH.

FIGURA 3: Porcentaje de casos de cáncer de cuello uterino atribuibles a los diferentes tipos de VPH.

FIGURA 4: Control post tratamiento de la CIN.

FIGURA 5: Distribución por edad del grupo de pacientes y del grupo control.

FIGURA 6: Grado de lesión cervical en el momento del tratamiento.

FIGURA 7: Polimorfismos MCP-1.

FIGURA 8: Polimorfismos TNF α .

FIGURA 9: Polimorfismos IFN γ .

FIGURA 10: Polimorfismos MCP-1 y grado lesión cervical.

FIGURA 11: Expresión de CD4⁺/CD62L⁺⁺⁺/CCR7⁺ en grupo control.

FIGURA 12: Expresión de CD4⁺/CD62L^{+/-} en pacientes.

FIGURA 13: Presencia de células con fenotipo Th1 en pacientes y controles.

FIGURA 14: Expresión de CD62L sobre la población CD4.

FIGURA 15: Expresión de FAS (CD95) en pacientes con distintas lesiones.

FIGURA 16: Expresión de FAS (CD95) en pacientes con lesiones de alto y bajo grado.

FIGURA 17: Expresión de CXCR3 sobre linfocitos T CD4.

FIGURA 18: Expresión de CD62L sobre la población CD4.

FIGURA 19: Expresión de CD62L sobre la población CD4.

FIGURA 20: Acúmulo de linfocitos T senescentes en infección viral crónica.

FIGURA 21: Cambios fenotípicos y funcionales en linfocitos T CD8 y CD4 inducidos por la estimulación antigénica crónica.

FIGURA 22: Homeostasis de la respuesta inmune tomando como ejemplo una infección viral aguda y crónica y el cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Bosch FX. Epidemiología de las infecciones por papilomavirus y lesiones asociadas. En: Tatti Sa, editor. Colposcopia y patología del tracto genital inferior. En la era de la vacunación. 1ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana;2008.p.57-63.
- ² Ault KA. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006; 2006 Supl:40470.
- ³ Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003;157:218–226.
- ⁴ Trottier H, Franco EL. The Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 2006 Mar 30;24 (Suppl 1):S1-S15.
- ⁵ Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snidjers PJ, Arslan A, Thi Hoang Anh PT et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer.* 2006;119:2677-2684.
- ⁶ Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cáncer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No.5, Version 2.0. Lyon, France: IARC Press;2004.
- ⁷ Galceran J, Marcos-Graguera R, Izquierdo A, Borrás J. Carcinoma Invasor y Lesiones Premalignas del Cuello Uterino en los Registros Poblacionales: Utilidad y Limitaciones. En: de San José S, García AM, editores. Virus del Papiloma Humano y Cáncer: Epidemiología y prevención. Madrid: Sociedad Española de Epidemiología (4ª Monografía); 2006. p.15-29.
- ⁸ Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM; International Agency for Research on Cancer (IARC). *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide.* Lyon, France: IARCPress; 2004; CancerBase No. 5, version 2.0.
- ⁹ Parkin, DM, Bray F. The burden of HPV- related cancers. *Vaccine.* 2006;24 (Suppl 3):S11-S25.
- ¹⁰ Comino R. Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología. Prevención del cancer de cervix uterino. Documentos de consenso 2006. Madrid: Meditex; 2007.p.123-178.
- ¹¹ Gondos A, Chokunonga E, Brenner H, Pakin DM, Sankila R, Borok MZ, et al. Cancer survival in a southern African Urban Population. *Int J Cancer.* 2004;112:860-864.
- ¹² Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-19.

-
- ¹³ Franco EL. Cancer causes revisited: Human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:779-780.
- ¹⁴ Schiffman MH, Brinton LA. The Epidemiology of Cervical Carcinogenesis. *Cancer.*1995;76(10 Suppl):1888-1901.
- ¹⁵ Perea EJ. Etiología de la infección VPH. En: Palacio V, editor. *Infección VPH en el área genital. Clínica, diagnóstico y tratamiento.* Oviedo: 3M; 2000. p. 25-33.
- ¹⁶ Gammoh N, Sterlinko H, Massimi P, Banks L. Regulation of Human Papillomavirus Type 16 E7 Activity through Direct Protein Interaction with the E2 Transcriptional Activator. *J Virol.* 2006;80:1787–1797.
- ¹⁷ Wolf JK. Biología molecular. En: Eifel PJ, Levenback C, editores. *Cáncer del tracto genital inferior femenino.* Barcelona: Medicina stm editores; 2003.p.41-52.
- ¹⁸ Mancebo G, Fusté P, Checa MA, Carreras C. Papel del virus del papiloma humano en la carcinogénesis cervical. En: Carreras R, Xercavins J, Checa MA, editores. *Virus del papiloma humano y cáncer de cuello uterino.* Madrid;2007.p.27-42.
- ¹⁹ Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol.* 2008;39:154-66.
- ²⁰ Castellsagué X. Epidemiología del cáncer asociado al VPH: ¿Más que cáncer cervical? *Actas del Simposio Una nueva era en la prevención del cáncer cervical;* 2007 Sep; Barcelona: Europa Press; 2007.
- ²¹ Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003;88:63-73.
- ²² Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.*2007;121:621-632.
- ²³ Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.* 2006;24 (Suppl 3):S52-S61.
- ²⁴ Puig-Tintoré LM, Alba A, Bosch FX, Castellsagué X, Coll C, Cortés X, et al. La infección por papilomavirus. Documento de consenso de la SEGO, SEC y AEPCC. *Documentos de Consenso SEGO 2002.* Madrid: Meditex-Sanex 2003.p.41-104.
- ²⁵ Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006;24 (Suppl 3): 43-53.
- ²⁶ Ho G, Bierman R, Beardsley L, Chee JC, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl JMed.*1998;338:423-428.

-
- ²⁷ Beutner KR, Tying S. Human papillomaviruses and human disease. *Amer J Med* 1997;102:9-15.
- ²⁸ Puig-Tintoré LM, Cortés J, Castellsague X, Torné A, Ordi J, de Sanjosé S et al. Prevención del cáncer de cuello uterino ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol*.2006;49 (supl 2):5-62.
- ²⁹ Richart RM. A theory of cervical carcinogenesis. *Obstet Gynecol Surv*.1969;24:874-879.
- ³⁰ Bekkers R, Massuger L, Bulten J, Melcher W. Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Rev Med Virol*.2004;14:95-105.
- ³¹ Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:252-258.
- ³² Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BKS, Howell L. Natural history of cervical squamous intraepithelial neoplasia: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998;92:727-735.
- ³³ Nobbenhuis MAE, Helmerhorst TJM, Van den Brule AJC, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. Cytological regression and clearance of high risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001;358:1782-1783.
- ³⁴ Gravitt P. ¿Es el HPV el principal iniciador del cáncer? HPV Today (monografía en Internet)*. Madrid: Santos A, Rajo C, García M, editores; 2003 (acceso 4 de diciembre de 2009). Disponible en: http://www.sego.es/Content/pdf/HPVToday_N3.pdf.
- ³⁵ Smith JS, Green J, Berrington DG, Appleby P, Peto J, Plummer M et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003;361:1159-1167.
- ³⁶ Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359:1085-1092.
- ³⁷ Rieck G, Fiander A. The effect of lifestyle factors on gynaecological cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006;20:227-251.
- ³⁸ Monsonego J, Magdelenat H, Catalan F, Coscas Y, Zerat L, Sastre X. Estrogen and progesterone receptors in cervical human papillomavirus related lesions. *Int J Cancer*.1991;48:533-539.

-
- ³⁹ Duarte-Franco E, Franco EL. Cancer of the uterine cervix. *BMC Womens Health*. 2004;25 (4 Suppl 1):S13.
- ⁴⁰ Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: Nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;158:910-913.
- ⁴¹ Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):20-28.
- ⁴² International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors. Collaborative reanalysis of individual data on 16563 women with cervical cancer and 33542 women without cervical cancer from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006;119:1108-1124.
- ⁴³ Hinkula M, Pukkala E, Kyyrönen P, Laukkanen P, Koskela P, Paavonen J et al. A population based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. *Br J Cancer*. 2004;90:1025-1029.
- ⁴⁴ Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Herrero R, de Briton RC, Gaitan E, et al. Parity as a risk factors for cervical cancer. *Am J Epidemiol*. 1989;130:486-496.
- ⁴⁵ Koskela P, Anttila T, Bjørge T, Brunsvig A, Dillner J, Hakama M et al. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 2000;85:35-39.
- ⁴⁶ Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:1604-1613.
- ⁴⁷ Dhanwada KR, Garrett L, Smith P, Thompson KD, Doster A, Jones C. Characterization of human keratinocytes transformed by high risk human papillomavirus types 16 or 18 and herpes simplex virus type 2. *J Gen Virol*. 1993;74:955-963.
- ⁴⁸ Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactor. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:29-34.
- ⁴⁹ Alonio LV. Mecanismos de oncogénesis por papilomavirus humano. En: Tatti SA, editor. *Colposcopia y patologías del tracto genital inferior en la era de la vacunación*. 1ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008.p.72-79.

-
- ⁵⁰ Ho GYF, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Prabhudas P. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1365-1371.
- ⁵¹ Ponce J. Cribado del cáncer de cuello uterino. En: Cabero LL, coordinador. XII curso intensivo de formación continuada Ginecología Oncológica. 1ª ed. Madrid: Ediciones Ergón; 2002.p.47-54.
- ⁵² Puig-Tintoré L, Castellsagué X, Torné A, De Sanjosé S, Cortés J, Roura E, et al. Coverage and factors associated with cervical cancer screening: results from the AFRODITA study: a population-based survey in Spain. *J Low Genit Tract Dis.* 2008;12:82-89.
- ⁵³ Screening for Cervical Cancer. What's New from the USPSTF? Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality; 2003 Jan. Report No. APPIP03-0004. disponible en: <http://www.ahrq.gov/clinic/3rduspstf/cervcan/cervcanwh.htm>
- ⁵⁴ Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastina LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000;132:810-819.
- ⁵⁵ Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, et al. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet.* 2006;367:122-132.
- ⁵⁶ Ronco G, Segnan N, Giorgi-Rossi P, Zappa M, Casadei GP, Carozzi F et al. Human papillomavirus testing and liquid based cytology: results at recruitment from the New Technologies for Cervical Cancer Randomized Controlled Trial. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:765-774.
- ⁵⁷ Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 1998;91:626-631.
- ⁵⁸ Alba Menéndez A. Técnicas de detección de VPH. Nuevas tecnologías. En: XVI Reunión de la AEPCC. Alicante; 2004. Disponible en: http://www.aepcc.org/download/congresos/xvi/libro_xvi_alicante2004.pdf
- ⁵⁹ Schiffman M, Wheeler C, Dasgupta A, Solomon D, Cattle PE; ALTS Group. A comparison of a prototype PCR assay and Hybrid Capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus DNA in women with equivocal or mildly abnormal Papanicolaou smears. *Am J Clin Pathol* 2005;124:1-11
- ⁶⁰ Banister C, Holladay EB. Pruebas del HPV disponibles para la aplicación clínica. HPV Today (monografía en Internet)*. Madrid: Santos A, Rajo C, García M, editores;

2005 (acceso 21 de diciembre de 2009). Disponible en:
http://www.sego.es/Content/pdf/HPVToday_N7.pdf.

⁶¹ Evans MF, Adamson CS, Papillo JL, St John TL, Leiman G, Cooper K. Distribution of human papillomavirus types in ThinPrep Papanicolaou tests classified according to the Bethesda 2001 terminology and correlations with patient age and biopsy outcomes. *Cancer*. 2006;106:1054-1064.

⁶² de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:53-59.

⁶³ Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1274-1280.

⁶⁴ Alonso I. Manejo clínico de LSIL y tratamiento de CIN 1. En: XIX Congreso AEPCC. Oviedo; 2007. Disponible en:
http://www.aepcc.org/download/congresos/xix/ponencias_y_curso_colposcopia.pdf.

⁶⁵ Coloma F, Níguez I, Diago JV, Terrádez J, Lloret A, Payá V, et al. Valor de HPV-DNA como factor pronóstico de la recidiva tras conización cervical en pacientes con HSIL. *Rev Esp Obstet Ginecol*. 2004;1:39-41.

⁶⁶ Bae JH, Kim CJ, Park TC, Namkoong SE, Park JS. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17:1271-1277.

⁶⁷ Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJLM, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine*. 2006;31;24 (Suppl 3):S3/78-89.

⁶⁸ Paraskeva E, Kalantaridou SN, Paschopoulos M, Zikopoulos K, Diakomanolis E, Dalkalitsis N, et al. Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2003;24:541-543.

⁶⁹ Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, de Schipper FA, Snijders PJ, et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv*. 2004;59:543-553.

⁷⁰ Suwalska K, Pawlak E, Karabon L, Tomkiewicz A, Dobosz T, Urbaniak-Kujda D, et al. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with B-cell chronic lymphocytic leukemia in the Polish population. *Hum Immunol*. 2008;69:193-201.

-
- ⁷¹ Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003;423:506-511.
- ⁷² Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, Benoit De Coignac A, Gauchat JF, Bonnefoy JY et al. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol*. 1999;29:3596-3602.
- ⁷³ Berry A, Tector M, Oaks MK. Lack of association between sCTLA-4 levels in human plasma and common CTLA-4 polymorphisms. *J Negat Results Biomed*. 2008;7:8.
- ⁷⁴ Mayans S, Lackovic K, Nyholm C, Lindgren P, Ruikka K, Eliasson M, et al. CT60 genotype does not affect CTLA-4 isoform expression despite association to T1D and AITD in northern Sweden. *BMC Med Genet*. 2007;8:3.
- ⁷⁵ Cozar JM, Romero JM, Aptsiauri N, Vazquez F, Vilchez JR, Tallada M, et al. High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer. *Hum Immunol*. 2007;68:698-704.
- ⁷⁶ Johansson M, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol Rev*. 2008;222:145-154.
- ⁷⁷ Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry*. 1996;35:3362-3367.
- ⁷⁸ Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*. 1998;101:746-754.
- ⁷⁹ Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9:606-612.
- ⁸⁰ Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005;106:2018-2025.
- ⁸¹ Regueiro JR, López C, González S, Martínez E. *Inmunología, biología y patología del sistema inmune*. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana;2002.
- ⁸² Kennedy C, Naipal A, Gruis N, Struijk L, Schegget J, Willenze R, et al. MICA gene polymorphism is not associated with an increased risk for skin cancer. *J Invest Dermatol* 2002;118:686-691.

-
- ⁸³ Arreygue NA, Daneri A, del Toro A, Cid A, González O, Jave LF, et al. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*. 2008;8:16.
- ⁸⁴ Dinarello CA. The Interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J*. 1994;8:1314-1325.
- ⁸⁵ Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Yoshida H, Taniguchi H, Goto T, et al. Interleukin-1beta gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2003;37:65-71.
- ⁸⁶ Zienolddiny S, Ryberg D, Maggini V, Skaug V, Canzian F, Haugen A. Polymorphisms of the interleukin-1 beta gene are associated with increased risk of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2004;109:353-356.
- ⁸⁷ Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2003;63:3560-3556.
- ⁸⁸ Grimm C, Berger I, Tomovski C, Zeillinger R, Concin N, Leodolter S. A polymorphism of the interleukin-1 receptor antagonist plays a prominent role within the interleukin-1 gene cluster in vulvar carcinogenesis. *Gynecol Oncol*. 2004;929:36-40.
- ⁸⁹ Sehouli J, Mustea A, Koensgen D, Chen FC, Lichtenegger W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism is associated with increased risk of epithelial ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2003;14:1501-1514.
- ⁹⁰ Mustea A, Sehouli J, Könsgen D, Stengel D, Sofroni D, Lichtenegger W. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA) polymorphism in women with cervical cancer. *Anticancer Res*. 2003;23(2A):1099-1102.
- ⁹¹ Tamandani DM, Sobti RC, Shekari M, Kaur S, Huria A. Impact of polymorphism in IL-1RA gene on the risk of cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2008;277:527-533.
- ⁹² Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics*. 2002;54:82-86.
- ⁹³ Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007;117:1175-1183.
- ⁹⁴ Brinkman BMN, Zuijdgeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-308 promoter polymorphism in TNF- α gene regulation. *J Inflamm* . 1996;46:32-36.

-
- ⁹⁵ Casas LA, Gutierrez A. Association of genetic polymorphisms of TNF- α and IL-10, regulatory cytokines of the immune response, in infectious, allergic and autoimmune diseases. *Infect.* 2008;1:38-53.
- ⁹⁶ Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE. Relationship between IFN- γ gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. *World J Gastroenterol.* 2006;12:2928-2931.
- ⁹⁷ Functional IFNG polymorphism in intron 1 in association with an increased risk to promote sporadic breast cancer. *Immunogenetics.* 2005;57:165-171.
- ⁹⁸ Cintorino M, Tripodi SA, Romagnoli R, Ietta F, Ricci MG, Paulesu L. Interferons and their receptors in human papillomavirus lesions of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2002;23:145-150.
- ⁹⁹ Song SH, Lee JK, Lee NW, Saw HS, Kang JS, Lee Kw. Interferon γ (IFN- γ): A possible prognostic marker for clearance of high risk human papillomavirus (HPV). *Gynecol Oncol.* 2008;108:543-548.
- ¹⁰⁰ El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN- γ mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol.* 2001;195:179-185.
- ¹⁰¹ Lee BN, Follen M, Tortolero-Luna G, Eriksen N, Helfgott A, Hammill H, et al. Synthesis of INF- γ by CD8 (+) T cells is preserved in HIV-infected women with HPV-related cervical squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol.* 1999;75:379-386.
- ¹⁰² Lai HC, Chang CC, Lin YW, Cen SF, Yu MH, Nieh S, et al. Genetic polymorphism of the interferon- γ gene in cervical carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2005;20:712-718.
- ¹⁰³ Mulé JJ, Custer M, Averbook B, Yang JC, Weber JS, Goeddel DV, et al. RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Hum Gene Ther.* 1996;7:1545-1553.
- ¹⁰⁴ Duell EJ, Casella DP, Burk RD, Kelsey KT, Holly EA. Inflammation, genetic polymorphisms in proinflammatory genes TNF-A, RANTES, and CCR5, and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:726-731.
- ¹⁰⁵ Sáenz-López P, Carretero R, Cózar JM, Romero JM, Canton J, Vilchez JR, et al. Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:382.
- ¹⁰⁶ Roth SJ, Carr MW, Springer TA. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon- γ inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1995;25:3482-3488.

-
- ¹⁰⁷ Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3652-3656.
- ¹⁰⁸ Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol*. 2003;22:773-778.
- ¹⁰⁹ Ghilardi G, Biondi ML, La Torre A, Battaglioli L, Scorza R. Breast cancer progression and host polymorphisms in the chemokine system: role of the macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)-2518 G allele. *Clin Chem*. 2005;51:452-455.
- ¹¹⁰ Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K, Toi M. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer*. 2001;92:1085-1091.
- ¹¹¹ Varney ML, Johansson SL, Singh RK. Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemotactic protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res*. 2005;15:417-425.
- ¹¹² Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394-397.
- ¹¹³ Kaisho Tsuneyasu, Akira S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand*. 2001;59:124-130.
- ¹¹⁴ Oliver J, Gómez-García M, Paco L, López-Nevot MA, Piñero A, Corro F, et al. A functional polymorphism of the NFKB1 promoter is not associated with ulcerative colitis in a Spanish population. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:576-579.
- ¹¹⁵ Beinke S, Ley SC. Functions of NFKB1 and NFKB2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004;382:393-409.
- ¹¹⁶ Tan T, Coussens LM. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Current opinion in Immunology* 2007, 19:209-216. phism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997;24:1-8.
- ¹¹⁷ Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. 2007;178:3186-3197.

-
- ¹¹⁸ 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.
- ¹¹⁹ Romero JM, Sáenz-López P, Cózar JM, Carretero R, Cantón J, Vázquez F, et al. A polymorphism in the interleukin-10 promoter affects the course of disease in patients with clear-cell renal carcinoma. *Hum Immunol.* 2009;70:60-64.
- ¹²⁰ Bhairavabhotla RK, Verm V, Tongaonkar H, Shastri S, Dinshaw K, Chiplunkar S. Role of IL10 in immune suppression in cervical cancer. *Indian J Biochem Biophys.* 2007;44:350-356.
- ¹²¹ Farzaneh F, Roberts S, Mandal D, Ollier B, Winters U, Kitchener HC, et al. The IL-10-1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. *BJOG.* 2006;113:961-964.
- ¹²² Morelli AE, Sananes C, Di Paola G, Paredes A, Fainboim L. *Am J Clin Pathol.* 1993;99:200-206.
- ¹²³ Connor JP, Ferrer K, Kane JP, Goldberg JM. Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology.* 1999;75:130-135.
- ¹²⁴ Luxton JC, Rose RC, Coletart T, Wilson P, Shepherd PS. Serological and T-helper cell responses to human papillomavirus type 16 L1 in women with cervical dysplasia or cervical carcinoma and in healthy controls. *J Gen Virol.* 1997;78:917-923.
- ¹²⁵ Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis.* 2000;181:1911-1919.
- ¹²⁶ Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis.* 2009;9:119.
- ¹²⁷ Stanley M, Lowy DR, Frazer IH. Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine.* 2006;24 (Suppl 3):S3/106-113.
- ¹²⁸ Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature. Nat Rev Cancer.* 2002;2:59-65.
- ¹²⁹ Al Saleh W, Gianinni SL, Jacobs N, Moutschen M, Doyen J, Boniver J, et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Pathol.* 1998;184:283-290.

-
- ¹³⁰ Gianinni SL, Al Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol.* 1998;113:183-189.
- ¹³¹ Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 420:860-867.
- ¹³² Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology.* 2002;16:217-226.
- ¹³³ Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:276-285.
- ¹³⁴ Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 2007;117:60-69.
- ¹³⁵ Dobrovolskaia MA, Kozlov SV. Inflammation and cancer: when NF-kappaB amalgamates the perilous partnership. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005;5:325-344.
- ¹³⁶ de Visser KE, Coussens LM. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib Microbiol.* 2006;13:118-137.
- ¹³⁷ Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005;7:211-217.
- ¹³⁸ Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:749-759.
- ¹³⁹ Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006; 441:431-436.
- ¹⁴⁰ Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:715-727.
- ¹⁴¹ Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454:436-444.
- ¹⁴² Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 2004;6:297-305.
- ¹⁴³ Nuovo J., Melnikow J., Willan A.R., Chan B.K. Treatment outcomes for squamous intraepithelial lesions *Int Gynaecol Obstet.* 2000;68:25-33.
- ¹⁴⁴ Verguts J, Bronselaer B, Donders G, Arbyn M, Van Eldere J, Drijkoningen M, et al. Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. *BJOG.* 2006;113:1303-1307.

-
- ¹⁴⁵ Paraskevaïdis E., Kitchener H., Adonakis G., Parkin D., Lolis D. Incomplete excision of CIN in conization: further excision or conservative management? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1994;53:45-47
- ¹⁴⁶ Acladiou N.N., Sutton C., Mandal D., Hopkins R., Zaklama M., Kitchener H. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer.* 2002;98:435-439.
- ¹⁴⁷ Sarian LO, Derchain SF, Pittal Dda R, Morais SS, Rabelo-Santos SH. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *J Clin Virol.* 2004;31:270-274.
- ¹⁴⁸ Tavares E, Miñano FJ. Differential sensitivities of pyrogenic chemokine receptors to CC chemokine receptor antibodies. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18:163-169.
- ¹⁴⁹ Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, et al. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of premalignant activity. *Cancer Res.* 2002;62:1093-1102.
- ¹⁵⁰ Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X et al. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:4581-4585.
- ¹⁵¹ Liou JM, Lin JT, Huang SP, Wu CY, Wang HP, Lee YC, et al. RANTES-403 polymorphism is associated with reduced risk of gastric cancer in women. *J Gastroenterol.* 2008;43:115-123.
- ¹⁵² Mantovani A, Sozzani S, Bottazzi B, Peri G, Sciacca FL, Locati M, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): signal transduction and involvement in the regulation of macrophage traffic in normal and neoplastic tissues. *Adv Exp Med Biol.* 1993;351:47-54.
- ¹⁵³ Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:35-53.
- ¹⁵⁴ SP Balasubramanian, NJ Brown, MWR Reed. Role of genetic polymorphisms in tumour angiogenesis. *Br J of Cancer.* 2002;87:1057-1065.
- ¹⁵⁵ Tokushine K, Tsuchiya N, Hasehawa K, Hashimoto E, Yamauchi K, Komatsu T, et al. Influence of TNF gene polymorphism and HLA-DRB1 haplotype in Japanese with chronic liver disease caused by HCV. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:160-166.
- ¹⁵⁶ Kusumoto K, Uto H, Hayashi K, Takahama Y, Nakao H, Suruki R, et al. Interleukin-10 or tumor necrosis factor- α polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. *Cytokine.* 2006;34:24-31.

-
- ¹⁵⁷ Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol.* 2003;71:212-218.
- ¹⁵⁸ Cheong J, Cho S, Hwang I, Yoon S, Lee J, Park C, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor- α gene promoter. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21:1163-1169.
- ¹⁵⁹ Xu X, Lu M, Tan D. Association between tumor necrosis factor gene polymorphisms and the clinical types of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:52-6.
- ¹⁶⁰ Zhang J, Dou C, Song Y, Ji C, Gu S, Xie Y, Mao Y. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet.* 2008;53:479-489.
- ¹⁶¹ Gorouhi F, Islami F, Bahrami H, Kamangar F: Tumour-necrosis factor-A polymorphisms and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2008;98:1443-1451.
- ¹⁶² 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;6:395-400.
- ¹⁶³ 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.
- ¹⁶⁴ Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S: Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factoralpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2003;13:148-53
- ¹⁶⁵ Kumar S, Kishimoto H, Chua HL, Badve S, Miller KD, Bigsby RM, Nakshatri H: Interleukin-1 alpha promotes tumor growth and cachexia in MCF-7 xenograft model of breast cancer. *Am J Pathol* 2003;163:2531-2541.
- ¹⁶⁶ Grimm C, Kantelhardt E, Heinze G, Polterauer S, Zeillinger R, Kölbl H, Reinthaller A, Hefler L. The prognostic value of four interleukin-1 gene polymorphisms in Caucasian women with breast cancer: a multicenter study. *BMC Cancer.* 2009;9:78.
- ¹⁶⁷ Balasubramanian SP, Azmy IA, Higham SE, Wilson AG, Cross SS, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Interleukin gene polymorphisms and breast cancer: a case control study and systematic literature review. *BMC Cancer.* 2006;6:188.

-
- ¹⁶⁸ White KL, Vierkant RA, Phelan CM, Fridley BL, Anderson S, Knutson KL, et al. Polymorphisms in NF-kappaB inhibitors and risk of epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2009;9:170
- ¹⁶⁹ Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1998;115:357-369.
- ¹⁷⁰ Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet*. 2004;13:35-45.
- ¹⁷¹ Fracchiolla NS, Lombardi L, Salina M, Migliazza A, Baldini L, Berti E, et al. Structural alterations of the NF-kappa B transcription factor Iy10 in lymphoid malignancies. *Oncogene*. 1993;8:2839-2845.
- ¹⁷² Ghosh S, May M, Kopp E. NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune response. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-260.
- ¹⁷³ Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, et al. Increased nuclear factor-kB activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2003; 24:377-384.
- ¹⁷⁴ Riemann K, Becker L, Struwe H, Nüchel H, Dührsen U, Alakus H, et al. No association of the NFKB1 insertion/deletion promoter polymorphism with survival in colorectal and renal cell carcinoma as well as disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16:783-788.
- ¹⁷⁵ Sun XF, Zhang H. NFKB and NFKB1 polymorphisms in relation to susceptibility to tumour and other diseases. *Histol Histopathol*. 2007;22:1387-1398.
- ¹⁷⁶ Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kB1 and NF-kB2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004;382:393-409.
- ¹⁷⁷ Zhou B, Qie M, Wang Y, Yan L, Zhang Z, Liang A, et al. Relationship between NFKB1 -94 insertion/deletion ATG polymorphism and susceptibility of cervical squamous cell carcinoma risk. *Ann Oncol*. 2010;21:506-511.
- ¹⁷⁸ Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989;47:187-376.
- ¹⁷⁹ Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2001;1:41-49.
- ¹⁸⁰ Choy MK, Phipps ME. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med*. 2010;16:97-106.

-
- ¹⁸¹ Tamaki S, Kawakami M, Yamanaka Y, Shimomura H, Imai Y, Ishida J, et al. Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Immunol.* 2009;130:331-337.
- ¹⁸² Lavado-Valenzuela R, Benavides M, Carabantes F, Alonso A, Caballero A. MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism in Spanish women with breast cancer. *Tissue Antigens* 2009;74:46-49.
- ¹⁸³ Jumnainsong A, Jearanaikoon P, Khahmahpahte S, Wongsena W, Romphruk AV, Chumworathayi B, et al. Associations of MICB with cervical cancer in north-eastern Thais: identification of major histocompatibility complex class I chain-related gene B motifs influencing natural killer cell activation. *Clin Exp Immunol.* 2008;153:205-213.
- ¹⁸⁴ Ghaderi M, Hjelmström P, Hallmans G, Wiklund F, Lenner P, Dillner J, et al. MICA gene polymorphism and the risk to develop cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Immunol.* 1999;60:970-973.
- ¹⁸⁵ Chen JR, Lee YJ, Chen T, Wang KL, Dang CW, Chang SC et al. MHC class I chain-related gene A (MICA) polymorphism and the different histological types of cervical cancer. *Neoplasma.* 2005;52:369-373.
- ¹⁸⁶ Seresini S, Origoni M, Lillo F, Caputo L, Paganoni AM, Vantini S, et al. IFN-gamma produced by human papilloma virus-18 E6-specific CD4+ T cells predicts the clinical outcome after surgery in patients with high-grade cervical lesions. *J Immunol.* 2007;179:7176-7183.
- ¹⁸⁷ 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.
- ¹⁸⁸ 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;90:287-294.
- ¹⁸⁹ Halma MA, Wheelhouse NM, Barber MD, Powell JJ, Fearon KC, Ross JA. Interferon-gamma polymorphisms correlate with duration of survival in pancreatic cancer. *Hum Immunol.* 2004;65:1405-1408.
- ¹⁹⁰ Saha A, Dhir A, Ranjan A, Gupta V, Bairwa N, Bamezai R. Functional IFNG polymorphism in intron 1 in association with an increased risk to promote sporadic breast cancer. *Immunogenetics.* 2005;57:165-171.
- ¹⁹¹ Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology.* 2002;16:217-229.

-
- ¹⁹² Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* .1999;341:1633-1688.
- ¹⁹³ Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008; 226:205-218.
- ¹⁹⁴ Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: A counterpoint. *J Leukoc Biol*. 2005;78:1043-1051.
- ¹⁹⁵ Stanczuk GA, Sibanda EN, Perrey C, Chirara M, Pravica V, Hutchinson IV, 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.
- ¹⁹⁶ 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;2:3.
- ¹⁹⁷ Shrestha S, Wang C, Aissani B, Wilson CM, Tang J, Kaslow RA. Interleukin-10 gene (IL10) polymorphisms and human papillomavirus clearance among immunosuppressed adolescents. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:1626-1632.
- ¹⁹⁸ Ioana-Braicu E, Mustea A, Toliat MR, Pirvulescu C, Könsgen D, Sun P, et al. Polymorphism of IL-1alpha, IL-1beta and IL-10 in patients with advanced ovarian cancer: results of a prospective study with 147 patients. *Gynecol Oncol*. 2007;104:680-685.
- ¹⁹⁹ Vuoristo MS. The polymorphisms of interleukin-10 gene influence the prognosis of patients with advanced melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;176:54-57.
- ²⁰⁰ Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M, Ban Y. Association of a CTLA-4 3' untranslated region (CT60) single nucleotide polymorphism with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *Autoimmunity*.2005;38:151-153.
- ²⁰¹ Sáenz P, Vázquez F, Romero JM, Carretero R, Tallada M, Ruiz F, et al. Polimorfismos en genes de respuesta inflamatoria en cáncer renal metastásico. *Actas Urol Esp*. 2009;33:474-481.
- ²⁰² Wang L, Li D, Fu Z, Li H, Jiang W, Li D. Association of CTLA-4 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han population. *BMC Cancer*. 2007;7:173.
- ²⁰³ Kondo T, Nakazawa H, Ito F, Hashimoto Y, Osaka Y, Futatsuyama K, et al. Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associated with a Th1-type immune response. *Cancer Sci*. 2006;97:780-786.

-
- ²⁰⁴ Musha H, Ohtani H, Mizoi T, Kinouchi M, Nakayama T, Shiiba K, et al. Selective infiltration of CCR5(+)CXCR3(+) T lymphocytes in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 2005;116:949-956.
- ²⁰⁵ Cózar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, et al. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:858-866.
- ²⁰⁶ Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:875-883.
- ²⁰⁷ Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998;391:344-345.
- ²⁰⁸ Enarsson K, Lundgren A, Kindlund B, Hermansson M, Roncador G, Banham AH, et al. Function and recruitment of mucosal regulatory T cells in human chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. *Clin Immunol*. 2006;121:358-68
- ²⁰⁹ Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4404-4408.
- ²¹⁰ Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5423-5434.
- ²¹¹ Liyanage UK, Goedegebuure PS, Moore TT, et al. Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. *J Immunother*. 2006;29:416-424.
- ²¹² Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, Singh B, Mortensen NJ, George BD, et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol*. 2007;7:7.
- ²¹³ Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999;59:3128-3133.
- ²¹⁴ Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163:5211-5218.

-
- ²¹⁵ Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, et al. Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia. *Clin Exp Immunol.* 2007;150:199-209.
- ²¹⁶ Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, et al. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2007;121:1749-1755.
- ²¹⁷ Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol.* 2004;78:2454-2459.
- ²¹⁸ de Vos van Steenwijk PJ, Piersma SJ, Welters MJ, van der Hulst JM, Fleuren G, Hellebrekers BW, et al. Surgery followed by persistence of high-grade squamous intraepithelial lesions is associated with the induction of a dysfunctional HPV16-specific T-cell response. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7188-7195.
- ²¹⁹ van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, van den Hende M, et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:12087-12092.
- ²²⁰ Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* 2006;25:1009-1023.
- ²²¹ Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev.* 2006; 211:214-224.
- ²²² Garrido P, Ruiz-Cabello F, Bárcena P, Sandberg Y, Cantón J, Lima M, et al. Monoclonal TCR-Vbeta13.1+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood* 2007;109:4890-4898.
- ²²³ Garrido P, Almeida J, Romero JM, Cantón J, Sandberg Y, Bárcena P, et al. Evaluation of functional single nucleotide polymorphisms of different genes coding for the immunoregulatory molecules in patients with monoclonal large granular lymphocyte lymphocytosis. *Hum Immunol.* 2008;69:101-107.
- ²²⁴ Márquez M, Fernández-Gutiérrez C, Montes-de-Oca M, Blanco MJ, Brun F, et al. Chronic antigenic stimuli as a possible explanation for the immunodepression caused by liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 2009;158:219-229.
- ²²⁵ Perricone MA, et al. Enhanced efficacy of melanoma vaccines in the absence of B lymphocytes. *J Immunother.* 2004;27:273-281.

-
- ²²⁶ Shah S, et al. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int J Cancer*. 2005;117:574-586.
- ²²⁷ Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:715-727.
- ²²⁸ Pretscher D, Distel LV, Grabenbauer GG, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:292.
- ²²⁹ Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol*. 2007;19:203-208.
- ²³⁰ Daniel D, Chiu C, Giraudo E, Inoue M, Mizzen LA, Chu NR, et al. CD4+ T cell-mediated antigen-specific immunotherapy in a mouse model of cervical cancer. *Cancer Res*. 2005;65:2018-2025.
- ²³¹ Daniel D, Meyer-Morse N, Bergsland EK, Dehne K, Coussens LM, Hanahan D. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2003;197:1017-1028.