



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL GEN *KLRK1* Y SU ASOCIACIÓN AL
DESARROLLO DEL CÁNCER CERVICO UTERINO**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A
HERNÁNDEZ JUÁREZ ALFREDO JAVIER**

DIRECTOR: DRA MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

ASESOR: Q.F.B PATRICIA VIDAL MILLÁN

MÉXICO D.F. A 13 de NOVIEMBRE DE 2012



El siguiente estudio fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del la Unidad de Alta Especialidad Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI bajo la dirección de la Dra. en Ciencias Martha Esthela Pérez Rodríguez y asesoría de la Q.F.B. Patricia Vidal Millán de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

El siguiente trabajo recibió los siguientes apoyos:

Fondo para el Fomento a la Investigación (FOFOI) IMSS 2005/1/1/016

Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social Conacyt-140-19.

DEDICATORIA

- **A mis padres;** por darme todo el apoyo en TODO, los amo, sin ustedes jamás podría llegar a alcanzar esta primer meta en mi vida.
- **A mi hermana Beatriz;** te quiero hermanita así como a Daniel y David (mis sobrinos) los quiero y siempre han estado conmigo toda su vida.
- **A la Dra. Martha;** por darme un lugar en su laboratorio de investigación y darme consejos de cómo manejar mi forma de ser, muchas gracias por sus consejos y por su comprensión.
- **Al M. en C. Aníbal Mateos, a la Dra. Raquel y Q.F.B. Lourdes Vega,** por sus comentarios, correcciones hacia mi trabajo, muchas gracias por mejorar mi tesis.
- **A la Q.F.B. y mi maestra por excelencia de Hematología Patricia Vidal Millán,** por la inspiración que dio a mi pasión que hoy tengo por la investigación y sus magistrales clases de Hematología que no solo eran de esa materia, señalización, células troncales, genética, biología molecular, muchas gracias por todo.
- Por ultimo pero no menos importante, a ti **Carolina,** amor de mi vida, que me has comprendido, apoyado, por estar conmigo incondicionalmente y que sabes que te amo y te adoro, no tendré amigos pero contigo no los necesito, gracias por todo, TE AMO.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. ABREVIATURAS.....	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	5
IV.2 EPIDEMIOLOGIA DEL CaCu.....	6
VI.3 FACTORES DE RIESGO	7
IV.4 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	7
IV.4.1 Genoma del VPH.....	8
IV.4.2 Ciclo viral.....	9
IV.5 PERSISTENCIA VIRAL Y DESARROLLO DE LESIONES PRECURSORAS AL CaCu..	9
IV.6 LESIONES PRECURSORAS AL CaCu	10
IV.7 SISTEMA INMUNE FRENTE A VPH	11
IV.8 CARCINOGENESIS DEL CaCu	12
IV.9 CÉLULAS NK.....	13
IV.10 NKG2D.....	14
IV.11 FUNCION DEL NKG2D EN CARCINOGENESIS.....	15
IV.12 GEN <i>KLRK1</i>.....	16
IV.12.1 Polimorfismo del gen <i>KLRK1</i>	17
IV.12.2 Asociación del polimorfismo del gen <i>KLRK1</i>	17
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
VI. HIPÓTESIS.....	19
VII. OBJETIVO.....	20
VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL	21
VIII.1 TIPO DE ESTUDIO	21
VIII.2 POBLACION DE ESTUDIO.....	21
VIII.2.1 Criterios de Inclusión.....	21
VIII.2.2 Criterios de exclusión	21
VIII.5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
VIII.5.1 Material.....	22
VIII.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	22
VIII.6 DISEÑO ESTADISTICO.....	24
IX. RESULTADOS	25
IX.1 Identificación alélica y genotípica en pacientes con LIEB	27
X.2 Identificación alélica y genotípica de pacientes con LIEA.....	29
XI. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	32
XII. CONCLUSIONES	34
XII. REFERENCIAS	35

I. RESUMEN

ANTECEDENTES: El cáncer cérvico uterino ocupa el tercer lugar a nivel mundial de muerte en mujeres por tumor maligno. Existe evidencia que genes del sistema inmunológico otorgan resistencia o susceptibilidad al desarrollo de cáncer. El receptor NKG2D, que es codificado por el gen *KLRK1*, esta involucrado en la activación directa de la célula NK en la respuesta del organismo ante el desarrollo de CaCu. NKG2D presenta un polimorfismo de un solo nucleótido en la región transmembranal de la célula, variando la secuencia de esta proteína en la posición 72, cambiando un aminoácido Alanina por un aminoácido Treonina. Varios estudios sitúan a este polimorfismo como responsable de la susceptibilidad a enfermedades inmunológicas y desarrollo de varios tipos de cáncer.

OBJETIVO: Analizar el polimorfismo de la región transmembranal del gen *KLRK1* mediante PCR en tiempo real en mujeres mexicanas y su asociación al desarrollo de cáncer cérvico uterino.

MÉTODO: El polimorfismo se analizó mediante la técnica de PCR en tiempo real con el ensayo de discriminación alélica mediante su rs2255336 y cambio de nucleótido G→A. Fueron analizadas y comparadas, 200 muestras de DNA de pacientes mexicanas con lesiones precursoras al cáncer cérvico uterino de bajo y alto grado contra 200 muestras de DNA de controles mediante la prueba estadística ji-cuadra (χ^2).

RESULTADOS: Se determinó que el polimorfismo G→A no mostró diferencia significativa entre pacientes y controles $p=0.84$, ni cuando al ser separadas y comparadas lesiones precursoras de bajo y alto grado contra controles, mostró significancia estadística.

CONCLUSIONES: Los resultados obtenidos sugieren que el alelo G del gen *KLRK1*, que codifica al receptor transmembranal NKG2D, tiene mayor frecuencia en la población estudiada y no se demostró asociación con el desarrollo de este de cáncer cérvico uterino. Además no se encontró asociación de genotipos del SNP estudiado con la susceptibilidad al desarrollo de lesiones precursoras al cáncer cérvico uterino.

II. ABREVIATURAS

A	Adenina
AKT	Proteína cinasa de dominio seria/treonina efectora de PI3K
CaCu	Cáncer cérvico uterino
DAMP	Moléculas de reconocimiento asociadas a daño
DAP10	Proteína cinasa asociada a muerte celular número 10
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
G	Guanina
ITIM	Inhibidor de motilidad de células NK
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
KIR	Receptor asesino tipo inmunoglobulina
KLRK1	Gen de la célula NK del receptor tipo lectina K miembro 1
LCR	<i>Locus</i> controlador de la región
LIEA	Lesión intraepitelial de alto grado
LIEB	Lesión intraepitelial de bajo grado
MICA/MICB	Moléculas del MHC de clase I asociadas a la cadena α/β
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
VPH	Virus del papiloma humano

III. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer cérvico uterino (CaCu) ocupa el tercer lugar de causa de muerte por tumor maligno en la mujer, teniendo 529,000 casos en 2008 con un nivel de mortalidad del 52% con 275,000 decesos siendo los países tercer mundistas los que presentan mayor frecuencia de este cáncer. En México se encuentra en la segunda causa de muerte en mujeres.

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) ha sido altamente asociada al desarrollo de CaCu, los serotipos 16 y 18 de VPH, denominados oncogénicos, son los principales inductores de lesiones precursoras al CaCu. Sin embargo existe el desarrollo de CaCu debido a mutaciones en la proteína supresor de tumores p53.

El sistema inmunológico se encarga de la defensa del organismo contra infecciones virales, microbianas y células que presentan mutaciones que alteren su ciclo celular e induzcan una transformación maligna. Esta acción del sistema inmunológico se lleva a cabo a través de dos diferentes tipos de inmunidad: innata y adaptativa.

La inmunidad adaptativa es potente, específica y diversa, pero requiere de tiempo para actuar y a medida que el patógeno atacante es familiarizado con la inmunidad adaptativa se desarrolla memoria inmunitaria. En cambio, la inmunidad innata es la primera defensa considerada la más antigua, resultado de la evolución de microorganismo y humanos. Su acción es menos potente, más específica y limitada a determinadas moléculas de reconocimiento, tales como PAMP, DAMP y HSP que reconocen daño y receptores TLR, NOD, NLR reconocen estructuras conservadas de microorganismos.

La transformación de una célula normal a tumoral de CaCu por medio de mutaciones o por inducción de VPH, esta controlada por la inmunidad innata, la erradicación de la célula debe ser inmediata, para evitar que el desarrollo de CaCu avance. Por eso la inmunidad innata toma un papel sumamente importante en el desarrollo de CaCu. En CaCu dependiente de VPH, la inmunidad adaptativa es inhibida por los mecanismos efectuados por el virus, interrumpiendo la presentación de antígeno a células T. Por otro lado, cuando el CaCu se presenta independiente de VPH, la célula tumoral gana la característica de edición y evasión del sistema inmunológico.

Las células asesinas naturales (NK) son parte de la inmunidad innata y primera línea de defensa contra infecciones víricas y células cancerosas. Estas células tienen la característica de emplear su actividad citotóxica sin ninguna ayuda del sistema inmunitario adaptativo a través de sus receptores de activación (RA). Los principales RA pertenecen a un conjunto de proteínas lectinas tipo C y en particular el más importante RA de la NK es NKG2D.

NKG2D induce citotoxicidad a través de la señalización mediada por la interacción de sus ligandos de activación mejor caracterizados MICA y MICB codificadas por el HLA. Se trata de moléculas del MHC de clase I que no se asocian a la β_2 microglobulina. Las proteínas MIC-A y MIC-B son inducibles y se expresan en células que han sido sometidas a infecciones viral o células tumorales.

NKG2D es codificado por el gen *KLRK1*, situado en la región comprendida como complejo NK en el cromosoma 12. Este gen presenta polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que están asociados a enfermedades inmunológicas como Lupus eritematoso sistémico y a diferentes tipos de cáncer, entre ellos, carcinoma de colon y leucemia.

El SNP que se caracteriza por el cambio de base nitrogenada G por A variando un aminoácido alanina por una treonina en la posición 72 ha despertado gran interés debido a que es el único que se encuentra en la región transmembranal de la proteína. Estudios anteriores han asociado este SNP con Lupus eritematoso y carcinoma de colon.

El presente estudio analiza el SNP de la región transmembranal para determinar su asociación al desarrollo de lesiones precursoras al CaCu.

IV. MARCO TEÓRICO

IV.1 CÁNCER

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento descontrolado, incremento en la división, disminución en la muerte de células que han evadido cualquier regla básica de conducta que los organismos pluricelulares utilizan para construir y dar mantenimiento a tejidos, órganos y sistemas.¹

El cáncer se divide de acuerdo a que te tejido y tipo de célula afecta. Carcinomas son tumores que se desarrollan en el epitelio y es el mas común en seres humanos, los sarcomas afectan tejido conectivo como hueso, cartílago y musculo. Los linfomas y leucemias no se agrupan en una categoría si no por la estirpe celular que afecta, leucocitos y células progenitoras hematopoyéticas otro tipo de cánceres son los que se presentan en el sistema nervioso.²

Paralelo a división de tumores malignos, los benignos se denominan de diferente manera. Para el nombre del tumor benigno de células epiteliales de tipo glandular se denomina adenoma y el nombre de su forma maligna se nombra adenocarcinoma.²

El cáncer es un proceso de microevolución, ya que un solo un grupo de células evoluciona por años o décadas. Sin embargo dependerá de mutaciones y selección natural de un individuo, es decir, el sistema inmunológico y mecanismos de defensa contra tumores se defenderá ante el progreso de la enfermedad.^{3,4}

El cáncer tiene diversos factores que provoca el desarrollo del mismo. Existe una correlación entre carcinogénesis (inicio del cáncer) y mutagénesis (la generación de un cambio en la molécula de DNA), esta dada por tres clases de agentes: los carcinógenos químicos (causan cambios simples locales en el DNA), radiaciones ionizantes, como los rayos X (que causan rotura de cromosomas y translocaciones) y virus (que introducen DNA ajenos a la célula). Evidentemente una sola mutación no es suficiente para transformar una célula normal típica a una cancerosa.⁵

IV.2 EPIDEMIOLOGIA DEL CaCu

De acuerdo a la OMS el CaCu ocupa el tercera causa de muerte en el mundo por tumor maligno en mujeres con 529,00 casos reportados en el 2008 y 275,00 fallecimientos. Más del 85% ocurre en países en vías de desarrollo.^{6,7}

México en el año 2008 presentó 10,186 casos de CaCu de los cuales 5061 fueron decesos, el CaCu es la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas teniendo el 12.9% entre otros tipos de canceres (Figura 1).⁶

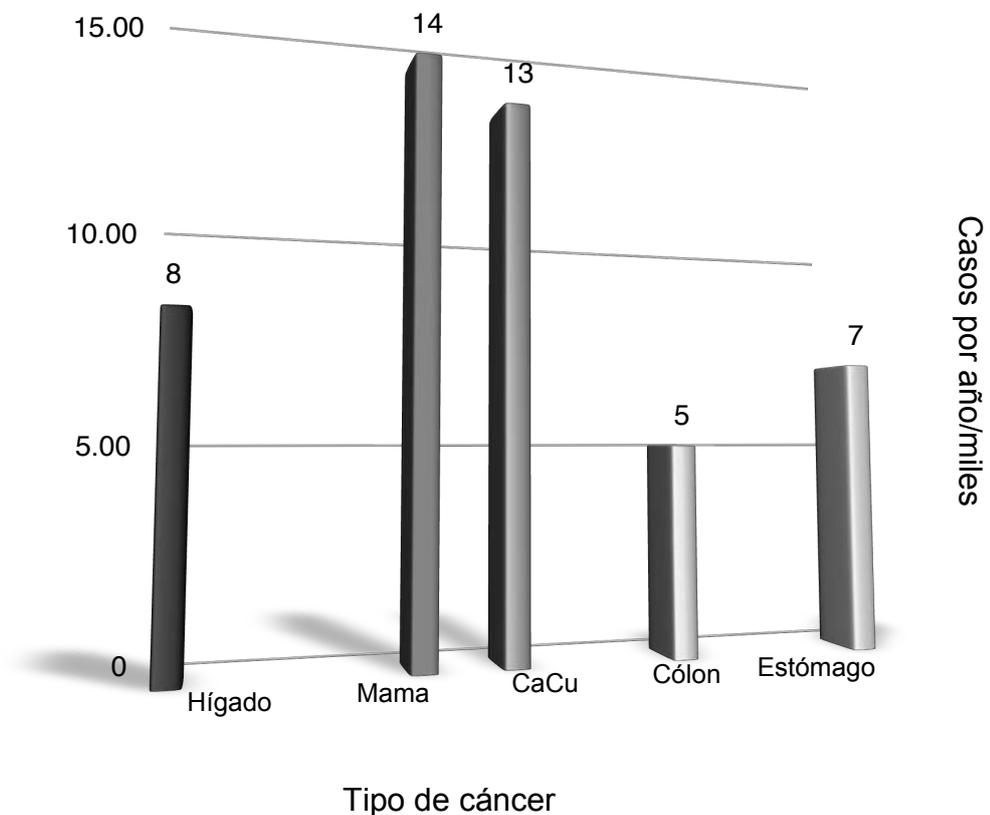


Figura 1. Mortalidad en el a6no 2008 de diferentes tipos de canceres en mujeres en M6xico. Tomado de Ferlay et al. 2008

VI.3 FACTORES DE RIESGO

El riesgo de desarrollar CaCu se debe principalmente a la infección genital por VPH. Como enfermedad de transmisión sexual (ETS), el riesgo de contraer una infección genital son: la promiscuidad, tener varias parejas sexuales.⁸ La actividad sexual temprana incrementa la infección sugiere que la relación sexual fue sin protección, el historial de otras ETS. La edad es un factor importante demostrando que la prevalencia de infectarse inicia en mujeres de 18 y 30 años, después de esta edad la prevalencia disminuye. Esto argumenta que la infección es temprana y la progresión del CaCu es lenta.^{9,10}

La persistencia viral es común entre los serotipos oncogénicos del alto riesgo (16 y 18) y la razón por la cual inicia la progresión del CaCu, ya que estos virus persisten afectando el ciclo celular e inmortalizan queratinocitos.¹¹ El uso prolongado de anticonceptivos orales está asociado a que la infección sea persistente, induciendo la respuesta del locus controlador de la región (LCR) que se encuentra en el genoma viral, esta región interactúa con glucocorticoides como la progesterona componente activo de los anticonceptivos.¹¹

Otro factor incluye la predisposición genética del individuo hacia la infección vírica. Representa el 27% de los factores subyacentes al desarrollo del tumor. Este factor afecta al individuo a su capacidad de resolver y erradicar la infección.¹¹

IV.4 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El VPH pertenece a la familia conocida como *Papillomaviridae*, esta familia recientemente se ha diferenciado de los poliomavirus de acuerdo con el Consejo Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTIV por sus siglas en inglés).¹² La partícula viral está compuesta por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros). Estos capsómeros están constituidos principalmente por la proteína L2 y en menor proporción por la L1.¹²

IV.4.1 Genoma del VPH

Se caracteriza por una molécula circular de DNA de doble cadena de 8Kb de tamaño, se divide en tres regiones: la región LCR que no tiene marco de lectura, y dos regiones codificantes para proteínas L y E (Figura 2). Las L (nombradas así por la palabra en inglés "late") son sintetizadas tardíamente y son para la composición de la cápside¹³. Las E (nombradas así por la palabra en inglés "early") su síntesis inicia temprano y son las que tienen mayor efecto biológico en la célula hospedera. Se han caracterizado 8 proteínas E, de E₁ a E₈, son responsables de la transformación, proliferación, evasión y edición del sistema inmune, replicación e inmortalizar células originando CaCu.¹⁴⁻¹⁶

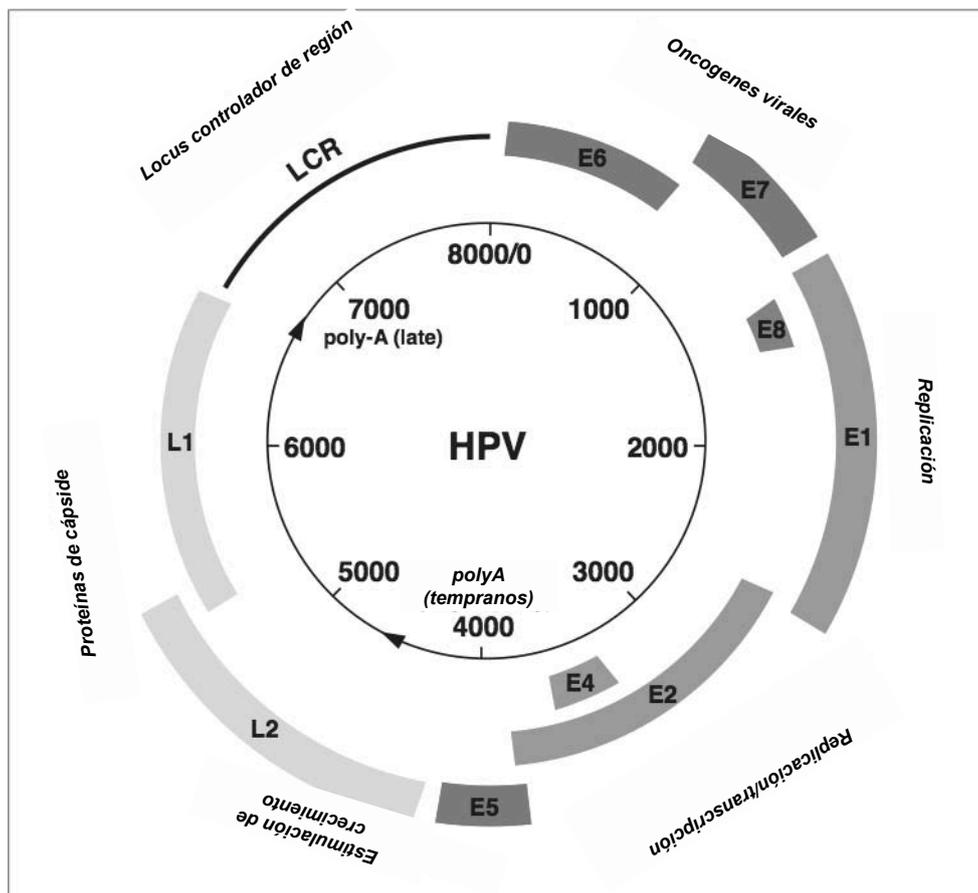


Figura 2. Representación esquemática del genoma del VPH mostrando la localización de proteínas L y E. Modificado de Taylor EW et al. 2004

IV.4.2 Ciclo viral

Los viriones pueden ingresar a través de lesiones y microtraumas en el epitelio estratificado del cuello uterino obteniendo acceso a células madres basales. No se ha reconocido un receptor específico de unión celular, aunque el complejo $\alpha_4\beta_6$ es candidato responsable de esta interacción. Además deben estar presentes glucanos de sulfato de heparina para el enganche celular del virus.¹⁷⁻

¹⁹ La penetración viral se da por endocitosis por vesículas de clatrina.²⁰

Dentro de la célula se inicia la expresión de E_1 y E_2 que facilitan la segregación del genoma durante la división celular, el genoma debe mantenerse para que el virus pueda replicarse, formando episomas, que no deben fusionarse con el DNA del hospedero, E_1 mantiene el estado episomal.²¹⁻²²

El virus entra en fase proliferativa expresando E_6 y E_7 , que detienen el ciclo celular, interviniendo a que las células del estrato suprabasal se diferencien, favoreciendo la proliferación indiferenciada de este estrato por interacción de proteínas p53, ciclina E y pRB.²³

Después en el ciclo se inicia la ampliación del genoma y producción de viriones, esto ocurre en la superficie del epitelio y es el principal mecanismo de transmisión, ya que estos se desprenden de las células, son estables en el ambiente extracelular y resistentes a la desecación permitiendo la infección a otros individuos (Figura 3).²⁴

IV.5 PERSISTENCIA VIRAL Y DESARROLLO DE LESIONES PRECURSORAS AL CaCu.

La mayoría de las lesiones leves o moderadas son resultas por individuos inmunocompetentes.²⁵ El 70% de mujeres sexualmente activas adquieren una infección por VPH, pero la mayoría son enfrentadas y resueltas exitosamente por el sistema inmunológico, cerca del 25% desarrolla una lesión intraepitelial de bajo grado (LIEB). De este 25% solo el 40% desarrollara una lesión intraepitelial de alto grado (LIEA), en otras palabras, solo el 5% desarrollaran LIEA y probablemente progrese a CaCu. En contraste con aquellas mujeres que tenga una inmunodeficiencia ya sea heredada, adquirida o inducida farmacológicamente, no podrán resolver la infección, persistiendo la infección viral hasta el desarrollo de lesiones precursoras.²⁶⁻²⁸

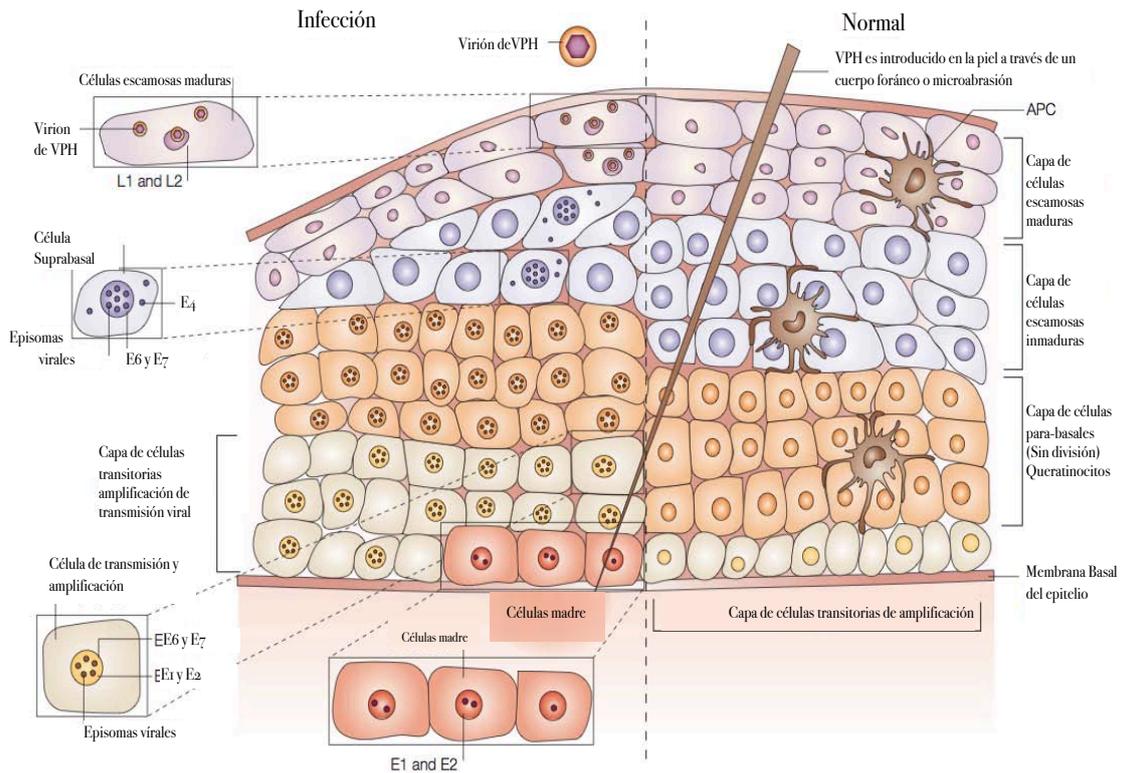


Figura 3. Principales eventos de ciclo viral del VPH hasta la formación y expulsión de viriones al ambiente extracelular. Modificado de zur Hausen H 2002

IV.6 LESIONES PRECURSORAS AL CaCu

La infección de VPH resulta una verruga o papiloma, en piel estas son planas y son el resultado de la inmortalización de queratinocitos. En genitales aparecen condilomas y son 90% transmitidos por contacto sexual.²⁹

Los virus oncogénicos y no oncogénicos, afectan genitales y desarrollan una en el cuello uterino. Las LIEB se caracterizan por presentar células inmaduras y figuras mitóticas en el tercio inferior del epitelio cervical. Las verdaderas lesiones precursoras al CaCu son las LIEA, caracterizadas por mostrar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior del epitelio (Figura 4).^{29,30}

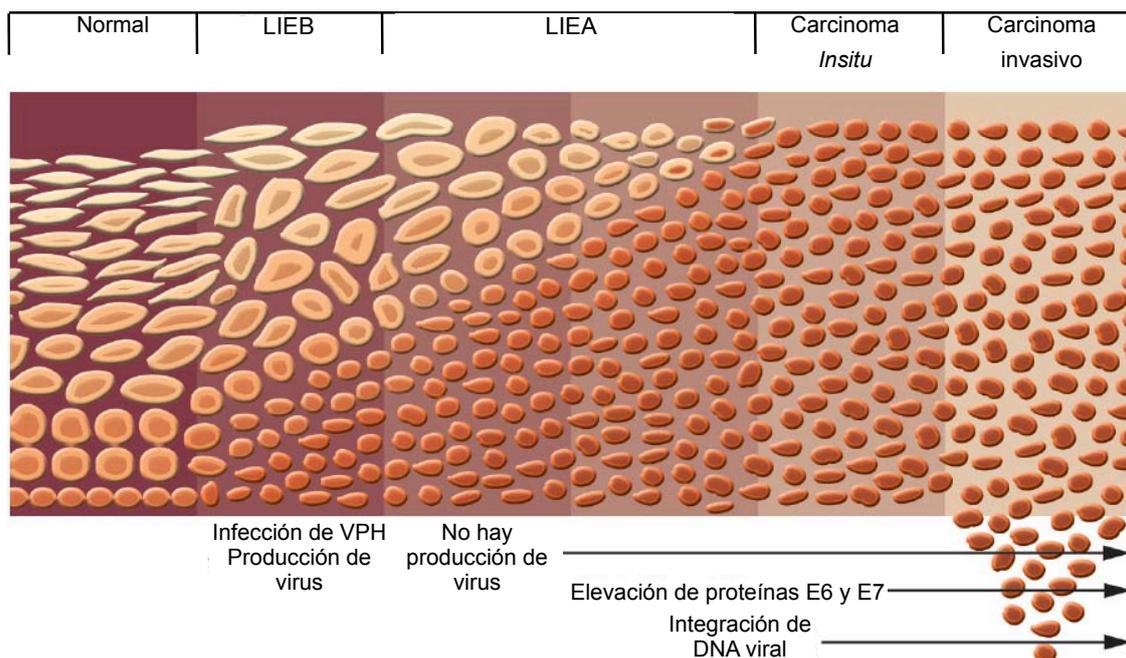


Figura 4. Representación esquemática de lesiones precursoras al CaCu. Modificado de Maufort JP et al. 2010

IV.7 SISTEMA INMUNE FRENTE A VPH

El sistema inmune es importante para la erradicación y control de la infección por VPH y células en proceso de transformación, desafortunadamente a comparación de otras infecciones virales, la respuesta inmune es débil contra VPH, el virus tiene sus propios mecanismo de evasión inmunológica. La proteína E₅, efectúa la acidificación de endosomas, lugar en donde los antígenos son ensamblado al MHC de clase II inhibiendo la presentación de antígeno.³¹ La respuesta del individuo ante la infección es la producción de una citocina potente el interferón tipo 1 (IFN). Sin embargo, E₆ y E₇ bloquean la producción de INF.³² Además E₆ inhibe la producción de quimiocinas y citocinas al interrumpir el contacto de células dentríticas con células epiteliales infectadas.³³⁻³⁵ El VPH tiene DNA de doble cadena sin intermediario de RNA de doble cadena que pueda inducir la respuesta inmune innata mediante receptores TLR. También codifica nucleoproteínas que no son secretadas que no son efectivamente presentadas por células infectadas.³⁶

IV.8 CARCINOGENESIS DEL CaCu

La carcinogénesis es el proceso mediante una célula pierde toda conducta normal y gana características propias de una tumoral. Las proteínas del VPH no solo ayudan a que el ciclo viral continúe, también llevan al epitelio escamoso metaplasico a un estado neoplásico. Los factores involucrados en este proceso se dividen en extrínsecos e intrínsecos. Como se ha mencionado el ciclo viral produce viriones en un estado del ciclo denominado episomal. Sin embargo, existe 2 estados más de la infección viral: estado de integración de DNA viral al del hospedero y estado mixto. En el estado episomal, esta controlado por la expresión de E₂ limitando la expresión de las demás proteínas E, dando como resultado solo la proliferación de células y no un proceso de transformación³⁷.

En contraste el estado de integración de DNA viral al hospedero, esta controlado por la expresión de E₅, E₆ y E₇, induciendo la perdida del control oncogénico celular.³⁸⁻⁴⁰ La integración del genoma del VPH generalmente se relaciona con la progresión de LIEB a LIEA. Sin embargo se ha demostrado que no solo influyen los oncogenes para la carcinogénesis, también, depende del sistema inmune del hospedero para erradicar células tumorales.

Si bien los factores intrínsecos del VPH producen efectos en células del hospedero, existen también extrínsecos por parte del hospedero y que el VPH interfiere con ellos.⁴¹⁻⁴³

La inmunidad se desarrolla en la mucosa genital, siendo la primera barrera de defensa contra infecciones y células tumorales. La mucosa genital es un zona que se encuentran células, T, CD4⁺, CD8⁺, NKT, NK, como también macrófagos y dentríticas. Estas diferentes tipos celulares se encargan de la inmunovigilancia. S estas células no tienen una apropiada función se desarrollan lesiones en el cuello uterino y progresar a CaCu.⁴⁴

IV.9 CÉLULAS NK

El cuerpo contiene una población pequeña de linfocitos granulares grandes llamados células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), poseen actividad citotóxica contra una amplia gama de células tumorales e infectadas por virus. Una característica extraordinaria de las NK es el reconocimiento de células tumorales e infectadas a pesar de que carecen de receptores específicos de antígeno. Detectan anomalías a través de la disminución de la expresión de MHC de clase I y son parte del sistema inmune innato.⁴⁵

Esta distinción entre células anormales o en condiciones de estrés, de las normales se da entre un balance de señales de inhibición y activación. El balance es el resultado de interacciones de la familia de receptores de la NK y ligandos celulares expresados en la superficie.⁴⁶

Los receptores que regulan la actividad citotóxica del linfocito NK se dividen en dos grupos: los receptores tipo lectina asesinos (KLR, por sus siglas en inglés) y los tipo inmunoglobulina asesinos (KIR, por sus siglas en inglés).⁴⁷

Una complicación en el entendimiento de la regulación mediada por este tipo de receptores es que no hay un grupo bien definido de quienes son activadores e inhibidores. Tanto los KIR y KLR activan o inhiben. La familia NKG2 tiene 6 miembros, A, B, C, D, E y F. De estos, A y B son inhibidores mientras C es activador. La familia KIR así mismo, contiene miembros que activan e inhiben. Los KIR se diferencian por la cantidad de dominios de inmunoglobulina que poseen, para dos se conocen como KIR2D y para tres KIR3D. La señalización de activación e inhibición es llevada a cabo por las colas citoplasmáticas de los KIR. Los KIR2DS y KIR3DS poseen colas cortas y su señal es activar la actividad citotóxica de la célula mediante una proteína adaptadora DAP12 y motivos de activación (ITAM, por sus siglas en inglés). En contraste los KIR2DL y KIR3DL por tener colas largas están acoplados a proteínas de motivos de inhibición (ITIM, por sus siglas en inglés) (Figura 5).⁴⁸

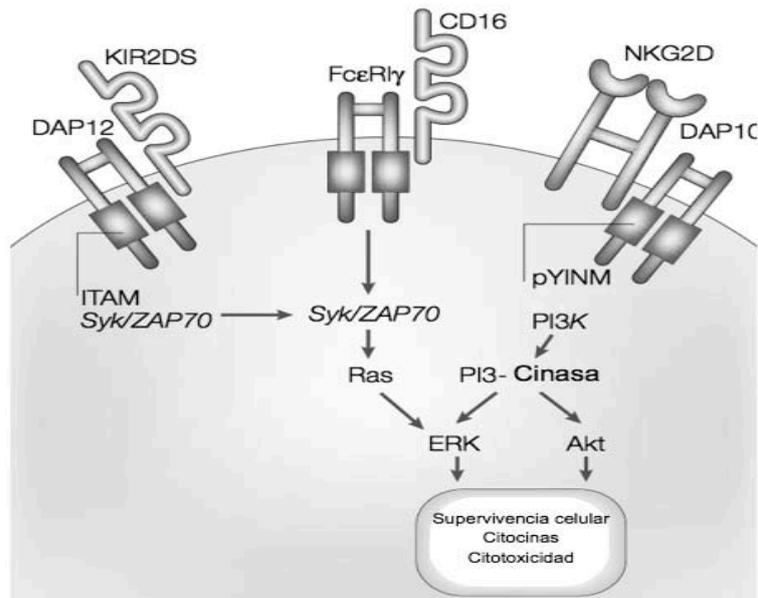


Figura 5. Complejo de receptores de activación de la NK. Modificado de Cerwenka A, Lanier LL. 2001

IV.10 NKG2D

La proteína receptora NKG2D parece tener una función específica. Otros miembros de la familia NKG (NKG2A, C y E) forman heterodímeros con CD94 y reconocen ligandos del MHC de clase I y HLA-E. Los ligandos de NKG2D son moléculas homologas a los dominios α_1 y α_2 del MHC de clase I, pero tiene una función completamente diferente estas son llamadas MICA y MICB. Estos ligandos se expresan en condiciones de estrés o agresión celular metabólica por infecciones causadas por bacterias intracelulares, virus o transformación maligna de una célula tumoral. De manera que NKG2D actúa para reconocer una señal de peligro generalizada.⁴⁹

EL NKG2D es un homodímero transmembranal, que a diferencia de los otros receptores de activación que reconocen a ITAM, el NKG2D se une a DAP10. El NKG2D también se expresa en células NKT, y $\gamma\delta$ -TCR (Figura 6).⁵⁰

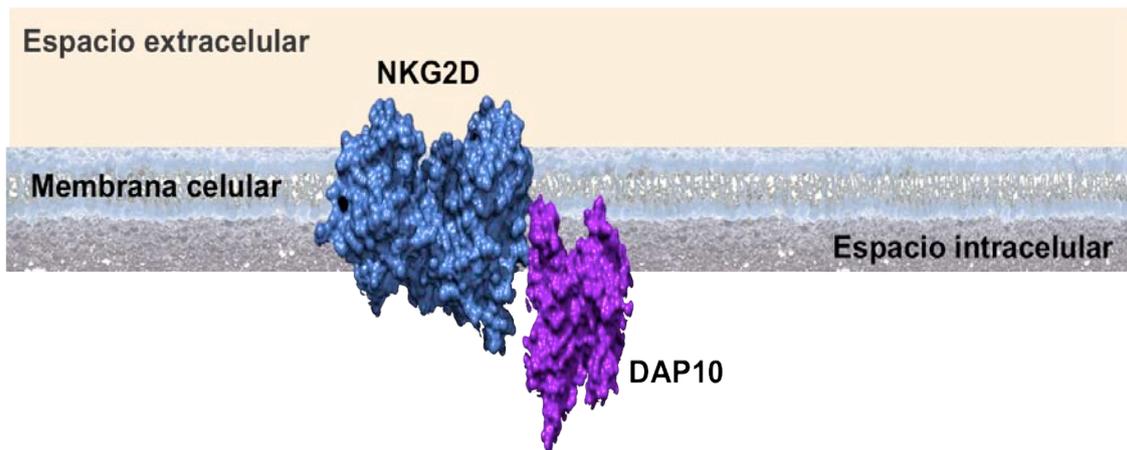


Figura 6. Asociación del NKG2D y DAP en el espacio intracelular.

IV.11 FUNCION DEL NKG2D EN CARCINOGENESIS

Se ha demostrado el papel fundamental de NKG2D en diferentes tipos de cáncer⁽⁵³⁾. NKG2D mantiene en el hospedero un estado de equilibrio destruyendo aquellas células que empiecen desarrollar una conducta maligna, ya que el sistema inmune reacciona contra señales de estrés. NKG2D reconoce a MIC-A/MIC-B para emplear una acción de lisis en células infectadas y tumorales. Esta acción lítica originada por la activación de DAP10 que tiene la capacidad de fosforilar a PI3K para mediar el efecto de secreción de perforinas que enviaran a la célula tumoral a apoptosis (Figura 7).⁵¹ La función que desempeña NKG2D es de suma importancia ya que se ha demostrado que sin la presencia de este receptor la inmunovigilancia es deficiente ante la carcinogénesis y progresión tumoral.⁵²⁻⁵⁶

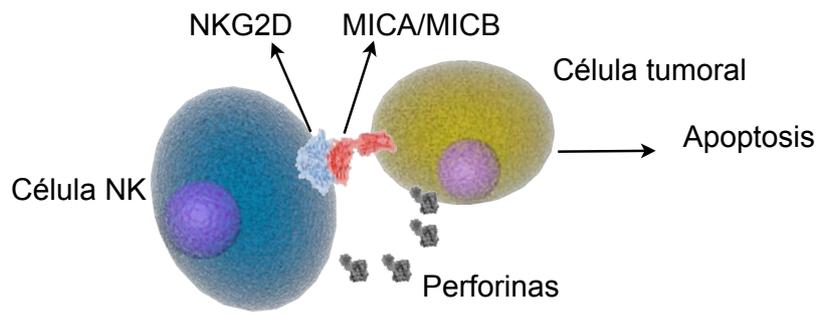


Figura 7. Mecanismo de muerte celular asociada a NKG2D en una célula tumoral.

IV.12 GEN *KLRK1*

El receptor NKG2D está codificado por la región de genes conocida como complejo del NK (NKC, por sus siglas en inglés), el NKC codifica a las proteínas KLR, se encuentra en el cromosoma 12⁵⁷. *KLRK1* es el gen que codifica a NKG2D y se encuentra en la banda 13.1(Figura 8).⁵⁸

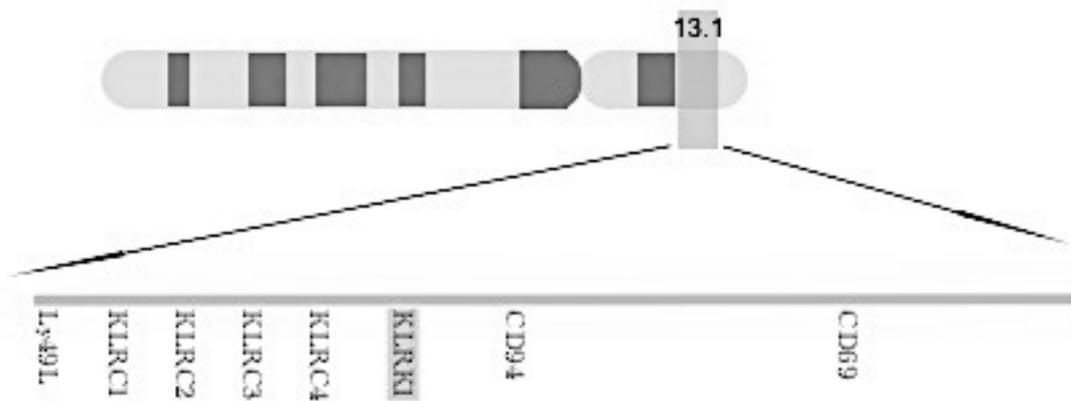


Figura 8. Esquema de la organización del cromosoma 12 marcando las regiones de los genes que codifican las proteínas tipo lectina incluyendo NKG2D.

IV.12.1 Polimorfismo del gen *KLRK1*

Un SNP se caracteriza por el cambio de una base nitrogenada por otra en la cadena de DNA. Recientemente se analizaron las variaciones del gen *KLRK1* a través de la evolución⁵⁹. Estos estudios aportaron que existen tres alelos de *KLRK1* que solo difieren en dos posiciones de nucleótidos de la secuencia original *KLRK101*. Ocho polimorfismos fueron caracterizados de los cuales cinco están asociados a citotoxicidad. Se localizaron cinco de ellos en regiones intrónicas, uno en la región 5'UTR y solo uno en la región transmembranal del receptor (TM) (Figura 9).⁶⁰

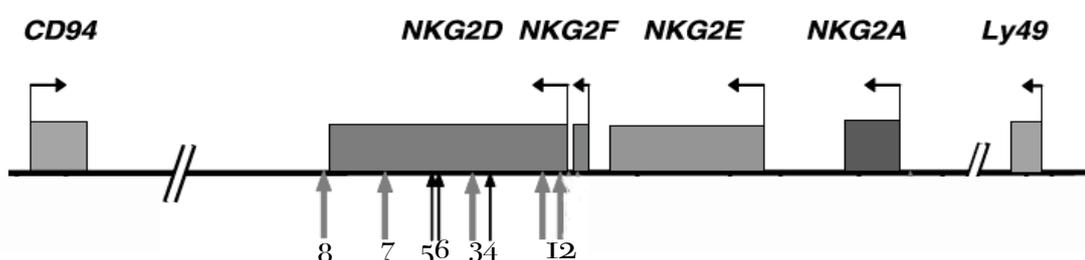


Figura 8. Esquema de la organización del cromosoma 12 marcando las regiones de los genes que codifican las proteínas tipo lectina incluyendo *NKG2D*.

IV.12.2 Asociación del polimorfismo del gen *KLRK1*

Se ha demostrado que los polimorfismos están asociados a diversas enfermedades en los seres humanos⁶¹. En el caso de *KLRK1* sus polimorfismos se asocian al bajo o alto nivel de citotoxicidad en la inmunovigilancia contra colangiocarcinoma (cáncer de la vía biliar), cáncer de colon, hepatitis y leucemia. Estos polimorfismos de *KLRK1* encontrados en las regiones no codificantes tienen un control en la función post y transcripcional del gen. El SNP con mas atención en la investigación científica, es el que se caracteriza por un cambio del nucleótido guanina por una alanina en la posición 72 de la cadena de aminoácidos del receptor *NKG2D* y localizado en la región TM. Este SNP ha sido determinado ya que es buen candidato para tener asociación a enfermedades. Este SNP G→A o también conocido como Tre72Ala, esta cerca de la unión a DAP10 y el único en la región codificante del gen.⁶²⁻

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México la segunda causa de muerte por tumor maligno en mujeres es el CaCu. Actualmente, una de cada cinco mujeres que se infectan por VPH desarrollan lesiones precursoras al cáncer. Sin embargo, existen otros factores de riesgo que pueden causar estas lesiones intraepiteliales en ausencia al VPH. Al respecto el sistema inmune, innato y adaptativo, puede eliminar la infección y desarrollo tumoral, siendo la célula NK una de las principales en participar en la inmunovigilancia. Así mismo la presencia del receptor NKG2D, es importante para inducir citotoxicidad. De ahí que se planteo la siguiente pregunta de investigación. ¿Puede el polimorfismo G→A de la región transmembranal del gen *KLRK1* que codifica al receptor NKG2D estar asociado al desarrollo de lesiones precursoras al CaCu en mujeres mexicanas?

VI. HIPÓTESIS

Considerando los estudios que evidencian que el SNP G→A del gen *KLRK1*, localizado en la región TM esta asociado al desarrollo de cáncer y otras enfermedades, suponemos que si las mujeres mexicanas con lesiones precursoras al CaCu tienen una frecuencia mayor del alelo A del SNP en comparación con el grupo control estará asociado al desarrollo de las mismas.

VII. OBJETIVO

General

Analizar el polimorfismo de la región transmembranal del gen *KLRK1* en mujeres mexicanas y su asociación en desarrollo de lesiones precursoras al CaCu.

Particulares

- Determinar la frecuencia alélica del SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes mexicanas con lesiones precursoras al CaCu y controles.
- Determinar la frecuencia genotípica del SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes mexicanas con lesiones precursoras al CaCu y controles.
- Comparar frecuencias alélicas y genotípicas del SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes mexicanas con lesiones precursoras al CaCu y controles.

VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL

VIII.1 TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio de casos y controles

VIII.2 POBLACION DE ESTUDIO

Se estudiaron 400 mujeres mexicanas, mayores de 25 años del Distrito Federal derechohabientes del IMSS.

VIII.2.1 Criterios de Inclusión

- Pacientes; Mujeres mexicanas en edad reproductiva con lesiones precursoras al CaCu (LIEB y LIEA), confirmación previa por papanicolaou anormal, colposcopia y biopsia positiva.
- Controles; Mujeres mexicanas en edad reproductiva con tres papanicolau negativos y colposcopia negativa.

VIII.2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes; Mujeres no mexicanas y de grupo de alto riesgo de infección por VPH.
- Controles; Mujeres no mexicanas sin historial de cirugía de útero o histerectomía.

VIII.5 MATERIAL Y MÉTODOS

VIII.5.1 Material

DNA genómico de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por medio de la técnica *Salting out* de pacientes (n=200) y controles (n=200) extraído previamente.⁶⁶

VIII.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El método que se utilizó se basa en la amplificación de un fragmento del gen con sondas MGB Taqman que hibridan específicamente con su secuencia complementaria, en este caso, donde se encuentra el SNP, el iniciador se alinea con su parte complementaria para dar inicio a la reacción.

Cada sonda MGB Taqman contiene un fluorocromo denominado V (VIC) y otro denominado F (FAM), para cada tipo de alelo cada uno contiene un color específico para identificar el alelo o SNP a analizar. También contiene un apantallador o Q (por sus siglas en inglés Quencher) que está unido al MGB (ligando de unión al surco menor) que inhibe la señal de fluorescencia ya que está situado a una distancia apropiada para que no exista señal alguna cuando no haya iniciado la PCR. La polimerasa por su propiedad de proofreading (a prueba de errores) tiene una acción exonucleasa que hidroliza la base que no sea complementaria y así detectar el SNP a analizar (Figura 11).

El DNA extraído se analizó por medio del ensayo de genotipificación Taqman C_22777476_10 (Applied Biosystem Foster CA.) SNP con referencia rs2255336 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2255336). Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT) usando el equipo StepOne® de Applied Biosystem con Software StepOne® v.2.1 experimento de genotipificación. Volumen total 25µL que consiste en lo siguiente: 12.50µL. TaqMan Universal Master Mix, 1.25µL. 20x SNP Genotyping Assay Mix (contiene primers marcados por VIC y FAM MGB TaqMan), 11.5µL de DNA (1.5µL de DNA en 2.70µL. H₂O). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Un ciclo 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización 15 segundos a 92°C y 1 minuto a 60°C. Una sola repetición por muestra.

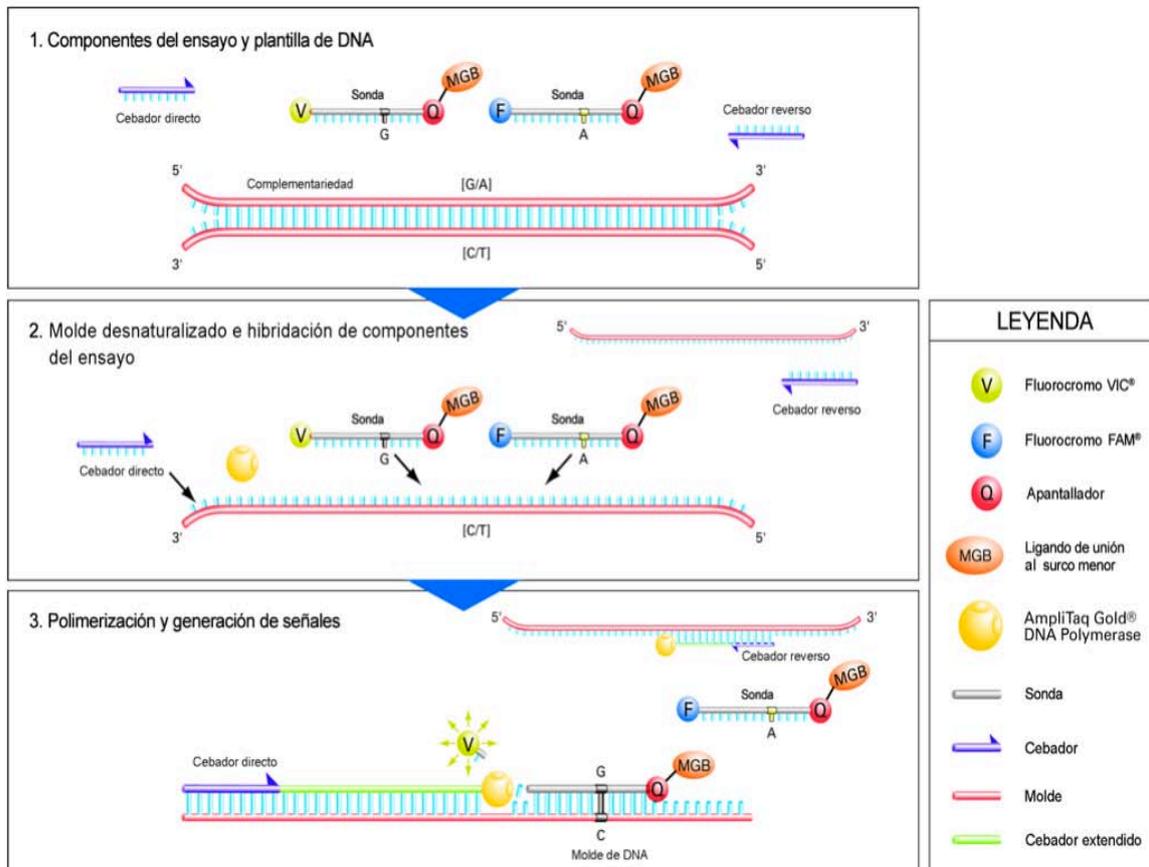


Figura 9. Representación esquemática del experimento de genotipado usando la PCR en tiempo real.

VIII.6 DISEÑO ESTADISTICO

La frecuencia de genotipos del grupo control fueron calculadas para el equilibrio Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes con CaCu se compararon contra los controles. Así mismo los pacientes se dividieron en su respectivo lesión, tanto LIEB como LIEA, se compararon los dos grupos contra controles. La diferencias se evaluaron mediante la prueba estadística ji-cuadrada χ^2 con el programa estadístico Graphpad PRISM 5.0. Se tomo el valor de $p < 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

IX. RESULTADOS

Cuando se analizó el SPN de la región transmembranal del gen *KLRK1* por medio de la PCR en tiempo real, se determinaron los alelos G y A mediante discriminación alélica con sondas Taqman en pacientes y controles.

Se observó una diferencia no significativa al comparar el grupo de pacientes con lesiones al CaCu contra el grupo control (Cuadro 1). Sin embargo, se presentó una frecuencia alta del alelo G, tanto en pacientes como controles y baja para el alelo A en ambos grupos (Figura 10).

Cuadro 1. Frecuencias alélicas observadas para el SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes y controles

<i>KLRK1</i> G→A rs2255336	Controles <i>n</i> =200	CaCu <i>n</i> =200	OR	95% IC	<i>p</i> *
Frecuencias Alélicas					
G	186(93.5%)	187(93.5%)	1.089	0.4843-2.449	0.84
A	14(6.5%)	13(6.5%)			

* χ^2

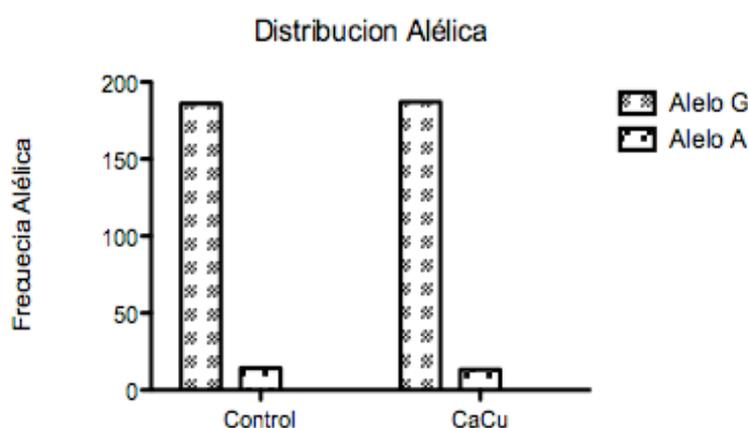


Figura 10. Histograma que muestra las frecuencias alélicas de la población estudiada.

El genotipo del SNP G→A de *KLRK1* fue clasificado en tres categorías: 1) Homocigoto G/G, 2) Heterocigoto A/G y 3) Homocigoto A/A, la distribución de genotipos (Figura 11), el grupo control se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0.22$). Al comprar las frecuencias genotípicas de pacientes contra controles (Figura 12), encontramos que el genotipo G/G fue mas frecuente en ambos grupos (Cuadro 2) y la frecuencia para A/G fue similar en los dos grupos pero menor que la frecuencia de A/A. En contraste la frecuencia genotípica A/A no fue observada.

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas observadas para el SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes y controles

<i>KLRK1</i> G→A rs2255336	Controles n=200	CaCu n=200	OR	95% IC	p^*
Frecuencias Alélicas					
G/G	175(87.5%)	174(87%)	0.117	0.0080-3.888	0.84
A/G	23(11.5%)	26(13%)			
A/A	2(0.1%)	0(0%)			

* χ^2

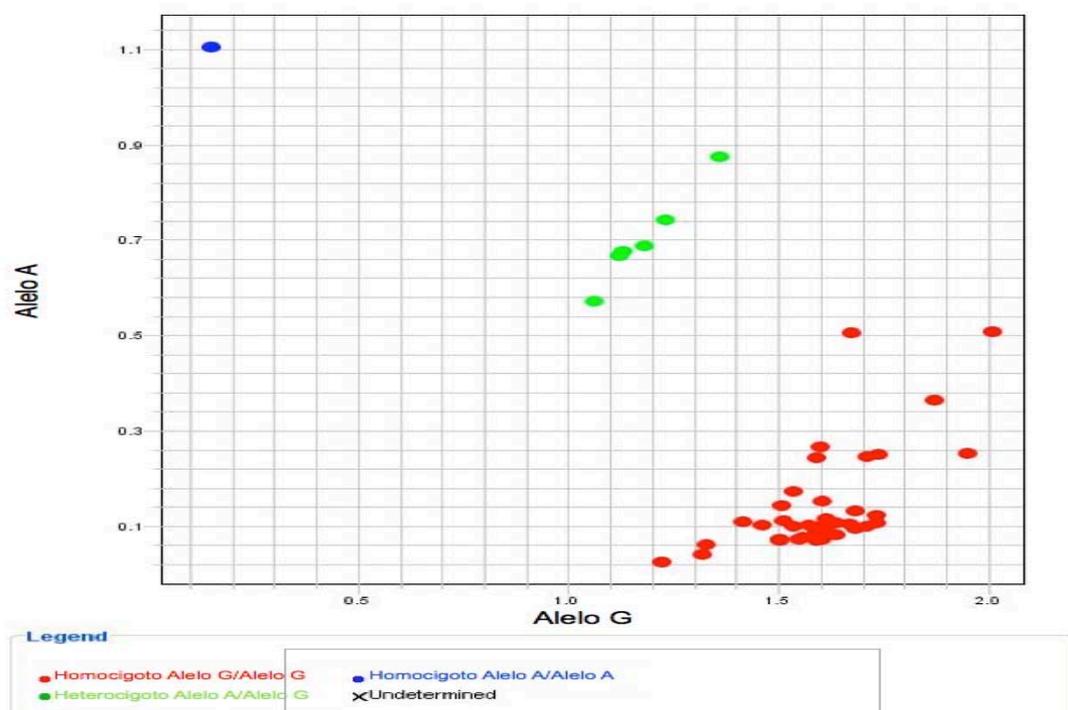


Figura 11. Distribución genotípica de la población estudiada. Se observa que existe una mayor frecuencia del alelo G (rojo) en contraste con el alelo A (azul)

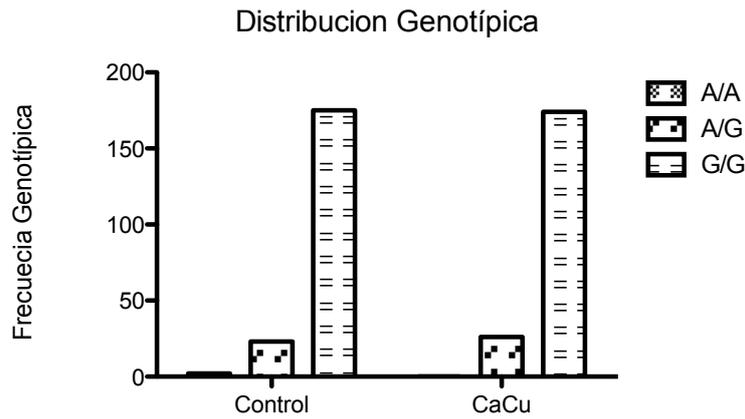


Figura 12. Histograma que muestra las frecuencias genotípicas de la población estudiada.

IX.1 Identificación alélica y genotípica en pacientes con LIEB

Los pacientes se dividieron en su respectiva lesión intraepitelial, LIEB y LIEA. Cuando se determinaron los alelos A y G para el grupo de LIEB (Cuadro 3) no se presentó diferencia significativa al comparar LIEB contra controles. Sin embargo, también se observó que la frecuencia del alelo G es mayor en contraste con el alelo A en ambos grupos (Figura 13).

Cuadro 3. Frecuencias alélicas observadas para el SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes con LIEB y controles

<i>KLRK1</i> G→A rs2255336	Controles <i>n</i> =200	LIEB <i>n</i> =129	OR	95% IC	<i>p</i> *
Frecuencias Alélicas					
G	189(93.5%)	122(95%)	0.762	0.2299-1.943	0.64
A	14(6.5%)	7(5%)			

* χ^2

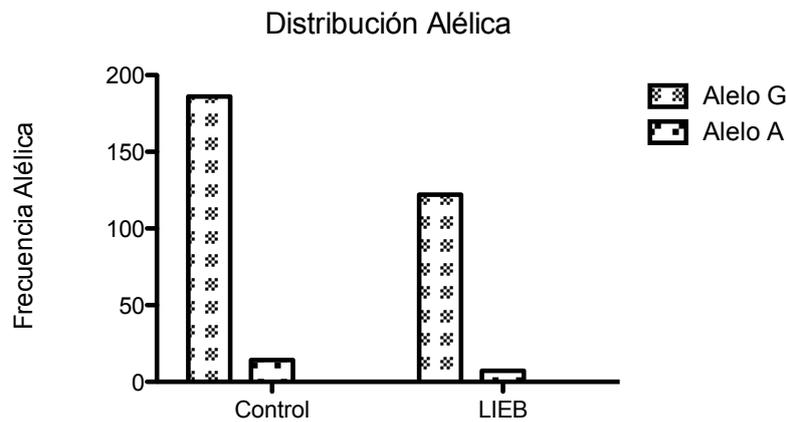


Figura 13. Histograma que muestra las frecuencias alélicas del grupo de pacientes con LIEB y controles

Al comparar las frecuencias de genotipos entre los pacientes con LIEB y el grupo control, no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 4). Además, se observa que la frecuencia mayor la posee el genotipo G/G en ambos grupos. Para el genotipo A/G es menor la frecuencia comparado con el genotipo G/G en pacientes y controles pero no existe diferencia significativa al comprar pacientes y controles. El genotipo A/A es nulo para ambos grupos (Figura 14).

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas observadas para el SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes con LIEB y controles

<i>KLRK1</i> G→A rs2255336	Controles n=200	LIEB n=129	OR	95% IC	p*
Frecuencias Alélicas					
G/G	175(87.5%)	114(88%)	0.852	0.0320-2.128	0.82
A/G	23(11.5%)	15(12%)			
A/A	2(0.1%)	0(0%)			

* χ^2

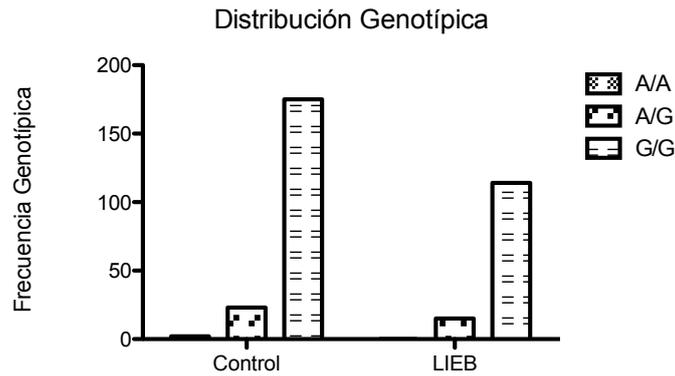


Figura 14. Histograma que muestra las frecuencias genotípicas del grupo de pacientes con LIEB y controles

X.2 Identificación alélica y genotípica de pacientes con LIEA

En el caso de pacientes con LIEA, no encontramos diferencia significativa al comparar las frecuencias entre pacientes con LIEA y controles (Cuadro 5). Sin embargo, se encontró que el alelo G es más frecuente que el alelo A en ambos grupos (Figura 15).

Cuadro 5. Frecuencias alélicas observadas para el SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes con LIEA y controles

<i>KLRK1</i> G→A rs2255336	Controles <i>n</i> =200	LIEA <i>n</i> =60	OR	95% IC	<i>p</i> *
Frecuencias Alélicas					
G	186(93.5%)	56(96.5%)	1.033	0.3238-3.295	1.00
A	14(6.5%)	4(3.5%)			

* χ^2

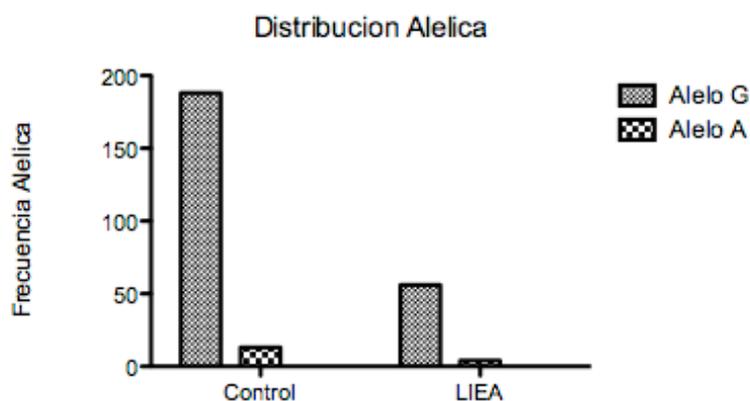


Figura 15. Histograma que muestra las frecuencias alélicas del grupo de pacientes con LIEA y controles

Por ultimo cuando se determino la frecuencia genotípica para el grupo de LIEA (Cuadro 6), encontramos que, al igual que en LIEB, el genotipo G/G es mas frecuente tanto en pacientes como en controles. Para A/G la frecuencia fue menor que G/G y para A/A su frecuencia fue nula en ambos grupos (Figura 16).

Cuadro 6. Frecuencias genotípicas observadas para el SNP de la región transmembranal del gen *KLRK1* en pacientes con LIEA y controles

<i>KLRK1</i> G→A rs2255336	Controles <i>n</i> =200	LIEB <i>n</i> =60	OR	95% IC	<i>p</i> *
Frecuencias Alélicas					
G/G	175(87.5%)	52(88%)	0.9490	0.3000-3.000	1.00
A/G	23(11.5%)	8(12%)			
A/A	2(0.1%)	0(0%)			

* χ^2

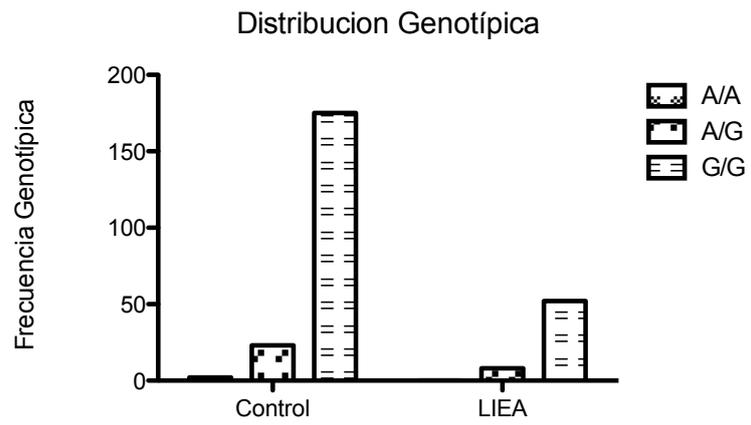


Figura 16. Histograma que muestra las frecuencias genotípicas del grupo de pacientes con LIEA y controles

XI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los polimorfismos en genes son el resultado de la variación de secuencias de DNA (sustituciones nucleotídicas, delaciones, inserciones, secuencias palindrómicas y regiones microsatelitales) con una frecuencia alta en individuos de una población y muchos de estos han sido asociados a múltiples enfermedades⁶⁷. Se ha reportado que el gen *KLRK1* que codifica al receptor NKG2D contiene varios SNP, es el único en la región codificante cerca de la unión de NKG2D y DAP10, el polimorfismo cambia una G por una A y varios autores también lo describen como el polimorfismo Thr72Ala⁶⁸. Este polimorfismo se caracteriza por la sustitución de una Treonina por una Alanina en la región transmembranal. Este SNP ha sido estudiado, demostrando que la presencia del polimorfismo A contribuye a una disminución de linfocitos de sangre periférica que afecta a la inmunovigilancia ante el cáncer en el individuo y esta asociado a la susceptibilidad de Lupus Eritematoso Sistémico⁽⁶⁷⁾. Además *Hayashi et al*⁽⁶⁴⁾ demostraron que el genotipo homocigoto A/A (Ala/Ala) reduce la citotoxicidad de las células NK en pacientes con cáncer.

El polimorfismo se encuentra en la posición 72 cerca de la posición 66 en la cual es el sitio de unión a DAP10⁶⁹, en nuestro estudio tratamos de demostrar si existía una asociación de este SNP con el desarrollo de lesiones precursoras al CaCu. No encontramos asociación de alelos y de genotipos en pacientes con lesiones precursoras al cáncer cérvico uterino ($p=0.84$). Las frecuencias mas altas pertenecen al alelo G al igual que al genotipo G/G. Estos resultados comprueban lo demostrado por *Melum et al*⁷⁰, al no encontrar asociación del polimorfismo con carcinoma de colon ($p=0.72$). Los genotipos mostrados en este estudio demuestran que en la población estudiada tanto en pacientes como controles existe una frecuencia baja el genotipo A/A (0.1%), que en comparación con el estudio de *Kabalak et al*⁷¹, que muestra la distribución genotípica de dos poblaciones, española y alemana que tienen mayor frecuencia de A/A y es susceptible a Lupus debido a que la población muestra mas frecuencia de la variante NKG2D 72 alanina.

Los pacientes fueron agrupados en su respectiva clasificación de acuerdo a que lesión precursora presentaba si LIEA o LIEB. Así se obtuvieron dos grupos LIEA($n=60$) y LIEB ($n=29$), ambos grupos fueron comparados con los

controles, no mostrando diferencia significativa ($p=1.00$ y $p=0.81$), la frecuencia genotípica no mostró diferencia entre el grupo de LIEA o LIEB contra los controles. Recientemente *Roszak et al*⁷² demostraron que los pacientes con cáncer cervical con genotipo G/G están protegidos contra la progresión del CaCu a estadios mas avanzados en pacientes polacas. Lo que se sugiere que en estudios posteriores se obtenga la historia clínica del paciente para poder comparar la protección del genotipo G/G en mujeres mexicanas. Por otra parte el mismo estudio reporta que el genotipo mas frecuente es el G/G al igual que en nuestra población estudiada.

Los estudios anteriores evidencian la función del SNP en cáncer y disminución de la actividad citotóxica de la NK y hacia que el SNP del región transmembranal de NKG2D halla sido buen candidato para marcador genético al cáncer⁷³.

Nuestros resultados no encontraron asociación alguna para la variante A del SNP a la susceptibilidad a CaCu y tampoco una asociación al alelo G para protección contra el CaCu. Los resultados evidencian que las mujeres mexicanas no muestran frecuencia alguna del fenotipo del NKG2D variante, tanto en pacientes como controles, indicando que en la población se lleva acabo de manera normal la señalización intracelular mediada por NKG2D/DAP10 y que al tener mayor frecuencia del genotipo G/G en ambos grupos la citotoxicidad de la célula NK no disminuye. Para la frecuencia de genotipos heterocigotos de NKG2D los resultados muestran que aunque exista la presencia del alelo A no parece ser de suficiente impacto para adquirir una susceptibilidad a CaCu. Aunque el SNP de NKG2D esta asociado con la susceptibilidad o protección a otros tipos de cáncer debido a la presencia de la frecuencia del genotipo A/A, en nuestro estudio no se presentó.

XII. CONCLUSIONES

1. Los resultados muestran que el alelo G fue mas frecuente en la población estudiada y no esta asociado con el desarrollo al CaCu.
2. No hubo asociación de genotipos del SNP estudiado con la susceptibilidad o protección con al desarrollo del CaCu.

Por lo tanto se establece que este gen no es un marcador genético para el desarrollo del CaCu en la población estudiada.

XII. REFERENCIAS

1. Lodish H and Co. Molecular cell biology. 7th ed. New York, NY;; 2012. pag 935-970
2. Alberts B and Co. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2008. pag1205:1265
3. Heng HH, Stevens JB, Bremer SW, Ye KJ, Liu G, Ye CJ. The evolutionary mechanism of cancer. *J Cell Biochem.* 2010 Apr 15;109(6):1072-84.
4. Heng HH, Stevens JB, Bremer SW, Liu G, Abdallah BY, Ye CJ. Evolutionary mechanisms and diversity in cancer. *Adv Cancer Res.* 2011;112:217-53.
5. Poirier MC. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat Rev Cancer.* 2004 Aug;4(8):630-7.
6. Ferlay J BF, Pisani P, Parkin DM. Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. *GLOBOCAN 2008; 2008 [updated 2010];* Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp>.
7. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: *GLOBOCAN 2008.* *Int J Cancer.* 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
8. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis.* 1996 Oct;174(4):679-89.
9. Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, DeHovitz JA, et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis.* 1996 Jul-Aug;23(4):333-41.
10. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Feb;182(2):257-64.
11. Magnusson PK, Lichtenstein P, Gyllensten UB. Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer.* 2000 Dec 1;88(5):698-701.

-
12. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27.
 13. Taylor EW, Francis group. The health Professional's VPH HANDBOOK,1: Human papillomavirus and cervical cancer: The European Consortium of Cervical Cancer education; 2004.
 14. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*. 2002 Nov 21;347(21):1645-51.
 15. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):12180-4.
 16. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2001 Jan;37(2):246-50.
 17. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 2001 Feb;75(3):1565-70.
 18. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 May 11;283(3):668-73.
 19. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997 Mar;71(3):2449-56.
 20. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 2003 Mar 1;307(1):1-11.
 21. Frattini MG, Lim HB, Laimins LA. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):3062-7.
 22. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002 Jun;24(3):275-90.
 23. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M.
-

-
- Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1218-23.
24. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991 Aug 29;352(6338):824-7.
25. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Feb 3;91(3):252-8.
26. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998 Feb 12;338(7):423-8.
27. Hsing AW, Schiffman M, Zhang T, Greer CE, Chen CJ, You SL, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis*. 1994 Aug;170(2):498.
28. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):342-50.
29. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27.
30. Wheeler CM. Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2008 Dec;35(4):519-36; vii.
31. Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010 Apr 1;70(7):2924-31.
32. Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology*. 2003 May 25;310(1):100-8.
33. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):59-65.
34. Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*. 2009 Sep;130(3):266-76.
-

-
35. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jan;4(1):46-54.
 36. Frazer IH. Immunology of papillomavirus infection. *Curr Opin Immunol.* 1996 Aug;8(4):484-91.
 37. Patel S, Chiplunkar S. Host immune responses to cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009 Feb;21(1):54-9.
 38. Gloss B, Bernard HU. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J Virol.* 1990 Nov;64(11):5577-84.
 39. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 1995 May;69(5):2989-97.
 40. Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5):1267-75.
 41. zur Hausen H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):252-3.
 42. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):495-505.
 43. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1995 Oct;69(10):6389-99.
 44. Stanley M. Chapter 17: Genital human papillomavirus infections--current and prospective therapies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003(31):117-24.
 45. Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod.* 2005 Dec;73(6):1253-63.
 46. Abbas, A.K., Litchman, A.H., Pillai, S.: Cellular and molecular Immunology. 7th ed.. Madrid: Elsevier 2012: pag 68-70
 47. Kenneth M., Traver P., Walport M.: Inmunobiología de Janeway.
-

-
- Séptima edición: McGraw Hill Editores México 2009: pag 94-100
48. Kind J.T., Goldsby R.A., Osborne A.B.:Inmunología de Kuby: Sexta edición: McGraw Hill: 2007: pag. 68, 360-364
 49. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2001 Oct;1(1):41-9.
 50. Leiden JM, Karpinski BA, Gottschalk L, Kornbluth J. Susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity is independent of the level of target cell class I HLA expression. *J Immunol.* 1989 Mar 15;142(6):2140-7.
 51. Lazetic S, Chang C, Houchins JP, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol.* 1996 Dec 1;157(11):4741-5.
 52. Chambers WH, Adamkiewicz T, Houchins JP. Type II integral membrane proteins with characteristics of C-type animal lectins expressed by natural killer (NK) cells. *Glycobiology.* 1993 Feb;3(1):9-14.
 53. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol.* 2003 Oct;3(10):781-90.
 54. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999 Jul 30;285(5428):727-9.
 55. Makrigiannis AP, Anderson SK. Regulation of natural killer cell function. *Cancer Biol Ther.* 2003 Nov-Dec;2(6):610-6.
 56. Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B, Lopez-Soto A, Lopez-Vazquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med.* 2008 Apr;14(4):179-89.
 57. Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med.* 2005 Sep 5;202(5):583-8.
 58. Lanier LL. NKG2D in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2005;560:51-6.
 59. Smyth MJ, Swann J, Kelly JM, Cretney E, Yokoyama WM, Diefenbach A, et al. NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med.* 2004 Nov 15;200(10):1325-35.
-

-
60. Yokoyama WM, Plougastel BF. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol.* 2003 Apr;3(4):304-16.
61. Ucisik-Akkaya E, Dorak MT. A study of natural killer cell lectin-like receptor K1 gene (KLRK1/NKG2D) region polymorphisms in a European population sample. *Tissue Antigens.* 2009 Feb;73(2):177-83.
62. Shum BP, Flodin LR, Muir DG, Rajalingam R, Khakoo SI, Cleland S, et al. Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes. *J Immunol.* 2002 Jan 1;168(1):240-52.
63. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med.* 1991 Apr 1;173(4):1017-20.
64. Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):563-70.
65. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica.* 2009 Oct;94(10):1427-34.
66. Nieves-Ramirez ME, Partida-Rodriguez O, Alegre-Crespo PE, Tapia-Lugo Mdel C, Perez-Rodriguez ME. Characterization of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor alpha Promoter Region and in Lymphotoxin alpha in Squamous Intraepithelial Lesions, Precursors of Cervical Cancer. *Transl Oncol.* 2011 Dec;4(6):336-44.
67. Melum E, Buch S, Schafmayer C, Kalthoff H, Tepel J, Schreiber S, et al. Investigation of cholangiocarcinoma associated NKG2D polymorphisms in colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 2008 Jul 1;123(1):241-2.
68. Furue H, Matsuo K, Kumimoto H, Hiraki A, Suzuki T, Yatabe Y, et al. Decreased risk of colorectal cancer with the high natural killer cell activity NKG2D genotype in Japanese. *Carcinogenesis.* 2008 Feb;29(2):316-20.
69. Melum E, Karlsen TH, Schrupf E, Bergquist A, Thorsby E, Boberg KM, et al. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis is associated
-

-
- with NKG2D polymorphisms. *Hepatology*. 2008 Jan;47(1):90-6.
70. Kabalak G, Thomas RM, Martin J, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, de Ramon E, et al. Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. *Hum Immunol*. 2010 Jan;71(1):74-8.
71. Ma J, Guo X, Wu X, Li J, Zhu X, Li Z, et al. Association of NKG2D genetic polymorphism with susceptibility to chronic hepatitis B in a Han Chinese population. *J Med Virol*. 2010 Sep;82(9):1501-7.
72. Roszak A, Lianeri M, Jagodzinski PP. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala Polymorphism in Patients with Cervical Carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012 Apr 5.
73. Piotrowski P, Lianeri M, Olesinska M, Jagodzinski PP. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep*. 2012 Feb;39(2):1343-7.